



**HAL**  
open science

# Identification de nouvelles cibles thérapeutiques au cours du syndrome de Gougerot-Sjögren primitif (SJp)

Renaud Felten

► **To cite this version:**

Renaud Felten. Identification de nouvelles cibles thérapeutiques au cours du syndrome de Gougerot-Sjögren primitif (SJp). Immunologie. Université de Strasbourg, 2023. Français. NNT : 2023STRAJ070 . tel-04356735

**HAL Id: tel-04356735**

**<https://theses.hal.science/tel-04356735>**

Submitted on 20 Dec 2023

**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.

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ**  
**CNRS UPR 3572**

**THÈSE** présentée par :

**Renaud FELTEN**

soutenue le : **18 octobre 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Immunologie

**Identification de nouvelles cibles  
thérapeutiques au cours du syndrome  
de Gougerot-Sjögren primitif (SjP)**

**THÈSE dirigée par :**

**M. GOTTENBERG Jacques-Eric**

PU-PH, Service de Rhumatologie, CHU de Strasbourg, 1 avenue Molière 67000 Strasbourg, CNRS UPR 3572, université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mme NOCTURNE Gaetane**

PU-PH, Service de Rhumatologie, APHP Hôpital Bicêtre, 78 rue du Général Leclerc 94270 Le Kremlin Bicêtre, INSERM UMR1184, Université Paris-Saclay

**Mme TRUCHETET Marie-Elise**

PU-PH, Service de Rhumatologie, CHU de Bordeaux, Place Amélie Raba Léon 33076 Bordeaux, CNRS UMR5164, Université de Bordeaux

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M. GEORGEL Philippe**

Professeur, Université de Strasbourg, INSERM, IRM UMR-S 1109

**INVITÉS :**

**Mme MONNEAUX Fanny**

**Mme DUMORTIER Hélène**

Chargée de recherche, CNRS UPR3572, Université de Strasbourg  
Directrice de recherche, CNRS UPR3572, Université de Strasbourg



# Remerciements

Le moment est venu d'exprimer ma gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de cette thèse d'immunologie. Ces années ont été remplies de défis, de découvertes et d'apprentissages, et je suis reconnaissant envers chacune des personnes m'ayant apporté leur soutien et leur encouragement tout au long de ce parcours.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le Pr Jacques-Eric GOTTENBERG pour son mentorat depuis le début de ma formation. Votre expertise, votre passion pour la recherche et votre dévouement à mon développement académique ont été d'une importance cruciale. Votre confiance et vos idées sans limites m'ont permis d'explorer de nouvelles perspectives et de progresser dans mon travail. Je suis profondément reconnaissant de l'opportunité qui m'a été donnée de travailler sous votre direction.

Je remercie chaleureusement les Prs Gaetane NOCTURNE et Marie-Elise TRUCHETET pour avoir accepté de juger mon travail. C'est un réel plaisir et un honneur de compter parmi mon jury ces deux professeurs de rhumatologie dont j'admire l'expertise médicale et les travaux de recherche.

Je remercie également le Pr Philippe GEORGEL pour son enthousiasme à juger mon travail. Je ne doute pas que ses connaissances pointues en immunologie permettront d'en faire ressortir le meilleur.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance envers les membres de mon comité de thèse, le Pr Bernard GENY et le Dr Vincent FLACHER, pour leur expertise, leurs conseils précieux et leurs suggestions constructives tout au long de ma thèse. Vos commentaires éclairés m'ont permis de parfois me recentrer et ont grandement contribué à améliorer la qualité de cette thèse.

Merci aux Drs Hélène DUMORTIER et Fanny MONNEAUX pour m'avoir accueilli au sein de votre équipe. Je dois dire que, grâce à vous, je me suis senti intégré, soutenu et épaulé durant toutes ces années. Merci pour vos conseils, votre écoute, vos sourires...

Merci également aux juniors... Matthieu, Cécile et Romain, vous m'avez intégré à votre famille, vous m'avez aidé dans mes manip' et avez essayé de me transmettre votre savoir et votre savoir-faire alors que je débute. J'ai beaucoup appris grâce à vous. Un merci tout spécial à Matthieu à qui j'ai dû poser mille questions mais qui a toujours pris le temps de me répondre et qui m'a très vite fait me sentir chez moi en venant au labo. Merci également à Sophia, Lucie, mais aussi Annaïck, Armelle et Léa pour vos partages, votre temps et vos réponses à mes questions. Merci à Delphine pour la mise au point du protocole de flux salivaire et sa réalisation à l'animalerie. Merci à Cédric qui a grandement participé à l'avancement du projet translationnel sur les ILC. Merci pour ta rigueur, ta patience, ta bonne humeur et nos discussions autour du FACS ou dans nos bureaux. Merci à Jean-Daniel pour ton expertise en microscopie, ta formation et ton aide sur la mise au point des marquages, démasquages et acquisitions.

Merci à tous ceux qui ont rendu ces années bien plus sympathiques par votre simple présence au laboratoire : Johan, Benjamin, Hayet, Diane, Adriano, François, Vincent, JB, Quentin et j'en oublie sûrement encore...

Nos discussions ont été inestimables pour mes recherches. Nos échanges fructueux ont créé un environnement stimulant et propice à l'apprentissage. Je suis reconnaissant d'avoir eu la chance de travailler avec vous tous.

Comment ne pas remercier Lou ? J'ai eu le privilège de t'accompagner et de te co-encadrer au laboratoire lors de ton master 2. Ta présence au laboratoire a été une source de grande motivation pour moi et nos échanges ont grandement contribué à améliorer la qualité de mon travail. Merci pour ta curiosité, ta rigueur, ton sérieux mais également ta bonne humeur et ta fiabilité. Je te suis très reconnaissant pour le travail fourni sur la partie portant sur les ILC au sein des glandes salivaires.

Merci à Tao, pour ton aide sur l'analyse bioinformatique de la partie transcriptomique. Ton expertise a permis aux différents jeux de données d'être correctement traités et analysés puis comparés à la base Cmap. Merci pour nos échanges multiples, ta réactivité et tes explications claires sur ce domaine auparavant obscur pour moi.

Projet collaboratif signifie également deuxième laboratoire, et je n'ai pas été en reste à Necker. Je remercie ainsi très chaleureusement le Pr Lucienne CHATENOUD d'avoir tout fait pour rendre ce projet possible. Je vous remercie de votre disponibilité, votre indulgence, votre patience et votre confiance.

Merci à toute son équipe qui m'a accueilli à bras ouverts et a vraiment facilité mon travail à Paris. Je pense plus particulièrement à Laurène, avec qui j'ai étroitement collaboré, mais aussi aux autres : Fabrice pour sa bonne humeur, ses conseils et pour avoir facilité mon travail à l'animalerie, Anne-Perrine pour son aide pour le FACS, Mélanie, Emilie, Tania, Cindy, Alix et Sylvaine pour leur gentillesse et leur accueil.

Merci au Dr Pascal SCHNEIDER pour nous avoir fourni l'Ac anti-BAFF et avoir contribué et relu avec une grande attention le manuscrit sur la partie pré-clinique des souris NOD.

Je tiens à remercier la Société Française de Rhumatologie d'avoir fait confiance au projet NOD et d'avoir financé mon année de stage de Master 2, qui m'a par la suite donné l'envie de poursuivre l'aventure jusqu'à aujourd'hui.

Mes remerciements vont également à mes collègues de l'équipe de Rhumatologie de Haute-pierre. Mener en parallèle mon activité hospitalière et ma thèse de sciences n'a pas toujours été facile. Votre aide pour me libérer du temps et votre compréhension m'ont grandement facilité la vie et permis d'être plus tranquille afin de me consacrer pleinement à la recherche. Merci tout particulièrement à Flora, Auriane, Luc, Marina, Elise et Jérémy.

Merci au Pr Jean SIBILIA pour son accompagnement et pour avoir rendu les choses plus faciles dans mon parcours académique. Merci pour sa confiance.

Merci au Pr Laurent ARNAUD qui m'a inculqué le désir et la manière de publier des articles scientifiques. Tes conseils, ton accompagnement et ta confiance m'ont apporté un bénéfice inestimable.

La thèse n'a pas été qu'une expérience professionnelle, elle a également grandement impacté ma vie personnelle. Je souhaiterais donc naturellement remercier mes amis et ma famille qui m'ont soutenu tout au long de cette aventure. Votre compréhension de mon choix d'une carrière académique, votre amour, votre soutien et vos encouragements ont été une source de motivation et de réconfort. Votre présence dans ma vie a rendu cette expérience encore plus significative. A ce titre, je te remercie tout particulièrement Julie, mon épouse, pour ton soutien, ton écoute dans mes moments de stress ou d'inquiétudes. Merci pour ta fine compréhension et analyse du

contexte afin de me délivrer des conseils avisés et appropriés en toute circonstance. Merci d'être là au quotidien, ma clé de voute c'est toi !

Enfin, je tiens à exprimer ma gratitude envers tous les patients qui ont participé à ces recherches en tant que volontaires. Leur contribution et leur engagement envers la science sont essentiels pour le progrès de la recherche.

En conclusion, je voudrais remercier tous ceux qui ont contribué à la réalisation de cette thèse. Votre soutien, votre expertise et votre présence dans ma vie ont été inestimables. Cette thèse représente le fruit d'un travail d'équipe et je suis honoré de l'avoir accompli avec vous à mes côtés.

## SOMMAIRE

<b>Remerciements .....</b>	<b>3</b>
<b>Liste des tableaux, figures et annexes .....</b>	<b>14</b>
1. Liste des Tableaux.....	14
2. Liste des Figures.....	14
3. Liste des Annexes.....	15
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>20</b>
<b>A. Le syndrome de Gougerot-Sjögren primaire (SJp) .....</b>	<b>21</b>
1. Généralités.....	21
2. Manifestations cliniques et biologiques .....	22
2.1. Diagnostic et critères de classification .....	22
2.2. Risque de lymphome .....	27
2.2.1. Prévalence .....	27
2.2.1. Facteurs de risque.....	28
2.2.2. Lymphomagénèse.....	29
3. Prise en charge actuelle .....	31
3.1. Traitements symptomatiques.....	31
3.2. Traitements systémiques .....	31
4. Physiopathologie .....	32
4.1. Généralités.....	32
4.2. Modèles murins .....	32
4.2.1. La souris NOD .....	32
4.2.2. Autres modèles murins.....	33
4.3. L'organe cible : les glandes salivaires.....	38

4.4.	Acteurs cellulaires et cytokiniques.....	39
4.4.1.	Cellules épithéliales salivaires .....	39
4.4.1.	Immunité innée.....	40
4.4.1.	Immunité adaptative .....	44
4.5.	Potentielles cibles thérapeutiques.....	49
4.5.1.	Traitements ciblant les LB .....	49
4.5.2.	Traitements ciblant les Lymphocytes T ou la co-stimulation LT/LB .....	52
4.5.3.	Traitements ciblant les structures lymphoïdes ectopiques .....	54
4.5.4.	Traitements ciblant les cytokines et leurs récepteurs .....	54
4.5.5.	Traitements ciblant les interférons ou les voies de signalisation intracellulaires .....	56
4.5.6.	Traitements d'autres mécanismes d'action.....	57
<b>B.</b>	<b>Objectifs de la thèse.....</b>	<b>59</b>
1.	Recherche préclinique (souris NOD) .....	59
2.	Recherche translationnelle .....	59
3.	Repositionnement thérapeutique par une méthode transcriptomique .....	60
<b>PREMIERE PARTIE Intérêt thérapeutique des anticorps monoclonaux anti-CD3 et anti-BAFF dans le syndrome de Sjögren primitif chez la souris NOD .....</b>		<b>61</b>
<b>A.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>62</b>
1.	Ciblage de BAFF.....	62
2.	Ciblage du LT.....	63
3.	Ciblage conjoint du LB et du LT .....	64
4.	Objectifs de notre étude.....	65
<b>B.</b>	<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>66</b>
1.	Laboratoire et animaux.....	66

2.	Traitement par anticorps anti-CD3 et anti-BAFF .....	66
3.	Flux salivaire stimulé .....	67
4.	Analyse histologique .....	69
4.1.	Sialadénite et focus score en hématoxyline-éosine .....	69
5.	Analyse des sous-populations lymphocytaires en cytométrie en flux.....	70
5.1.	Anticorps utilisés et analyse .....	70
5.2.	Préparation de la suspension cellulaire sur sang total .....	70
5.3.	Préparation des glandes salivaires.....	71
5.4.	Préparation de la rate et des ganglions pancréatiques .....	72
5.5.	Incidence du diabète.....	72
6.	Analyses statistiques .....	73
<b>C.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>74</b>
1.	Evaluation des flux salivaires stimulés .....	74
1.1.	Comparaison des flux salivaires stimulés des souris femelles NOD et B6.....	74
1.2.	Evolution des flux salivaires stimulés des souris femelles NOD après traitement .. .....	74
2.	Etude histologique de la sialadénite .....	77
2.1.	Evolution et comparaison de la sialadénite et focus score des souris NOD .....	77
2.2.	Comparaison de la sialadénite des souris femelles NOD après traitement .....	80
3.	Analyse des sous-populations lymphocytaires en cytométrie en flux.....	82
3.1.	Analyse intermédiaire sur sang total .....	82
3.2.	Analyse des glandes salivaires, de la rate, des ganglions pancréatiques et du sang après traitement .....	85
4.	Incidence du diabète.....	90

<b>D. Article “Efficacy of BAFF inhibition and B-cell depletion in non-obese diabetic mice as a spontaneous model for Sjögren's syndrome” .....</b>	<b>92</b>
---	-----------

<b>DEUXIEME PARTIE Etude de la présence et du rôle potentiel des ILCs dans le syndrome de Gougerot-Sjögren primaire .....</b>	<b>122</b>
---	------------

<b>A. Introduction .....</b>	<b>123</b>
------------------------------	------------

1. Justification de l'étude des ILC dans la physiopathologie du SJp .....	123
---	-----

1.1. Hypothèses sur la participation des ILC dans la physiopathologie du SJp .....	123
--	-----

1.2. Données actuelles sur l'implication des cellules lymphoïdes innées auxiliaires dans la physiopathologie du SJp.....	124
--	-----

2. Etude au laboratoire des proportions d'ILC sanguines et salivaires dans le SJp .....	124
---	-----

<b>B. Matériel et méthodes .....</b>	<b>127</b>
--------------------------------------	------------

1. Inclusion des patients dans l'étude.....	127
---	-----

2. Prélèvements sanguins .....	127
--------------------------------	-----

3. Prélèvements de glandes salivaires accessoires .....	128
---	-----

4. Quantification des ILC par cytométrie en flux sur cellules mononucléées du sang périphérique et cellules de glandes salivaires accessoires digérées .....	128
--	-----

4.1. Prélèvements sanguins et isolement de cellules mononucléées du sang périphérique .....	128
---	-----

4.2. Digestion de glandes salivaires accessoires .....	129
--	-----

4.3. Identification et quantification des ILC par cytométrie en flux .....	129
--	-----

5. Analyse et quantification des ILC en microscopie par immunofluorescence sur coupes glandes salivaires accessoires.....	130
---	-----

5.1. Inclusion de glandes salivaires accessoires en paraffine et coupe au microtome ....	130
--	-----

5.2. Sélection des coupes analysées et classification de la sévérité des infiltrats .....	131
---	-----

5.3.	Immunomarquages des ILC et acquisition au microscope à fluorescence.....	131
5.4.	Quantification des ILC par infiltrat cellulaire de GSA .....	132
6.	Recueil des données cliniques et biologiques des patients .....	133
7.	Analyses statistiques .....	133
<b>C.</b>	<b>Article : “Alteration of innate lymphoid cell homeostasis mainly concerns salivary glands in primary Sjögren’s syndrome” .....</b>	<b>134</b>
	<b>TROISIEME PARTIE Repositionnement thérapeutique par une méthode transcriptomique dans le SJp.....</b>	<b>147</b>
<b>A.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>148</b>
<b>B.</b>	<b>Article : “Identification of new candidate drugs for primary Sjögren’s syndrome using a drug repurposing transcriptomic approach” .....</b>	<b>150</b>
	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>160</b>
1.	Intérêt thérapeutique des anticorps monoclonaux anti-CD3 et anti-BAFF dans le syndrome de Sjögren primitif chez la souris NOD .....	161
1.1.	BAFF : peut-on parler d’une nouvelle cible thérapeutique dans le SJp ? .....	161
1.1.1.	Ciblage de BAFF et déplétion B : un effet synergique ? .....	161
1.1.2.	Impact du blocage de BAFF sur les LT .....	163
1.2.	Traitement par anticorps anti-CD3.....	165
1.2.1.	Perspectives .....	167
1.3.	Intérêt d’un ciblage conjoint des LB et des LT dans le SJp.....	167
2.	Implication des ILC dans la physiopathologie du SJp .....	169
2.1.	ILC circulantes .....	169
2.2.	Mise en évidence des ILC et leurs sous-types au sein des glandes salivaires....	171
2.1.	Participation des ILC à l’initiation de la maladie.....	173
2.2.	Implication des ILC dans l’axe IL-7 – IL-7R (CD127) – Interféron ? .....	177

2.3. Les ILCs comme cible thérapeutique potentielle ? .....	180
3. Identification de nouvelles cibles thérapeutiques grâce à l'analyse transcriptomique de repositionnement thérapeutique .....	182
3.1. Limites d'une telle étude .....	182
3.2. Ciblage des interférons dans le SJP.....	184
3.3. Les inhibiteurs d'histones désacétylases .....	186
3.4. Les inhibiteurs de PI3K.....	191
3.5. Perspectives .....	192
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>193</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>216</b>

# Liste des tableaux, figures et annexes

## 1. Liste des Tableaux

Tableau 1. Critères de classification ACR/EULAR 2016. SJp reconnu si au moins 4 points et aucun critère d'exclusion .....	23
Tableau 2. Classification de Chisholm et Mason et focus score .....	25
Tableau 3. Connectivites et maladies auto-immunes pouvant être associées au SGS .....	27
Tableau 4. Anticorps utilisés en cytométrie en flux.....	130
Tableau 5. Anticorps utilisés en immunofluorescence.....	132

## 2. Liste des Figures

Figure 1. Principales étapes d'une biopsie de glandes salivaires accessoires <sup>6</sup> .....	24
Figure 2. Démarche diagnostique du SJp.....	26
Figure 3. Rôle de BAFF dans le SJp (d'après Nocturne et Mariette <sup>31</sup> ).....	46
Figure 4. Acteurs cellulaires du SJp.....	48
Figure 5. Mécanisme d'action des Ac anti-BAFF.....	62
Figure 6. Mécanisme de la thérapie immunomodulatrice de préservation de fonction des cellules pancréatiques $\beta$ dans le diabète de type 1 par un traitement par Ac anti-CD3 (D'après Waldron-Lynch and Herold <sup>169</sup> ) .....	64
Figure 7. Réalisation des flux salivaires stimulés. Photographie représentant le recueil de la salive des souris NOD, une fois anesthésiées et stimulées par l'injection de Pilocarpine68	
Figure 8. Flux salivaires stimulés.....	76

Figure 9. Vue et analyse microscopique de l'infiltrat inflammatoire des glandes salivaires sous-maxillaires des souris NOD.....	79
Figure 10. Vue et analyse microscopique de l'infiltrat inflammatoire des glandes salivaires sous-maxillaires des souris NOD après traitement .....	81
Figure 11. Sous-populations lymphocytaires circulantes lors du prélèvement intermédiaire des souris NOD.....	84
Figure 12. Sous-populations lymphocytaires au niveau de la rate, des ganglions pancréatiques, du sang et des glandes salivaires après traitement .....	88
Figure 13. Corrélations entre les résultats de cytométrie en flux au niveau des glandes salivaires et le focus score histologique chez les souris NOD traitées.....	90
Figure 14. Incidence du diabète dans les différents groupes étudiés .....	91
Figure 15. Stratégie d'identification des ILC et de leurs sous-types dans le sang.....	125
Figure 16. Conséquence du blocage de BAFF dans notre étude.....	165
Figure 17. Les ILC, de nouveaux acteurs dans la physiopathologie du SJp.....	169
Figure 18. Schéma dynamique de l'implication des ILC dans l'infiltrat glandulaire .....	176
Figure 19. Hypothèse du rôle des ILC dans la physiopathologie du SJp.....	178

### 3. Liste des Annexes

Annexe 1. Article The pipeline of targeted therapies under clinical development for primary Sjögren's syndrome: A systematic review of trials .....	216
Annexe 2. Score ESSDAI .....	224
Annexe 3. Score ESSPRI .....	227
Annexe 4. Score clinESSDAI .....	228

# Liste des abréviations

Ac	anticorps
ACK	Ammonium-Chloride-Potassium
ADN	Acide désoxy-ribonucléique
Ag	antigène
APC	Allophycocyanine
APRIL	A proliferation inducing ligand
B6	souris C57BL/6 ou Black6
BAFF	B-cell Activating Factor of the TNF Family
BCR	B-cell receptor
BGSA	biopsie de glande salivaire accessoire
BTK	tyrosine kinase de Bruton
BTKi	inhibiteur de BTK
CD	Cluster de Différenciation
CD40L	CD40 ligand
CHU	centre hospitalo-universitaire
ClinESSDAI	Clinical EULAR Sjögren's syndrome disease activity index
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	cellule présentatrice d'antigènes
CRTH2	chemoattractant receptor homologous molecule expressed on Th2 cells
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
Cy7	Cyanine 7
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole

EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique
EF 506	eFluor 506
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ESSDAI	EULAR Sjögren's syndrome disease activity index
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
Fas	First Apoptosis Signal receptor
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
FMO	Fluorescence minus one
FoxP3	Forkhead box P3
GATA3	GATA Binding Protein 3
Gg	ganglions
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GSA	glandes salivaires accessoires
HDAC	histone désacétylases
HDACi	inhibiteur d'HDAC
IFN	interféron
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
IL-17RB	récepteur B de l'IL-17
ILC	innate lymphoid cells, cellules lymphoïdes innées auxiliaires
I.P	intra-péritonéale
IQT	interquartiles
I.V	intra-veineuse
JAK	janus kinase
JAKi	inhibiteur de JAK

LB	lymphocyte B
lupus	lupus érythémateux systémique
LT	lymphocyte T
LTi	cellules lymphoid tissue inducer
NFκB	nuclear factor-kappa B
NHS	sérum de cheval
NK	natural killer
NOD	Non Obese Diabetic
PBMC	cellules mononucléées du sang périphérique
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pDC	cellules dendritiques plasmacytoïdes
PE	Phycoérythrine
PerCP	Peridinine Chlorophylle Protéine
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PI3Ki	inhibiteur de PI3K
PR	polyarthrite rhumatoïde
RE	réticulum endoplasmique
ROR	retinoic acid-related orphan receptor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT-qPCR	Reverse Transcription Quantitative PCR
SJ	syndrome de Sjögren
SJp	syndrome de Sjögren primitif ou primaire
Ssc	sclérodémie systémique
SVF	sérum de veau foetal

T-bet	T-Box Transcription Factor 21
TA	température ambiante
TACI	Transmembrane activator and calcium-modulator and cytophilin ligand interactor
TCR	T Cell Receptor
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
TFH	T follicular helper, LT folliculaire auxiliaire
Th	T helper, LT auxiliaire
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6
Trég	LT régulateurs
TS	témoins sains
V450	Violet 450

# INTRODUCTION

# A. Le syndrome de Gougerot-Sjögren primaire (SJp)

## 1. Généralités

Le syndrome de Sjögren primitif (SJp) est une épithélite auto-immune déclenchée par une activation de l'immunité innée, conduisant à une sécheresse oculaire, buccale et muqueuse, une fatigue, des douleurs et diverses manifestations systémiques<sup>1,2</sup>. Ces symptômes sont très invalidants et compromettent la qualité de vie des malades. Le SJp est caractérisé par une infiltration lymphoïde et une inflammation des glandes salivaires (sialadénite) et lacrymales (dacryoadénite), responsable de la sécheresse, et par la sécrétion de différents auto-anticorps (Ac). L'infiltration lymphoïde peut intéresser d'autres organes et la survenue d'un lymphome non hodgkinien est environ 14 fois plus fréquente chez ces patients que dans la population générale<sup>3</sup>. Le SJ peut être primitif ou associé à une autre maladie systémique (polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux disséminé, myopathies inflammatoires ou sclérodermie)<sup>4</sup>. La maladie est fréquente, si l'on prend en compte les formes primitives et associées : 0,1% de la population adulte, c'est à dire environ 50.000 malades en France. Il s'agit, par ordre de fréquence, de la deuxième maladie auto-immune systémique derrière la polyarthrite rhumatoïde (PR). Elle touche plus souvent les femmes avec un sex-ratio de 9 à 10 femmes pour 1 homme. Le pic de fréquence de la maladie se situe autour de 50 ans. Aujourd'hui, aucun traitement de fond n'a fait la preuve de son efficacité pour diminuer la sévérité des signes cliniques de la maladie. La meilleure compréhension de la physiopathologie complexe du SJp pourrait permettre la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux traitements pour les patients atteints de SJp.

## 2. Manifestations cliniques et biologiques

### 2.1. Diagnostic et critères de classification

Le SJP peut être évoqué face à diverses situations cliniques : syndrome sec, fatigue, arthromyalgies, gonflement parotidien, syndrome de Raynaud, polyarthralgies/arthritis chez une femme d'âge moyen ou devant d'autres complications systémiques. Le syndrome sec oculobuccal et ces différentes manifestations cliniques n'ont pas de caractère spécifique et peuvent se rencontrer dans de nombreuses autres pathologies. Il peut notamment se manifester par :

- une sécheresse buccale avec parfois des complications infectieuses (candidose...) et / ou dentaires (caries, déchaussement, gingivites...)
- une sécheresse oculaire, qui se complique parfois de kératite sévère.

Le syndrome sec peut être discret ou absent au cours des premiers mois de la maladie avec parfois même un hyperlarmoiement ou une hypersialorrhée.

Le syndrome sec peut également être lié à d'autres circonstances : vieillissement physiologique, carence œstrogénique post ménopausique, port prolongé de lentilles de contact, diabète déséquilibré, ou s'avérer iatrogène en cas, par exemple, de prise d'atropine, d'antidépresseurs, de neuroleptiques, de benzodiazépines, de bêtabloquants, ou d'inhibiteurs calciques...

Des critères de classification consensuels internationaux ACR/EULAR 2016 <sup>5</sup>, ont été établis pour permettre de faire un diagnostic de certitude, afin de pouvoir proposer le plus précocement possible un suivi et des mesures thérapeutiques adaptées. Ils ne sont toutefois pas validés pour un usage diagnostique même s'ils sont largement utilisés à cet effet.

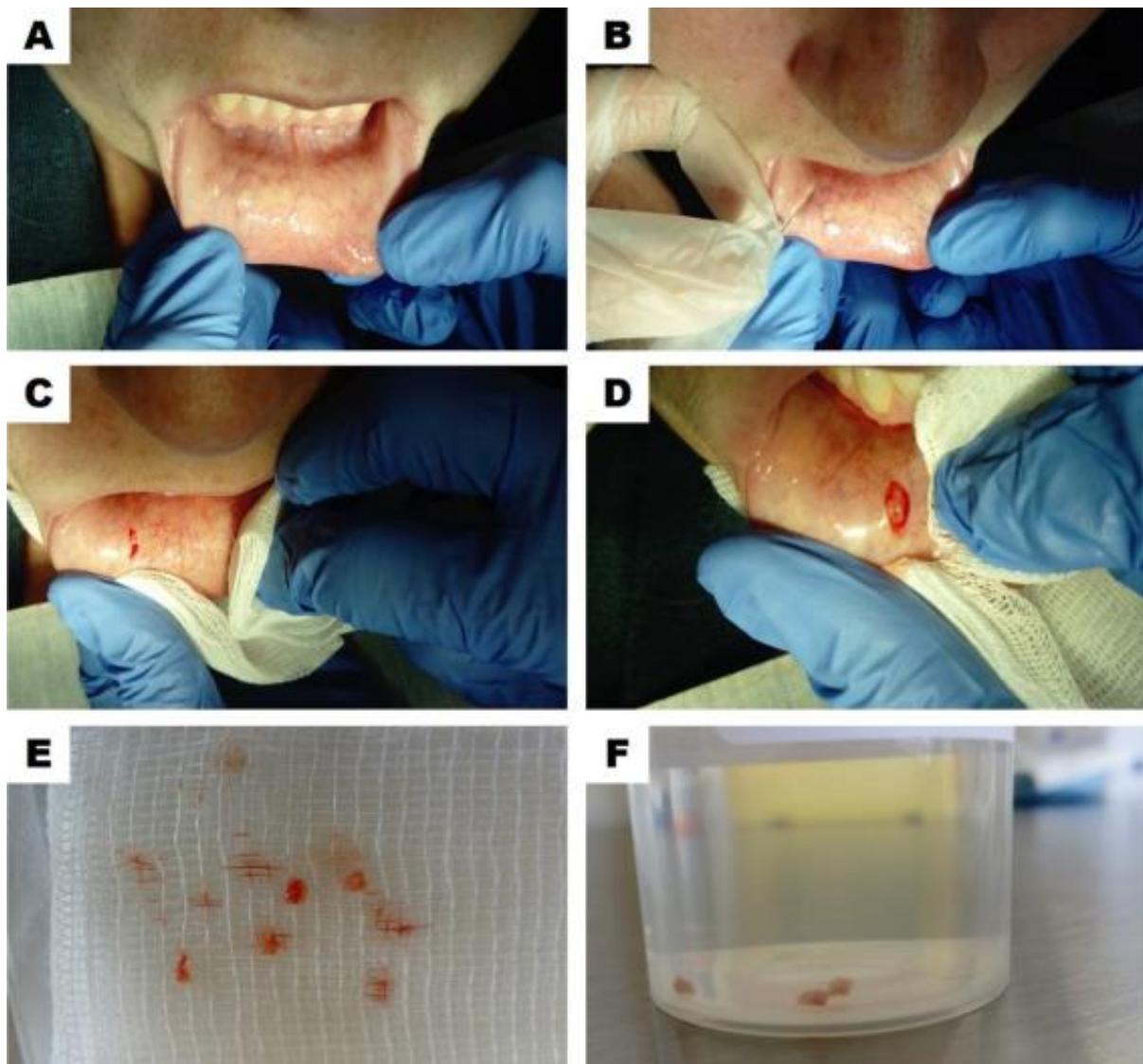
Ces critères, qui prennent en compte des paramètres cliniques, biologiques et histologiques, sont facilement utilisables en pratique courante, et permettent également d'éliminer les nombreux diagnostics différentiels d'un syndrome sec.

<b>Critères de classification du SJp : ACR/EULAR 2016</b>	<b>Pondération</b>
Sialadénite lymphocytaire avec focus score $\geq 1$ sur la biopsie de glandes salivaires accessoires et focus score $\geq 1$ foci/4mm <sup>2</sup>	3 points
Anticorps anti-SSA/Ro positif	3 points
Ocular Staining Score $\geq 5$ (ou score de van Bijsterveld $\geq 4$ ) pour au moins un œil	1 point
Test de Schirmer $\leq 5$ mm/ 5 min pour au moins un œil	1 point
Flux salivaire sans stimulation $\leq 0,1$ mL / min	1 point
<b>Critères d'exclusion</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Antécédent d'irradiation cervicale</li> <li>Infection par le VHC</li> <li>Infection par le VIH</li> <li>Sarcoïdose</li> <li>Amylose</li> <li>Réaction du greffon contre l'hôte</li> <li>Maladie associée aux IgG4</li> </ul>	

**Tableau 1. Critères de classification ACR/EULAR 2016. SJp reconnu si au moins 4 points et aucun critère d'exclusion**

Pour pouvoir utiliser ces critères, les patients doivent présenter au moins un symptôme de sécheresse oculaire ou orale ou présenter une complication systémique de la maladie. La présence d'un critère histologique ou biologique est indispensable. La présence d'anticorps anti-nucléaires sans spécificité ne constitue pas un critère diagnostique. Les anticorps anti-SSA (Ro) constituent le seul critère biologique parmi ces critères. Ils ne sont toutefois pas spécifiques du SJp. En effet, les anticorps anti-SSA (Ro) sont présents dans 50 à 80% des cas de SJp, mais aussi dans 30 à 40% des cas de lupus systémiques.

La biopsie des glandes salivaires accessoires (BGSA) est un examen peu invasif, réalisé en ambulatoire, le plus souvent par un ORL ou un stomatologue, mais aussi par tout praticien formé à cette technique. Après repérage des glandes salivaires accessoires (GSA) sur la lèvre inférieure, une anesthésie locale à la xylocaïne est réalisée. Une incision avec la pointe d'un scalpel permet ensuite de localiser les îlots glandulaires accessibles au prélèvement, puis 3 à 4 de ces îlots sont prélevés. La zone incisée doit ensuite être comprimée par le patient avec des compresses sèches pendant 5 min. Le plus souvent, il n'est pas nécessaire de réaliser de sutures.



*Figure 1. Principales étapes d'une biopsie de glandes salivaires accessoires <sup>6</sup>*

L'anatomopathologie de cette glande utilise le score de Chisholm et Mason (1968) <sup>7</sup> modifié par Greenspan <sup>8</sup> qui permet de quantifier l'importance de l'infiltrat lymphoplasmocytaire focal salivaire.

<b>Grade</b>	<b>Histologie</b>	<b>Focus score</b>
Grade 0	absence d'infiltrat	0
Grade 1	infiltrat minime	0
Grade 2	infiltrat moyen avec moins d'un un amas de plus de 50 lymphocytes par 4 mm <sup>2</sup>	< 1
Grade 3	un amas de plus de 50 lymphocytes par 4 mm <sup>2</sup>	1
Grade 4	plus d'un un amas de plus de 50 lymphocytes par 4 mm <sup>2</sup>	> 1

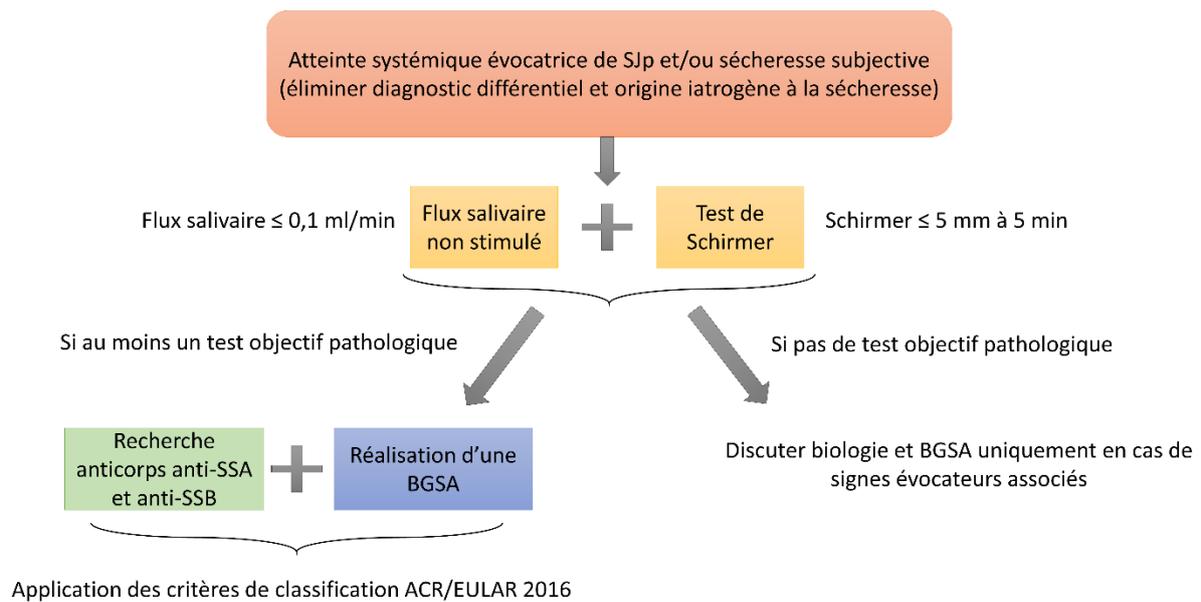
***Tableau 1. Classification de Chisholm et Mason et focus score***

Un foyer (ou focus) est un agglomérat d'au moins 50 cellules mononuclées (ou lymphocytes). Le focus score est le nombre de foyers par 4 mm<sup>2</sup>. Seuls les grades 3 et 4 sont hautement évocateurs de SjP, les grades 1 et 2 de Chisholm ne constituent pas une inflammation pathologique.

L'échographie des glandes salivaires semble être utile au diagnostic de SjP mais cette technique doit être validée sur des cohortes importantes avant d'être intégrée aux critères de classification.

En pratique, devant une symptomatologie évocatrice de SjP, l'interrogatoire permettra de rechercher un syndrome sec, si celui-ci n'est pas mentionné spontanément. L'existence d'un syndrome sec à l'interrogatoire doit faire réaliser dans un premier temps un test de Schirmer et une mesure du flux salivaire. En cas de syndrome sec avéré, un bilan biologique à la recherche

d'anticorps anti-SSA (Ro) / anti-SSB (La) doit être réalisé. D'autres anomalies biologiques, qui ne font pas partie des critères diagnostiques, sont fréquentes (vitesse de sédimentation accélérée liée à une hypergammaglobulinémie polyclonale, facteurs rhumatoïdes, cryoglobulinémie...). En l'absence d'anticorps anti-SSA (Ro) / anti-SSB (La), seul un grade 3 ou 4 de Chisholm à la BGSA permettra de porter le diagnostic de certitude.



**Figure 2. Démarche diagnostique du SJp**

Un SJ associé ou secondaire est diagnostiqué lorsque, en présence d'une maladie associée, des symptômes de sécheresse orale ou oculaire sont objectivés en plus du critère histologique (BGSA pathologique) ou immunologique (présence d'anticorps anti-SSA) des critères ACR/EULAR <sup>4</sup>.

<b>Connectivites :</b>
• Polyarthrite rhumatoïde
• Lupus érythémateux systémique
• Sclérodermie systémique
• Connectivite mixte
• Myopathies inflammatoires
<b>Maladies auto-immunes :</b>
• Cirrhose biliaire primitive
• Hépatite chronique active
• Thyroïdite auto-immune
• Anémie de Biermer
• Anémie hémolytique auto-immune
• Purpura thrombopénique auto-immun

***Tableau 3. Connectivites et maladies auto-immunes pouvant être associées au SGS***

L'association du SJ à une autre maladie auto-immune systémique (lupus, polyarthrite rhumatoïde, sclérodermie systémique,...) mérite d'être identifiée car le SJ et la maladie auto-immune associée peuvent mutuellement modifier leurs profils cliniques, biologiques et évolutifs <sup>4</sup>.

## 2.2. Risque de lymphome

### 2.2.1. Prévalence

Les patients atteints de SJp ont un risque accru de lymphome par rapport à la population générale <sup>9</sup>. Cette constatation est partagée avec diverses maladies auto-immunes telles que la

PR, le lupus et la maladie cœliaque, mais est plus élevée pour le SJp. Ce risque accru est observé à la fois pour les formes primaires (SJp) et associées du SJ<sup>10</sup>. Les estimations du risque de lymphome au cours de la vie varient d'environ 5 à 10%<sup>9,11</sup>, ce qui est de 7 à 15 fois plus élevé que celui de la population générale<sup>3,12-14</sup>.

### 2.2.1. Facteurs de risque

Certaines caractéristiques cliniques, histopathologiques et biologiques permettent d'identifier les patients atteints de SJp présentant un risque accru de développer un lymphome<sup>15</sup>. Ainsi, les principaux prédicteurs cliniques comprennent un gonflement permanent des glandes salivaires, une splénomégalie et des adénopathies, une atteinte cutanée et surtout une purpura vasculaire<sup>16</sup>. Les prédicteurs biologiques sont la cryoglobulinémie, la lymphopénie CD4, les niveaux bas de complément et une composante d'immunoglobuline (Ig) monoclonale dans le sérum ou les urines<sup>16</sup>. Le facteur rhumatoïde (FR) et l'activité systémique de la maladie évaluée par l'indice ESSDAI ont également été associés à un surrisque de développement du lymphome avec un effet dose<sup>17</sup>. La présence d'un focus score élevé et éventuellement de structures de type centre germinatif dans les BGSA, réalisées au moment de l'évaluation initiale du patient, est également prédictive du lymphome<sup>18-20</sup> et fournit une justification supplémentaire, autre que diagnostique, pour la réalisation d'une BGSA<sup>21</sup>.

En plus de ces facteurs prédictifs vérifiables en pratique clinique, diverses avancées significatives ont été réalisées dans la compréhension des mécanismes conduisant à la transformation du clone de lymphocyte B (LB). Ces facteurs permettent de mieux comprendre l'origine des lymphomes compliquant le SJp<sup>9</sup>.

### 2.2.2. Lymphomagénèse

Une stimulation chronique des LB autoimmuns peut être associée à une transformation maligne, à travers une série d'étapes impliquant le développement d'une population clonale et finalement une prolifération clonale incontrôlée <sup>9</sup>.

Les lymphomes de type MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) des glandes salivaires expriment fréquemment des récepteurs d'antigènes de LB avec une activité FR et se lient à l'IgG avec une forte affinité. Ainsi, une première étape de la lymphomagénèse dans le SJp pourrait être l'accumulation de complexes immuns conduisant à une stimulation continue de ces LB FR. Cette activation lymphocytaire B, si elle n'est pas complètement contrôlée, peut parfois évoluer vers le lymphome <sup>9</sup>.

La présence de structures lymphoïdes ectopiques dans les glandes salivaires est associée à un risque accru de lymphome. La sélection des LB en fonction de l'antigène a lieu physiologiquement dans les organes lymphoïdes secondaires, dans des structures définies comme des centres germinaux (CG), où se produit le processus de maturation des affinités par hypermutation somatique des portions variables des chaînes lourdes et légères variables des Ig et la commutation de classe <sup>22</sup>. Au cours du SJp, ces processus ont également parfois lieu dans les glandes salivaires qui deviennent des organes lymphoïdes tertiaires et offrent un environnement favorable à l'activation lymphocytaire B d'abord polyclonale puis à la transition vers le lymphome.

Cette néogénèse lymphoïde salivaire et le lymphome sont associés au polymorphisme du gène du récepteur de la chimiokine C-X-C de type 5 (CXCR5), un récepteur unique pour la chimiokine CXCL13 associée aux centres germinatifs <sup>23</sup>.

Le lymphome a également été associé à d'autres polymorphismes génétiques, tels que le gène A20 (codé par le gène TNFAIP3) qui est régulateur de l'activation de NFκB dont l'expression est diminuée dans le SJp <sup>24,25</sup>.

Les cytokines favorisant la stimulation des LB pourraient également être impliquées dans la lymphomagenèse. Compte tenu de son rôle dans la physiopathologie du SJp <sup>26</sup> et dans certains lymphomes sans lien avec les maladies auto-immunes, le facteur d'activation des cellules B de la famille des facteurs de nécrose tumorale (BAFF, aussi appelé BLyS pour B lymphocyte stimulator) pourrait également participer au développement d'un lymphome chez les patients atteints de SJp <sup>9</sup>. Dans le SJp, les taux de BAFF sont plus élevés chez les patients développant un lymphome ou ayant un antécédent de lymphome que chez les patients n'ayant jamais eu de lymphome <sup>27</sup>. En outre, les taux de BAFF sont corrélés avec l'activité de la maladie et sont associés à l'expansion des LB clonaux <sup>28</sup>. On a constaté que les taux de BAFF restaient augmentés chez les patients atteints de SJp, même des années après le traitement et la rémission du lymphome <sup>27</sup>. Par conséquent, les taux sériques de BAFF pourraient ne pas être directement liés au lymphome mais être augmentés en raison d'une perturbation génétique.

Récemment, notre équipe a également découvert que la tyrosine kinase de Bruton (BTK) était associée de manière indépendante au risque de lymphome du SJp <sup>29</sup>. Les gènes de BTK et d'APRIL (a proliferation-inducing ligand) ont été trouvés surexprimés avant l'apparition d'un lymphome chez les patients atteints d'un lymphome incident par rapport aux patients sans lymphome à partir de la cohorte ASSESS. Dans les analyses de sensibilité, l'expression de BTK était significativement augmentée dans toutes les comparaisons effectuées. L'expression de BTK était également associée au risque de lymphome dans les analyses multivariées prenant en compte 9 facteurs prédictifs validés de lymphome dans le SJp <sup>29</sup>.

### 3. Prise en charge actuelle

#### 3.1. Traitements symptomatiques

Le traitement reste avant tout symptomatique car aujourd'hui, aucun traitement de fond n'a fait la preuve de son efficacité pour diminuer la sévérité des signes cliniques de la maladie. On recommande un suivi dentaire, et ophtalmologique régulier pour dépister et traiter les éventuelles complications du syndrome sec (kératite, parodontite, déchaussement...). Un traitement symptomatique à base de sialagogues, de gommes à mâcher, de collyres, de bouchons lacrymaux, de lentilles sclérales, peut apporter un soulagement efficace du syndrome sec. L'usage du chlorhydrate de pilocarpine, analogue muscarinique peut s'avérer, en l'absence de contre-indication, utile pour lutter de façon globale contre la sécheresse. Ce traitement doit être introduit de façon progressive pour favoriser sa bonne tolérance.

#### 3.2. Traitements systémiques

L'hydroxychloroquine (PLAQUENIL®) est souvent utilisée. Un essai randomisé n'a pourtant pas montré de différence d'efficacité, à 24 semaines, entre ce traitement et un placebo, sur la sécheresse, la douleur et la fatigue <sup>30</sup>.

L'usage d'une corticothérapie n'apporte pas de bénéfice au patient en dehors de situations rares de complications systémiques où un avis d'expert peut statuer en sa faveur.

De même, l'utilisation (hors AMM) de traitements immunosuppresseurs (méthotrexate, léflunomide, rituximab, cellcept...) ou d'Ig intra-veineuses est parfois justifiée par une atteinte systémique sévère.

## 4. Physiopathologie

### 4.1. Généralités

La physiopathologie du SJp est un processus en plusieurs étapes, déclenché par un facteur environnemental, très probablement viral, chez un individu génétiquement prédisposé. Les événements initiaux mettent en jeu le système immunitaire inné, mais la propagation et la perpétuation du processus auto-immun nécessitent une interaction entre les systèmes immunitaires inné et adaptatif <sup>31</sup>. Il en résulte une stimulation des LB autoréactifs, une production d'auto-anticorps (Ac) et une inflammation chronique des glandes salivaires et lacrymales.

### 4.2. Modèles murins

L'étude du SJp et de sa physiopathologie est facilitée par l'existence de modèles murins de cette maladie <sup>32</sup>.

#### 4.2.1. La souris NOD

La souris NOD (Non-Obese diabetic) est un modèle utile pour étudier la sécheresse buccale, les cellules épithéliales salivaires, les interactions lymphocytaires et le rôle des cytokines à l'origine du développement de l'exocrinopathie <sup>33</sup>. En effet, les souris NOD, qui développent un diabète chez 10 à 20% des mâles et 60 à 80% des femelles (bien que toutes les souris développent une insulite), développent également une sialadénite et une dacryoadénite. Elles ont un flux salivaire décroissant significativement avec l'âge dans les deux sexes et ce même en l'absence de diabète <sup>34</sup>. Les analyses des sous-populations lymphocytaires infiltrant les tissus exocrines de ces souris ont montré un profil similaire à ceux de patients atteints de SJp : prédominance de lymphocytes T (LT), CD4<sup>+</sup> par rapport aux LT CD8<sup>+</sup> et aux LB <sup>35</sup>. Enfin ces

souris ont des taux augmentés de cytokines au niveau de leurs glandes salivaires pouvant être responsables d'une cascade d'événements initiant ou accélérant le processus de sialadénite auto-immune : élévation d'IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-10, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ . La découverte de taux augmentés des mêmes cytokines dans la maladie chez l'Homme renforce encore l'intérêt d'un tel modèle murin pour étudier le SJp<sup>33</sup>. En outre, de nombreux auto-Ac associés au SJp, tels que l'anti-SSA/Ro, l'anti-SSB/La et l'anti-muscarinique de type 3, sont présents dans le sérum des souris NOD<sup>36</sup>.

#### 4.2.2. Autres modèles murins

Il existe divers autres modèles murins de SJp, génétiquement prédisposés à développer la maladie ou induits.

##### 4.2.2.1. Modèles génétiquement prédisposés

Outre les nombreuses souches dérivées de la souche NOD, il existe plusieurs modèles génétiquement prédisposés à développer un SJp.

##### *Souris NZB/W F1*

Les souris NZB/W F1 développent une maladie similaire au lupus en plus d'une maladie s'apparentant au SJp. Ce modèle de souris reproduit donc la présentation clinique d'un SJ associé à une autre maladie auto-immune telle que le lupus<sup>37</sup>.

##### *Souris NFS/sld*

Les souris NFS/sld portent une mutation entraînant un arrêt de la différenciation des cellules acineuses de la glande sublinguale, ce qui conduit à une maladie similaire au SJp en cas de thymectomie à 3 jours de vie<sup>38</sup>.

### *Souris IQI/Jic*

Les souris IQI/Jic développent spontanément une maladie similaire au SJp avec des infiltrats lymphocytaires dans les glandes salivaires <sup>39</sup>.

### *Souris Aly/aly*

Les souris Aly/aly ne possèdent ni ganglions lymphatiques ni plaques de Peyer et présentent une infiltration chronique de cellules immunitaires dans plusieurs organes, y compris les glandes salivaires et lacrymales <sup>40</sup>.

### *Souris Ar KO*

Les souris Ar KO, déficientes en aromatase, une enzyme nécessaire à la catabolisation en œstrogènes, développent des manifestations auto-immunes spontanées similaires au SJp <sup>41</sup>. La carence en œstrogènes entraîne spontanément des phénotypes de type SJp chez ces souris. Des études avaient déjà démontré l'implication des œstrogènes dans le SJp et l'existence de récepteurs aux œstrogènes au sein des glandes salivaires <sup>42,43</sup>. Les hormones féminines semblent jouer un rôle important dans la survie des cellules épithéliales pouvant, en partie, expliquer la surreprésentation des femmes d'âge mûr, en péri-ménopause, dans l'épidémiologie du SJp.

### *Souris transgéniques RbAp48*

Les souris transgéniques RbAp48 surexprimant le gène RbAp48 développent une exocrinopathie auto-immune similaire au SJp <sup>44</sup>. La protéine 48 associée au rétinoblastome (RbAp48) est une protéine multifonctionnelle qui se lie à des facteurs de transcription et à des kinases pour contrôler la croissance cellulaire et l'apoptose.

### *Souris Id3 KO*

Id3 est un membre de la famille des facteurs de transcription bHLH (basic-helix-loop-helix), impliqué dans la sélection des LT et LB au cours du développement lymphocytaire. Les souris Id3 KO développent une infiltration lymphocytaire dans les glandes exocrines, une réduction de la sécrétion de salive et de larmes et une production d'auto-Ac similaire au SJp<sup>45</sup>.

### *Souris PI3K KO spécifique des cellules T*

La phosphoinositide 3-kinase (PI3K), membre de la famille des kinases lipidiques impliquée dans diverses fonctions cellulaires, catalyse la production de phosphoinositides triphosphorylés et sert de second messager en aval de nombreux récepteurs cellulaires. Les souris ayant une inactivation spécifique de PI3K dans les LT développent une maladie similaire au SJp caractérisée par une infiltration lymphocytaire des glandes lacrymales et une sécrétion de larmes altérée<sup>46</sup>.

### *Souris TSP-1 KO*

La thrombospondine-1 (TSP-1) est une protéine de matrice extra-cellulaire qui active le facteur de croissance transformant (TGF)- $\beta$ . Les souris TSP-1 KO développent une maladie similaire au SJp avec une augmentation de l'apoptose des cellules épithéliales, des infiltrats lymphocytaires dans les glandes lacrymales, une sécrétion altérée des larmes et une production d'auto-Ac<sup>47</sup>.

### *Souris ERdj5 KO*

Le réticulum endoplasmique (RE) est l'usine de traitement des protéines, responsable de leur transformation, de leur repliement et de leur transport. La protéine chaperonne ERdj5, une protéine résidant dans le RE et contenant des domaines DnaJ et thiorédoxine, est nécessaire à la translocation des protéines mal repliées au cours de la dégradation des protéines associée au

RE. Les souris ERdj5 KO développent spontanément des caractéristiques similaires au SJp avec une infiltration des glandes salivaires, une sécrétion altérée de salive et une production d'auto-Ac<sup>48</sup>.

#### *Souris Act1 KO*

Act1 joue un rôle important dans l'homéostasie des cellules B en régulant négativement la signalisation médiée par CD40 et BAFF. Les souris Act1 KO développent une maladie auto-immune systémique avec une infiltration lymphocytaire des glandes lacrymales, une sécrétion altérée des larmes et une production d'auto-Ac<sup>49</sup>.

#### *Souris BAFF-tg*

BAFF est un membre de la superfamille TNF qui agit comme un puissant régulateur de la survie et de la prolifération des cellules B. Les souris BAFF-tg surexprimant BAFF développent des symptômes auto-immuns systémiques avec une hyperprolifération des cellules B, une néphrite et une infiltration lymphocytaire conduisant à une diminution de la production de larmes et de salives mais ne produisent pas d'auto-Ac anti-SSA/Ro et anti-SSB/La<sup>50</sup>.

#### *Souris transgéniques HTLV-1 Tax*

Les souris transgéniques HTLV-1 Tax développent une pathologie similaire au SJp avec une prolifération de cellules épithéliales et une infiltration lymphocytaire dans les glandes exocrines<sup>51</sup>.

#### *Souris KO de STAT3 et IκB-ζ*

IκB-ζ est un membre de la famille des protéines nucléaires IκB qui régule l'expression des gènes en s'associant à NF-κB. Les souris KO en STAT3 et IκB-ζ présentent des phénotypes similaires

au SJp, avec une infiltration lymphocytaire dans les glandes lacrymales et une sécrétion altérée de larmes <sup>52</sup>.

#### 4.2.2.2. Modèles induits

##### 4.2.2.2.1. Modèles viro-induits

###### *Modèle murin induit par le cytomégalovirus murin (CMVM)*

Les souris infectées par le CMVM développent une sialadénite aiguë, et les souches prédisposées à l'auto-immunité présentent des symptômes similaires au SJp, suggérant une interaction entre l'infection virale et l'auto-immunité préexistante dans le développement de la maladie <sup>53</sup>.

###### *Modèle murin induit par l'adénovirus 5 (AdV5)*

L'administration d'AdV5 au sein des glandes sub-mandibulaires induit la formation de structures lymphoïdes ectopiques, l'infiltration de LT et LB, le développement d'auto-Ac et une diminution du débit salivaire, ressemblant à des caractéristiques du SJp <sup>54</sup>.

##### 4.2.2.2.2. Modèles induits par une immunisation par auto-antigènes

###### *Modèle murin induit par les protéines des glandes salivaires*

Les souris immunisées avec des extraits de glandes salivaires développent une infiltration de cellules lymphoïdes, des auto-Ac dirigés contre les protéines des glandes salivaires et une sécrétion réduite de salive, ressemblant au SJp <sup>55</sup>.

###### *Modèle murin induit par l'anhydrase carbonique II*

L'anhydrase carbonique II (CAII) est une  $\alpha$ -anhydrase carbonique humaine qui catalyse l'hydratation réversible du dioxyde de carbone. Bien que les auto-anticorps dirigés contre la

CAII soient une caractéristique de la pancréatite auto-immune, ils sont également associés à d'autres maladies auto-immunes, y compris le SJp. L'immunisation de souris avec de l'anhydrase carbonique II entraîne une infiltration lymphocytaire dans les glandes salivaires et lacrymales <sup>56</sup>.

#### *Immunisation par le récepteur muscarinique M3 (M3R)*

Le transfert de splénocytes de souris immunisées avec des peptides du M3R à des souris RAG1<sup>-/-</sup> entraîne une apoptose de leurs cellules glandulaires, une infiltration lymphocytaire et une sécrétion de salive altérée <sup>57</sup>.

#### *Modèle murin induit par le peptide Ro60*

L'immunisation de souris avec des peptides de Ro60 conduit à la production d'auto-Ac, à des infiltrats lymphocytaires dans les glandes salivaires, à une diminution du débit salivaire, ressemblant à certains aspects du SJp <sup>58</sup>.

Ainsi, on retrouve plusieurs modèles murins impliquant des voies de signalisation ou des cytokines dont le ciblage est actuellement en cours d'évaluation dans le SJp. Parmi elles, on citera notamment BAFF (souris Act1 KO et BAFF-tg), CD40 (Souris Act1 KO) et PI3K (souris PI3K KO) dont nous reparlerons un peu plus tard.

### 4.3.L'organe cible : les glandes salivaires

On peut également étudier la physiopathologie du SJp par l'accès à son organe cible, les glandes salivaires et notamment les glandes salivaires accessoires (GSA) par la réalisation de biospies superficielles peu invasives, BGSA.<sup>8</sup> Le dysfonctionnement glandulaire dans le SJp est présumé résulter d'une activation épithéliale induite par l'auto-immunité, des dommages et de la

distorsion architecturale du tissu glandulaire responsables de la diminution de la production de larmes et de salive. Toutefois, cette hypothèse n'est pas entièrement soutenue par deux observations. Premièrement, il existe une faible corrélation entre le dysfonctionnement glandulaire et le degré d'infiltration glandulaire <sup>59</sup>. Deuxièmement, le dysfonctionnement glandulaire peut être induit dans des modèles murins de SJP avant même l'apparition d'infiltrats lymphocytaires <sup>60</sup>. D'autres mécanismes peuvent ainsi contribuer au dysfonctionnement glandulaire, notamment les Ac dirigés contre le récepteur muscarinique qui peuvent altérer la synapse neuro-exocrine de la glande et les effets directs des cytokines sur la libération de neurotransmetteurs ou sur d'autres fonctions des cellules sécrétrices <sup>61</sup>.

La principale lésion pathologique du SJP est l'infiltration lymphocytaire des glandes salivaires et lacrymales. Les infiltrats sont constitués d'agrégats focaux de lymphocytes, qui commencent autour des canaux et s'étendent à l'ensemble du lobule <sup>62</sup>. La composition cellulaire de ces infiltrats dépend de leur gravité. Les LT, principalement CD4<sup>+</sup>, prédominent dans les infiltrats débutants, qui sont plus petits et respectent l'architecture de la glande. Les LB deviennent prédominantes dans les infiltrats plus importants et plus denses associés à la destruction des acini et à la perte de l'architecture tissulaire <sup>63</sup>. La migration des lymphocytes vers les glandes est le résultat d'une série d'événements, notamment une réponse aux chimiokines, l'adhésion à des molécules d'adhésion vasculaire spécifiques et l'entrée dans les glandes où ils interagissent avec les cellules dendritiques et les cellules épithéliales <sup>64</sup>.

## 4.4. Acteurs cellulaires et cytokiniques

### 4.4.1. Cellules épithéliales salivaires

Les cellules épithéliales des glandes salivaires ont la capacité de jouer un rôle actif dans l'initiation et le maintien de l'inflammation glandulaire. Leur rôle pivot dans la physiopathologie du SJP a conduit au concept d'« épithélite auto-immune » <sup>65</sup>. Les cellules épithéliales des

glandes salivaires, activées par l'interféron (IFN) de type I, l'IFN de type II, ou une infection virale, peuvent ainsi conduire aux éléments suivants :

- l'expression en surface des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, y compris l'antigène leucocytaire humain (HLA)-DR, et des facteurs de costimulation, y compris CD80, CD86 et CD40, leur permettant d'interagir avec les LT ;
- la libération dans l'épithélium salivaire de cytokines telles que BAFF<sup>66,67</sup>, interleukine (IL)-1, IL-6, TNF- $\alpha$  et IL-22<sup>68</sup>, qui sont cruciales pour les réponses immunitaires innées et adaptatives ;
- la promotion de l'infiltration des lymphocytes et des cellules dendritiques par la production de CXCL13 et d'autres chimiokines<sup>69</sup> ;
- la médiation de la libération d'antigènes intracellulaires (par exemple, Ro/SSA-La/SSB) par l'apoptose<sup>70</sup> et la libération d'exosomes, entraînant ainsi la génération de LB autoréactives.

#### 4.4.1. Immunité innée

##### 4.4.1.1. Signature interféron

La surexpression de gènes inductibles par l'IFN dans les glandes salivaires et les monocytes du sang périphérique des patients atteints de SjP (appelée signature IFN) souligne l'importance du système immunitaire inné dans sa physiopathologie<sup>71,72</sup>. Des dommages causés aux cellules épithéliales des glandes salivaires (par exemple par un déclencheur viral) induiraient l'apoptose et la migration de l'antigène SSA du noyau dans un complexe avec le petit ARN Y non codant humain (ARNh) à la surface de la cellule<sup>73</sup>. La molécule SSA échappe ainsi à la dégradation apoptotique normale. La présence d'anticorps dirigés contre les complexes SSA-ARNh favorise l'internalisation de ces complexes immuns par les cellules dendritiques et les LB, l'accès aux récepteurs Toll-like (TLR) intracytoplasmiques et l'activation des voies des IFN caractéristique du SjP<sup>74-76</sup>. Des niveaux élevés d'IFN de type I (principalement IFN- $\alpha$ ) ont été observés chez

les patients atteints de SjP. L'IFN favorise l'activation des LT, qui attaquent les tissus glandulaires. De plus, il induit une production accrue de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ . Enfin, l'IFN altère la fonction des cellules épithéliales des glandes salivaires et lacrymales, perturbant ainsi la sécrétion de salive et de larmes.

Récemment, nous avons cherché à caractériser les variations d'expression génique des patients atteints de SjP<sup>77</sup>. Pour cela, nous avons analysé les données transcriptomiques, cellulaires et génétiques de 351 patients atteints de SjP issus de la cohorte ASSESS, en les associant à leur phénotype clinique. Nos résultats ont montré une forte signature IFN chez plus de la moitié des patients, confirmée dans trois cohortes indépendantes. Nous avons également découvert que cette signature était principalement due à des niveaux circulants d'IFN- $\alpha$  plutôt qu'à l'IFN- $\gamma$ . Les niveaux d'IFN- $\alpha$  étaient associés à l'activité du SjP à l'inclusion et à une fréquence accrue de complications systémiques au cours du suivi de 5 ans. De plus, nous avons observé une association significative entre les niveaux d'IFN- $\alpha$ , un haplotype majeur d'histocompatibilité de classe II (MHC) et la présence d'anticorps anti-SSA. Nos analyses génétiques ont révélé que le locus HLA-DQ du MHC de classe II agit en stimulant l'expression de molécules HLA de classe II sur les cellules dendritiques conventionnelles. Ainsi, nous avons identifié l'IFN- $\alpha$  comme étant un acteur clé de la physiopathologie du SjP, avec une association entre l'IFN- $\alpha$  et les polymorphismes génétiques du gène HLA. Ces résultats améliorent notre compréhension de la maladie et confirment que l'IFN de type I pourrait être une cible thérapeutique prometteuse dans le SjP<sup>77</sup>.

#### 4.4.1.2. Cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) peuvent également être activées directement par des facteurs viraux ou d'autres facteurs environnementaux. L'activation du système IFN de

type I par le système immunitaire inné favorise les réponses immunitaires adaptatives par l'activation des LT et LB et l'induction de la production de cytokines.

#### 4.4.1.3. Cellules NK

Des données émergentes suggèrent que les cellules NK jouent également un rôle modulateur dans le SJp. Leur capacité à promouvoir l'inflammation et leur ratio altéré dans le sang périphérique des patients atteints de SJp indiquent, en effet, leur implication potentielle. Cela est démontré par l'induction du processus inflammatoire observé dans les glandes salivaires en réaction à la sécrétion d'IFN- $\gamma$  provoquée par l'interaction entre les cellules épithéliales et les cellules NK exprimant NKp30<sup>78</sup>. Une diminution de la fréquence et du nombre absolu de cellules NK dans le sang périphérique des patients atteints de SJp a été observée par rapport aux sujets sains<sup>79</sup>. De plus, il y avait une augmentation du ratio de cellules NK CD56<sup>bright</sup> / NK CD56<sup>dim</sup>, corrélée aux taux d'IgG sériques<sup>80</sup>. Ce ratio était négativement associé aux taux de complément C3 et C4, mais pas à l'indice ESSDAI chez les patients atteints de SJp. Ces résultats suggèrent que l'équilibre des sous-ensembles de cellules NK CD56<sup>+</sup> pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie de la maladie<sup>80</sup>.

#### 4.4.1.4. Innate lymphoids cells (ILC)

##### 4.4.1.4.1. Définition, classification et caractéristiques

Les cellules lymphoïdes innées auxiliaires (ILC) forment un groupe cellulaire appartenant à la classe des cellules lymphoïdes innées, dont font également partie les cellules NK et les cellules « lymphoid tissue inducer » (LTi). Elles se caractérisent par une morphologie lymphoïde mais une absence de récepteurs aux antigènes issus de réarrangements géniques<sup>81</sup>. Leur découverte est récente (2008-2011) et leurs caractéristiques, rôles physiologiques et implications en

pathologie ne sont que partiellement connus et restent encore le sujet de nombreux travaux de recherche <sup>82</sup>.

Les ILC sont subdivisées en 3 catégories, dont la classification est calquée sur la nomenclature des lymphocytes T auxiliaires, du fait d'une forte similitude entre ces types cellulaires, notamment concernant leurs facteurs de transcription et les cytokines qu'ils produisent. Les ILC1 expriment le « T-Box Transcription Factor 21 » (T-bet), sécrètent de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$ , et interviennent principalement dans l'immunité anti-tumorale et contre les bactéries intracellulaires. Les ILC2 expriment la « GATA Binding Protein 3 » (GATA3), produisent des IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13, et participent à la lutte contre les parasites, la réponse anti-allergique et la réparation tissulaire. Les ILC3 expriment le « retinoic acid-related orphan receptor gamma t » (ROR $\gamma$ t), sécrètent de l'IFN- $\gamma$ , de l'IL-17, de l'IL-22 et du «Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor » (GM-CSF), jouent un rôle dans la lutte contre les bactéries extra-cellulaires et sont probablement impliquées dans la formation de structures lymphoïdes secondaires et tertiaires <sup>83-85</sup>. Les 3 types cellulaires expriment la sous-unité  $\alpha$  du récepteur à l'IL-7, aussi appelé CD127. L'IL-7 favorise leur développement, leur survie et leurs fonctions <sup>86,87</sup>.

Les ILC résident principalement dans les tissus <sup>88</sup>. Si certains auteurs évoquent une migration des ILC dans les tissus durant la vie embryonnaire, puis une capacité d'auto-régénération locale, d'autres études suggèrent que les ILC peuvent être générées par hématopoïèse durant la vie adulte et migrer vers les tissus à partir de la circulation sanguine, en réponse à des stimuli inflammatoires tissulaires <sup>88</sup>. De plus, les ILC ont une capacité de plasticité, avec une possibilité d'évoluer d'un sous-type d'ILC à un autre au sein des tissus, selon les variations de l'environnement <sup>89</sup>.

#### 4.4.1.4.2. Fonctions immunitaires

Les ILC sont considérées comme les premiers effecteurs de l'immunité, car elles sont immédiatement présentes et fonctionnelles au sein des tissus, et peuvent sécréter rapidement et

massivement des cytokines <sup>90</sup>. Elles semblent jouer un rôle essentiel dans l'initiation, la régulation et la résolution de l'inflammation locale, en faisant un lien entre l'immunité innée et adaptative <sup>91</sup>. Elles sont activées par des médiateurs inflammatoires et alarmines libérées par des cellules épithéliales et myéloïdes, et interviennent dans le recrutement et l'activation d'autres cellules de l'immunité innée et adaptative, en sécrétant des cytokines ou en se comportant comme des cellules présentatrices d'antigènes <sup>92,93</sup>. Dans des conditions physiologiques, elles permettent le maintien de l'homéostasie tissulaire.

#### 4.4.1.4.3. Implication dans la physiopathologie de maladies inflammatoires

Lorsque les ILC sont exposées de façon chronique à des signaux inflammatoires, elles sont hyperactivées et dérégulées, et peuvent alors participer au développement de diverses pathologies <sup>94</sup>. De multiples données récentes démontrent leur implication, hétérogène, dans la physiopathologie de maladies inflammatoires chroniques, principalement par une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires <sup>95,96</sup>. De façon intéressante, leur rôle a été décrit dans plusieurs rhumatismes inflammatoires ou connectivites souvent associées au SJP, comme la PR, la sclérodémie systémique (SSc), ou le lupus <sup>96,97</sup>.

Contrairement à des pathologies comme l'asthme allergique ou la maladie de Crohn, dans lesquelles les ILC ont été précisément étudiées et même ciblées par des traitements en cours d'étude <sup>98</sup>, les données sur les pathologies auto-immunes systémiques restent principalement descriptives, et nécessitent des investigations complémentaires.

#### 4.4.1. Immunité adaptative

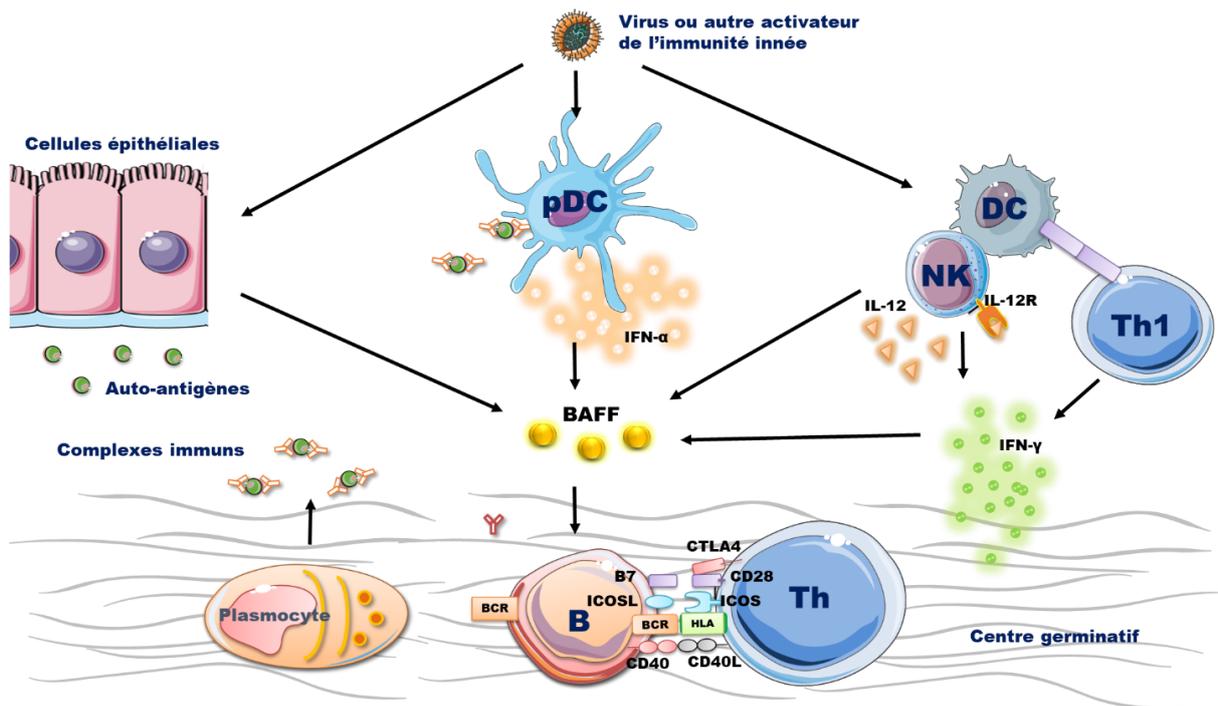
Un cycle de stimulation mutuelle des systèmes immunitaires innés et acquis conduit à la perpétuation des lésions et des dysfonctionnements glandulaires. Les lésions tissulaires sont provoquées par l'activation de ces voies immunitaires par les lymphocytes présents dans les

tissus glandulaires ou les sites extra-glandulaires, ce qui entraîne la libération de cytokines, notamment l'IFN- $\gamma$ , l'IL-17, BAFF, et d'autres, ainsi que la production d'auto-Ac caractéristiques. L'apoptose des cellules glandulaires et le dysfonctionnement des cellules épithéliales résiduelles et des tissus sont dus aux cytokines et aux métalloprotéinases qui interfèrent avec l'organisation et la fonction des glandes salivaires.

De multiples cytokines ont été identifiées dans le tissu des glandes salivaires et représentent des cibles thérapeutiques potentielles. Le profil cytokinique au sein des glandes salivaires des patients atteints de SjP est décrit comme un profil Th1, avec une production d'IL-2, d'IL-10 et d'IFN- $\gamma$  pro-inflammatoires par les cellules CD4<sup>+</sup> infiltrantes et parfois également Th17 avec production d'IL-17 par les cellules Th17 infiltrantes. En outre, les cytokines pro-inflammatoires, IL-1, TNF- $\alpha$  et IL-6, peuvent être sécrétées par les cellules épithéliales des glandes salivaires activées<sup>99,100</sup>.

#### 4.4.1.1. BAFF (B cell Activating Factor belonging to the TNF Family)

BAFF est considérée comme une cytokine clé dans le SjP. Elle est induite par l'IFN de type I et de type II et favorise l'activation, la prolifération et la survie des LB. Les taux de BAFF sont élevés dans l'épithélium des glandes salivaires et le sérum des patients atteints de SjP, et ces taux sont en corrélation avec ceux des anti-SSA/Ro, SSB/La et du FR<sup>26</sup>. BAFF est produite non seulement par les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques, mais aussi par les cellules épithéliales des glandes salivaires et les LB et LT. BAFF pourrait donc jouer un rôle important dans le développement de la maladie, agissant comme un lien entre l'activation du système immunitaire inné et le développement de l'auto-immunité par le système immunitaire adaptatif.



**Figure 3. Rôle de BAFF dans le SJp (d'après Nocturne et Mariette <sup>31</sup>)**

#### 4.4.1.2. Lymphocytes B

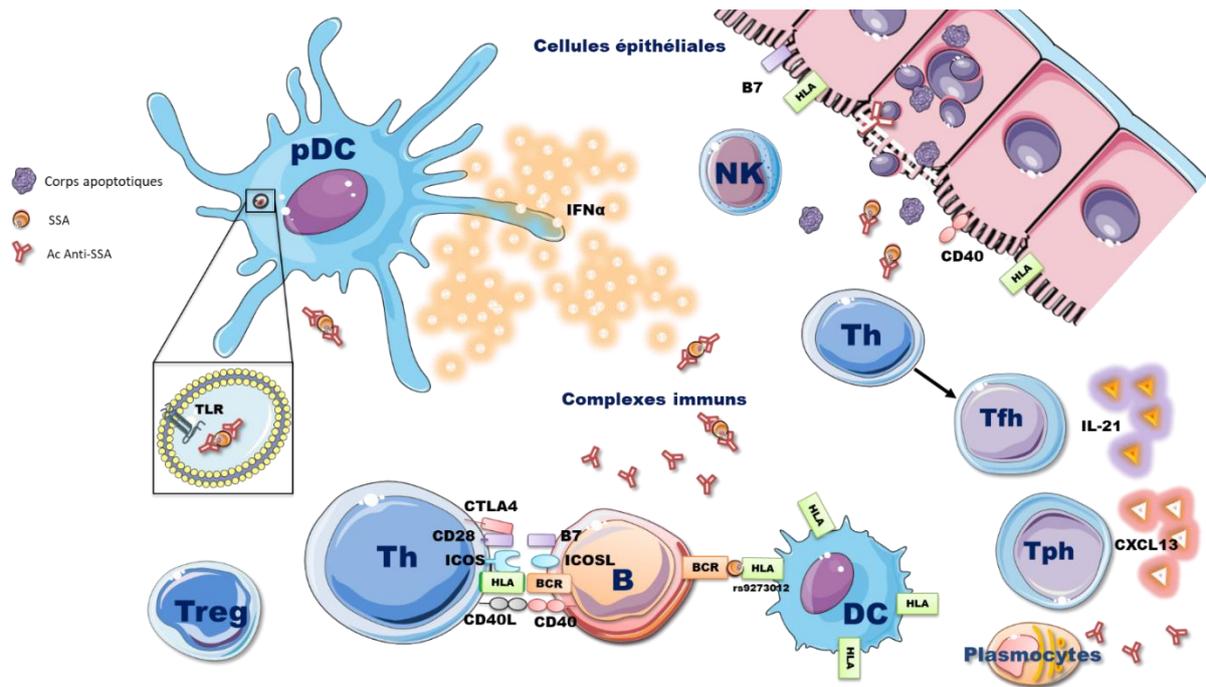
Au cours des maladies auto-immunes, les LB jouent un rôle crucial à travers la présentation d'antigènes (Ag), la sécrétion d'auto-Ac et de cytokines proinflammatoires. Le rôle pathogène du LB au cours du SJp est suspecté de longue date en raison de l'hypergammaglobulinémie polyclonale et de la sécrétion d'auto-Ac (facteur rhumatoïde, Ac anti-SSA/SSB notamment).

#### 4.4.1.3. Lymphocytes T

Les LT, qui représentent la population cellulaire la plus importante de l'infiltrat salivaire, jouent également un rôle pathogène important au cours du SJp. Selon le type d'étude (analyse des cytokines sériques par ELISA, des cytokines salivaires par PCR, des sous-populations lymphocytaires sanguines par cytométrie de flux ou des sous-populations lymphocytaires salivaires par immunohistochimie ou PCR), des résultats assez discordants ont été obtenus quant à l'implication préférentielle d'une sous-population lymphocytaire particulière (Th1, Th2 ou Th17 notamment) <sup>101</sup>.

Une attention particulière a été accordée au rôle d'un sous-ensemble de LT CD4<sup>+</sup>, appelées LT folliculaires auxiliaires (Tfh), dans la physiopathologie du SJp <sup>102</sup>. Les Tfh sont caractérisées par l'expression de CXCR5, PD1, ICOS et Bcl-6 <sup>103</sup>. Les patients atteints de SJp présentent des taux élevés de Tfh circulants et ces cellules sont facilement détectées dans les BGSA <sup>102</sup>. Il a été montré que la différenciation de LT auxiliaires en Tfh était induite par les cellules épithéliales salivaires de malades atteints de SJp. Ces Tfh produisent de l'IL-21 et contribuent à l'activation des LB, leur différenciation en LB mémoires et plasmocytes et leur production d'auto-Ac. Cette différenciation en Tfh, sous l'effet des cellules épithéliales salivaires, contribue également à la formation de centres germinatifs ectopiques au sein des glandes salivaires.

Depuis peu, on s'intéresse également aux LT auxiliaires périphériques (Tph). Elles représentent une population de LT qui stimulent les réponses des LB dans les tissus périphériques. Comme les LT folliculaires auxiliaires (Tfh), les cellules Tph CD4<sup>+</sup> PD-1<sup>hi</sup> CXCR5<sup>-</sup> produisent de l'IL-21 et du CXCL13, mais elles diffèrent des cellules Tfh par l'expression de facteurs de transcription et de récepteurs de chimiokines. Identifiées à l'origine dans la synoviale de la PR, les Tph semblent être importantes dans de nombreuses maladies auto-immunes <sup>104</sup>. Les cellules Tph infiltrent les tissus périphériques dans un contexte d'inflammation chronique <sup>105</sup>. Activées localement, elles produisent des niveaux très élevés de CXCL13, une chimiokine qui se lie à CXCR5 et conduit au recrutement des LB et Tfh et à la formation ultérieure de follicules lymphoïdes <sup>106</sup>. Une récente étude a montré que les Tph étaient enrichies dans le sang et les glandes salivaires accessoires des patients atteints de SJp par rapport à des sujets sains. Les cellules Tph circulantes étaient corrélées avec les scores d'activité de la maladie, ce qui suggère un rôle important des Tph dans la physiopathologie du SJp <sup>107</sup>.



**Figure 4. Acteurs cellulaires du SJp**

#### 4.4.1.4. Organes lymphoïdes tertiaires

Chez environ 30 à 40 % des patients atteints de SJp, les agrégats lymphoïdes glandulaires périductaux développent une structure très similaire aux organes lymphoïdes secondaires typiques, avec des follicules de LB entourés de zones riches en LT, de veinules à endothélium épais et de réseaux de cellules dendritiques folliculaires <sup>108,109</sup>. Ces structures lymphoïdes ectopiques favorisent la sélection par l'antigène de clones de LB, la commutation isotypique et la maturation d'affinité des immunoglobulines, et fournissent un micro-environnement propice à la production d'Ac dans le tissu cible <sup>110</sup>. Le développement de ces structures lymphoïdes ectopiques dépend de l'expression de la lymphotoxine- $\beta$  et des chimiokines lymphoïdes (par exemple, CXCL13, CCL19 et CCL21) par les LT, les LB, les cellules dendritiques et stromales au sein de l'infiltrat <sup>108-111</sup>.

La présence de ces centres germinatifs au sein des glandes salivaires de patients est corrélée à un surrisque de lymphome et probablement à une activité plus importante du Sjp<sup>18,112</sup>.

#### 4.5. Potentielles cibles thérapeutiques

J'ai effectué une revue systématique de toutes les thérapies ciblées en cours de développement clinique dans le SJP, dans les principaux registres en ligne d'essais cliniques<sup>113</sup> (**Article complet en annexe 1**). Cette recherche réalisée en 2018 a permis d'identifier 264 essais, parmi lesquels 25 thérapies ciblées pour le SJP avaient été incluses dans la revue. Les médicaments candidats avaient atteint la phase I (n=2), I/II (n=1), la phase II (n=19), la phase II/III (n=2) et la phase III (n=1). Les 23 essais correspondants étaient terminés (n=8), en cours de recrutement (n=6), terminés (n=4), actifs mais sans recrutement (n=4) et interrompus prématurément (n=1). A l'époque de l'analyse (2018), les molécules en cours de développement clinique pour le SJP ciblaient les LB (n=4), les LT ou la costimulation des LT/LB (n=5), les cytokines ou chimiokines inflammatoires et leurs récepteurs (n=5), les voies de signalisation intracellulaires (n=7) et d'autres cibles diverses (n=4). Depuis 2018, certaines autres cibles ont été évaluées, et sont également mentionnées.

##### 4.5.1. Traitements ciblant les LB

Les LB peuvent être ciblées sélectivement soit par des molécules exprimées directement à la surface des LB telles que CD20, soit par l'inhibition des facteurs de survie des LB tels que BAFF.

L'utilisation du rituximab, un anticorps chimérique anti-CD20, chez les patients atteints de SJP a fait l'objet de quatre essais contrôlés randomisés<sup>114-117</sup> qui n'ont montré aucune amélioration significative du critère d'évaluation principal composite ou de la fatigue ou de la sécheresse buccale dans les études les plus importantes<sup>116,117</sup>. Cependant, la plupart des experts s'accordent

à dire que le rituximab peut être utile pour le traitement de certaines manifestations systémiques du SJp, en particulier la vascularite cryoglobulinémique <sup>118,119</sup>.

Comme évoqué précédemment, BAFF est essentielle pour l'activation des cellules B auto-réactives, leur survie et la sécrétion d'auto-Ac <sup>120</sup>. Chez les patients atteints de SJp, BAFF est augmentée dans le sérum et les glandes salivaires et est sécrétée par les cellules épithéliales salivaires et celles de la conjonctive oculaire <sup>121</sup>. Le bélimumab, un Ac monoclonal spécifique anti-BAFF a obtenu son autorisation de mise sur le marché en février 2012 en association au traitement habituel, chez les patients adultes atteints de lupus systémique, avec une maladie active (définie par exemple par la présence d'Ac anti-ADN natif et par un taux de complément bas) malgré un traitement standard (antimalariques de synthèse, anti-inflammatoires non stéroïdiens, corticoïdes et/ou immunosuppresseurs, en fonction des atteintes spécifiques). Une étude ouverte de phase II a suggéré l'efficacité du bélimumab, chez 60 % des patients, évaluée par une amélioration d'au moins deux des cinq indicateurs de la maladie, notamment la sécheresse, la douleur, la fatigue, l'activité systémique et les biomarqueurs des LB <sup>122</sup>. Cependant, il n'y a pas eu d'amélioration significative du flux salivaire ou de la production de larmes, évaluée par le test de Schirmer.

Après traitement par rituximab, les taux sériques de BAFF ont augmenté lorsque les LB étaient déplétées de la circulation chez les patients atteints de SJp. Lorsque les LB réapparaissent, les taux de BAFF diminuent <sup>123</sup>. Étant donné le rôle du BAFF dans le SJp, l'association d'un traitement anti-BAFF et du rituximab pourrait conduire à une réduction prolongée des cellules B (autoréactives). Un traitement séquentiel par bélimumab suivi de rituximab ou leur co-administration pourrait donc être efficace <sup>124</sup>. La sécurité et l'efficacité de l'administration séquentielle de bélimumab par voie sous-cutanée et de rituximab par voie intraveineuse a récemment été évaluée dans une étude de phase II <sup>125</sup>. Dans cette étude en double aveugle sur une durée de 68 semaines, 86 patients adultes atteints de SJp actif ont été randomisés dans l'un

des quatre groupes : placebo, bélimumab sous-cutané, rituximab intraveineux ou bélimumab suivi de rituximab de manière séquentielle. Soixante patients ont terminé le traitement et le suivi jusqu'à la semaine 68. Une quasi-élimination des LB CD20<sup>+</sup> dans les GSA et une élimination plus importante et plus soutenue des cellules B CD19<sup>+</sup> périphériques ont été observées avec le traitement combiné bélimumab + rituximab par rapport aux monothérapies. La reconstitution des LB périphériques était retardée avec le bélimumab + rituximab par rapport au rituximab seul. Les scores moyens de l'indice d'activité systémique de la maladie du syndrome de Sjögren selon l'EULAR (ESSDAI, score complet en **Annexe 2**) ont diminué de manière significative avec le bélimumab + rituximab par rapport au placebo à la semaine 68. Le profil de sécurité du bélimumab + rituximab était similaire à celui des monothérapies par bélimumab et rituximab <sup>125</sup>.

Un autre traitement ciblant BAFF est en cours d'évaluation, le ianalumab (VAY736) un anti-BAFF-Récepteur <sup>126</sup>. Une étude de phase 3 est actuellement en cours après les résultats prometteurs de la phase 2b <sup>126</sup>. Cette étude de phase 2b randomisée, en double aveugle et contrôlée par placebo avait évalué l'efficacité et la sécurité de différentes doses sous-cutanées d'ianalumab chez des patients atteints de SJP modéré à sévère. Sur les 190 patients randomisés, une réponse significative en fonction de la dose a été observée pour l'activité globale de la maladie (score ESSDAI) dans quatre des cinq modèles de réponse aux doses testées. Le score ESSDAI a diminué par rapport à l'inclusion dans tous les groupes recevant l'ianalumab, avec la plus grande diminution observée dans le groupe ianalumab 300 mg : différence moyenne ajustée par rapport au placebo -1,92 points (IC à 95 % -4,15 à 0,32 ; p = 0,092). L'ianalumab a été bien toléré sans augmentation des infections <sup>126</sup>.

A noter que le tibulizumab, un anticorps bispécifique anti-BAFF et anti-IL17A a été évalué en phase II/III mais rapidement abandonné (sans aucun patient inclus).

#### 4.5.2. Traitements ciblant les Lymphocytes T ou la co-stimulation LT/LB

Deux signaux distincts sont nécessaires pour l'activation des LT. Le premier signal implique la liaison de l'antigène au récepteur de la LT. Le second signal se produit lors de l'interaction entre les paires récepteur-ligand sur les LT et les cellules présentatrices d'antigènes qui incluent les LB.

Au moment de notre recherche, 5 molécules ciblant les LT ou la co-stimulation des LB/LT avaient été évaluées dans le SJp : en phase II (n=4, 2 terminées, 1 active mais ne recrutant pas et 1 recrutant) ou en phase III (n=1, active mais ne recrutant pas).

L'interaction de la molécule CD80 ou CD86 sur les cellules B et de la molécule CD28 sur les LT fournit un deuxième signal co-stimulateur important pour l'activation des LT, qui est important pour la production ultérieure d'Ac par les LB. Une protéine de fusion constituée de CTLA4 et d'une chaîne d'immunoglobuline (CTLA4-Ig ou abatacept) se lie à CD80 ou CD86 avec une affinité plus élevée que CD28 et inhibe cette voie de costimulation. L'abatacept a été évalué dans le SJp dans deux études de phase III après deux essais ouverts de phase II <sup>127,128</sup>. Dans une première étude monocentrique portant sur 80 patients atteints de SJp, l'abatacept n'a pas réduit de manière significative l'activité systémique de la maladie évaluée par le score ESSDAI <sup>129</sup> par rapport au placebo après 24 semaines. La tolérance a été satisfaisante. Toutefois, une amélioration supplémentaire a été observée entre la semaine 24 et la semaine 48 du traitement par abatacept <sup>130</sup>. Les résultats à 48 semaines ont montré que chez les patients traités par abatacept pendant 48 semaines (n = 40), l'ESSDAI médian s'est amélioré, passant de 14,0 (IQR 9,0-16,8) à 4,0 (2,0-8,0) à la semaine 48 (p < 0,001), avec 50 % des patients atteignant une faible activité de la maladie (ESSDAI < 5) à la semaine 48. L'ESSPRI médian (score complet en **Annexe 3**), évaluant les symptômes rapportés par le patient (évaluation de la sécheresse, des douleurs et de la fatigue sur une échelle de 0 à 10) s'est amélioré de 7,0 (IQR

5,4-7,7) à 5,0 (3,7-6,7) ( $p < 0,001$ ). Une amélioration significative a également été observée au niveau de la sécheresse oculaire et des éléments biologiques. En combinant la réponse à plusieurs critères cliniquement pertinents, 73 % des patients étaient des répondeurs CRESS (Composite of Relevant Endpoints for Sjögren's Syndrome) <sup>131</sup> à la semaine 48 <sup>130</sup>. Dans la seconde étude de phase III, en double aveugle et contrôlée par placebo, multicentrique ayant inclus 187 patients atteints de SJP, malgré une activité biologique démontrée (diminution des Ig et du FR), le traitement par abatacept n'a pas montré d'efficacité clinique significative par rapport au placebo chez les patients atteints de SJP modéré à sévère, d'après les scores ESSDAI et ESSPRI <sup>132</sup>.

Une autre paire récepteur-ligand, CD40 (sur les LB) et CD40L ou CD154 (sur les LT), fournit également un signal de co-stimulation important pour l'activation des LT et LB. Le ciblage de CD40 perturbe ainsi cette voie de co-stimulation essentielle entre les LT et les LB pour la maturation des LB, la commutation isotypique et l'activation des LT. Le ciblage de CD40 peut également avoir un effet négatif sur l'activation des LB et des LT. Dans une étude multicentrique, l'iscalimab (CFZ533), un anti-CD40, intraveineux (10 mg/kg ; n=21) a réduit de façon significative l'activité systémique de la maladie (ESSDAI) par rapport au placebo (n=11) après 12 semaines, avec une différence moyenne entre les groupes de 5 à 21 points (IC à 95 % : 0-96-9-46 ;  $p=0-0090$ ) <sup>133</sup>. Le dazodalibep, un antagoniste du CD40L a montré des résultats intéressants dans une étude de phase II à la fois sur les symptômes systémiques évalués par le ESSDAI <sup>134</sup> ainsi que sur les signes subjectifs (ESSPRI) <sup>135</sup>, justifiant une phase III à venir. Les 74 sujets randomisés ont tous reçu au moins une dose du médicament à l'étude (dazodalibep, N=36 ; placebo, N=38). La variation du score ESSDAI entre le début de l'étude et le jour 169 était de  $-6,3 \pm 0,6$  chez les sujets traités avec dazodalibep, comparé à  $-4,1 \pm 0,6$  dans le groupe placebo, avec une différence de  $-2,2$  ( $p = 0,0167$ ).

Il a été démontré qu'ICOS et son ligand (ICOSL) jouent divers rôles dans les réponses des LT, comme la médiation de l'auto-immunité ainsi que l'amélioration du développement ou de l'activité des LT régulateurs (Trég). Le prézalumab, un anticorps anti-ICOS, et l'AMG 557, un anticorps anti-B7RP-1 (ICOSL), ont été évalués en phase II, avec des résultats négatifs.

Le lulizumab pegol est un anticorps monoclonal anti-CD28. Le CD28 est le corécepteur du récepteur des LT. Le lulizumab pégol a été évalué dans un essai de phase II qui a été interrompu prématurément.

L'éfalizumab est un anticorps monoclonal humanisé recombinant qui se lie au CD11a. L'éfalizumab a été évalué dans des maladies auto-immunes, dont le SJP, mais il a été associé à des infections cérébrales mortelles et a été retiré du marché en 2009.

#### 4.5.3. Traitements ciblant les structures lymphoïdes ectopiques

Le baminercept, une protéine de fusion du récepteur de la lymphotoxine- $\beta$ , a été testé dans une étude de phase II. Malgré une amélioration de l'ESSDAI significativement plus élevée dans le groupe baminercept qu'avec le placebo, le traitement par baminercept n'a pas été plus efficace que le placebo pour augmenter le flux salivaire ou réduire la sécheresse oculaire, et s'est accompagné d'un déséquilibre des élévations des transaminases et de 2 cas de lésions hépatiques de grade 3, réversibles <sup>136</sup>.

#### 4.5.4. Traitements ciblant les cytokines et leurs récepteurs

Au moment de notre recherche, 5 traitements ciblant les cytokines/chimiokines inflammatoires ou leurs récepteurs avaient été testés dans le SJP, en phase II (n=4, 3 achevés, 1 retiré) ou en phase II/III (n=1, actif mais ne recrutant pas).

Le TNF- $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire pléiotrope. La surexpression du TNF- $\alpha$  a été détectée dans les lésions glandulaires tant dans les modèles animaux de SJP que chez l'Homme<sup>99,137</sup>. Un essai contrôlé randomisé de phase II portant sur l'infliximab<sup>138</sup> et un autre sur l'éta nercept<sup>139</sup> n'ont montré aucune amélioration significative d'un critère de jugement primaire composite sur une échelle visuelle analogique (EVA) de la douleur articulaire, de la fatigue et de la sécheresse.

L'anakinra, un anticorps anti-IL1RA, a été testé dans un essai de phase II qui n'a pas atteint son critère de jugement principal<sup>140</sup>.

L'IL-6 est principalement sécrétée par les macrophages et les LT activés et est induite par d'autres cytokines telles que le TNF- $\alpha$  et l'IFN. Le taux sérique d'IL-6 est augmenté dans le sérum, la salive et les larmes des patients atteints de SJP<sup>141,142</sup>. L'IL-6 joue un rôle central dans l'activation des LB, ainsi que dans la différenciation des LT. Nous avons évalué le tocilizumab, un anticorps monoclonal humanisé recombinant anti-IL-6-Récepteur, dans une étude multicentrique de phase II/III en double aveugle versus placebo. Le tocilizumab n'était pas supérieur au placebo<sup>143</sup>.

Le traitement par de faibles doses d'IL-2 renforce sélectivement les fonctions des Trég<sup>144</sup> tout en évitant l'activation des LT effecteurs et pourrait donc améliorer l'inflammation immunitaire. L'administration de faibles doses d'IL-2 à des patients atteints de SJP a été testée dans une étude de phase II achevée (en attente des résultats cliniques).

Le GSK2618960 est un anticorps monoclonal humanisé de type IgG1 qui se lie au composant  $\alpha$  du récepteur hétérodimérique de l'Interleukine-7 (IL-7R ou CD127). La molécule a été évaluée dans une étude de phase II (arrêtée pour priorisation du portefeuille par le laboratoire).

#### 4.5.5. Traitements ciblant les interférons ou les voies de signalisation intracellulaires

Les IFN de type I émettant un signal par l'intermédiaire des JAK pour induire l'expression génique stimulée par l'IFN<sup>145</sup>, les inhibiteurs thérapeutiques des JAK sont apparus comme des médicaments potentiellement utiles dans le SjP. Le filgotinib, un inhibiteur hautement sélectif de JAK1<sup>146</sup>, a été testé dans un essai de phase II. Dans le même essai, deux autres bras évaluaient le GS-9876, un inhibiteur de la tyrosine kinase de la rate (Syk) et le tirabrutinib un inhibiteur de la tyrosine kinase de Bruton (BTKi). La Syk est impliquée dans la régulation de la voie TLR7/9 dans les pDCs humaines<sup>147</sup>. BTK est une tyrosine kinase cytoplasmique, non réceptrice, qui transmet des signaux provenant de diverses molécules de surface cellulaire, dont le récepteur des cellules B (BCR)<sup>148</sup>. Ces 3 médicaments aux mécanismes divers ont été testés, mais aucune différence significative n'a été observée par rapport au placebo en ce qui concerne les critères d'évaluation primaires ou secondaires<sup>149</sup>. Un autre BTKi, BMS-986142, a été testé dans une étude de phase II qui a été interrompue prématurément en raison d'une incapacité à atteindre les objectifs du protocole et du retrait du lulizumab testé dans un autre bras du même essai. Le remibrutinib, un troisième BTKi, a été évalué dans une étude de phase 2 en double aveugle, randomisée et contrôlée par placebo. Les résultats ont montré que le remibrutinib avait un profil de sécurité favorable. Il a entraîné une amélioration significative du score ESSDAI par rapport au placebo à la semaine 24 (delta ESSDAI  $-2.86$ ,  $P=0.003$ ), ainsi qu'une tendance à l'amélioration du débit salivaire non stimulé. De plus, les Ig ont diminué sous l'effet du traitement<sup>150</sup>.

MEDI7734, un anticorps anti-ILT7, cible les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) et a été testé dans une phase I. Les pDC produisent de l'IFN de type I après activation des récepteurs Toll-like (TLR). Les pDC humaines expriment préférentiellement le transcrit 7 de type Ig

(ILT7), qui se couple avec un adaptateur de signalisation pour activer une voie de signalisation importante médiée par le motif d'activation à base de tyrosine d'immunorécepteur (ITAM) <sup>151</sup>.

PI3k $\delta$  est une molécule de signalisation cruciale pour la fonction du récepteur 3 de BAFF <sup>152</sup>, deux études ont étudié les avantages potentiels d'une petite molécule inhibitrice sélective de PI3k $\delta$  : seletalisib <sup>153</sup> (phase II terminée, étude arrêtée prématurément en raison de difficultés de recrutement) et leniolisib (phase II terminée, résultats négatifs) <sup>154</sup>, sans succès.

#### 4.5.6. Traitements d'autres mécanismes d'action

L'iguratimod, une petite molécule utilisée comme nouveau médicament anti-rhumatismal modificateur de la maladie (DMARD) pour le traitement de la PR au Japon et en Chine, a montré une inhibition significative de la production d'Ig et une suppression de l'IL-1, de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$  <sup>155</sup> par la voie du NF $\kappa$ B <sup>156</sup>. L'iguratimod a été évalué dans un essai de phase I/II dans le SJp. L'iguratimod a amélioré les symptômes cliniques des patients atteints de SJp, y compris les indicateurs inflammatoires, la sécheresse (débit salivaire et test de Schirmer) et les indices de la maladie (ESSDAI et ESSPRI), lorsqu'il était co-administré avec une thérapie associant hydroxychloroquine et glucocorticoïdes sans augmenter les risques d'évènements indésirables <sup>157</sup>.

Le RSLV-132, une protéine biologique entièrement humaine de fusion Fc de la RNase humaine et du domaine Fc de l'IgG1 humaine, a été évalué dans une étude de phase II <sup>158</sup>. Le médicament est conçu pour rester dans la circulation et digérer l'ARN extracellulaire dans le but d'empêcher l'activation du système immunitaire via les récepteurs Toll-like et la voie de l'IFN <sup>159</sup>. Trente patients atteints de SJp ont été randomisés pour recevoir un traitement par RSLV-132 ou un placebo par voie intraveineuse une fois par semaine pendant 2 semaines, puis toutes les 2 semaines pendant 12 semaines. Huit patients ont reçu un placebo et 20 patients ont reçu RSLV-132 à une dose de 10 mg/kg. Les patients traités par RSLV-132 ont connu des améliorations

cliniquement significatives dans différents scores de fatigue mais pas dans le score ESSDAI. Cette amélioration de la fatigue a été significativement corrélée à une augmentation de l'expression de certains gènes inductibles par l'IFN<sup>158</sup>.

L'inhibition de la cathepsine-S in vivo modifie la présentation des auto-antigènes et le développement d'une auto-immunité spécifique à un organe<sup>160</sup>. Le RO5459072, un inhibiteur de la cathepsine-S<sup>161</sup>, a été évalué dans le cadre d'un essai de phase II, finalement négatif<sup>162</sup>.

Récemment, un essai portant sur la combinaison de léflunomide et d'hydroxychloroquine, deux agents peu coûteux au profil d'innocuité bien connu, a montré une synergie potentielle démontrée par une différence moyenne du score ESSDAI, ajustée selon les valeurs de référence, dans le groupe léflunomide-hydroxychloroquine par rapport au groupe placebo de -4,35 points (IC à 95% : -7,45 à -1,25,  $p = 0,0078$ ) ainsi que par la diminution marquée des taux d'Ig<sup>163</sup>. Auparavant, aucun des deux traitements n'était efficace à lui seul chez les patients atteints du SJp. Compte tenu de la taille limitée de l'échantillon de l'étude, l'efficacité clinique de cette association doit maintenant être confirmée par l'essai européen NECESSITY, actuellement en cours.

## B. Objectifs de la thèse

Malgré les avancées significatives dans la compréhension du SJP, nous avons besoin de nouveaux traitements pour améliorer la qualité de vie des patients. Dans cette optique, cette thèse vise à identifier de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques dans le SJP à travers des approches diversifiées. Ma thèse est ainsi divisée en trois parties, chacune explorant de manière différente de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

### 1. Recherche préclinique (souris NOD)

La première partie de cette thèse concerne une étude préclinique chez la souris. Elle vise à évaluer l'efficacité du ciblage thérapeutique du LB (anticorps monoclonal anti-BAFF) ou du LT (anticorps monoclonal anti-CD3) ou du ciblage conjoint du LB et du LT (anti-BAFF + anti-CD3) dans le modèle murin de SJP chez les souris NOD à la manière d'un essai thérapeutique (versus injection d'Ig contrôles).

### 2. Recherche translationnelle

La deuxième partie de cette thèse vise à approfondir notre compréhension du rôle et de la fonction des cellules lymphocytaires innées (ILC) dans la physiopathologie du SJP chez l'Homme. La participation du système immunitaire inné a longtemps été sous-estimée dans le SJP. Les ILC ont été découvertes récemment, et un nombre croissant de travaux décrivent leur implication dans d'autres pathologies inflammatoires et autoimmunes.

En analysant des échantillons sanguins et salivaires de patients atteints de SJP, j'ai cherché à déterminer si les ILC étaient impliquées dans la physiopathologie du SJP et pouvaient représenter une cible thérapeutique.

### 3. Repositionnement thérapeutique par une méthode transcriptomique

La dernière partie de cette thèse se concentre sur l'utilisation d'une méthode *in silico* de repositionnement thérapeutique. Les avancées récentes dans les technologies de séquençage à haut débit ont permis la génération de vastes ensembles de données transcriptomiques, fournissant des informations précieuses sur les voies moléculaires impliquées dans le SJP. En utilisant une approche bioinformatique, cette partie de la thèse vise à explorer ces ensembles de données transcriptomiques pour identifier des médicaments qui pourraient être repositionnés pour cibler les voies moléculaires perturbées dans le SJP.

# **PREMIERE PARTIE**

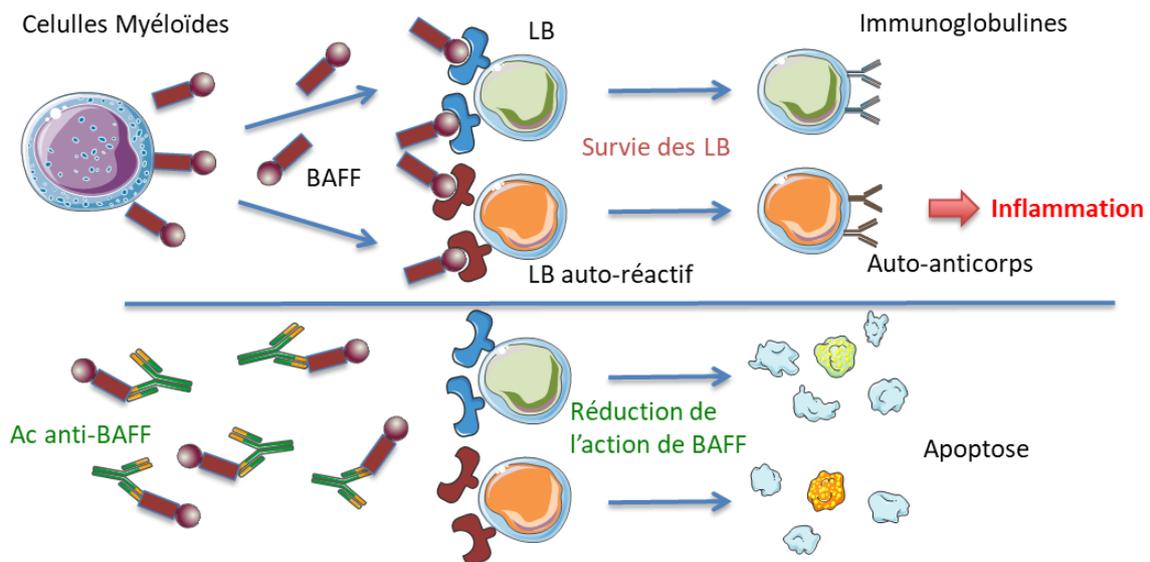
**Intérêt thérapeutique des  
anticorps monoclonaux anti-CD3  
et anti-BAFF dans le syndrome de  
Sjögren primitif chez la souris**

**NOD**

# A.Introduction

## 1. Ciblage de BAFF

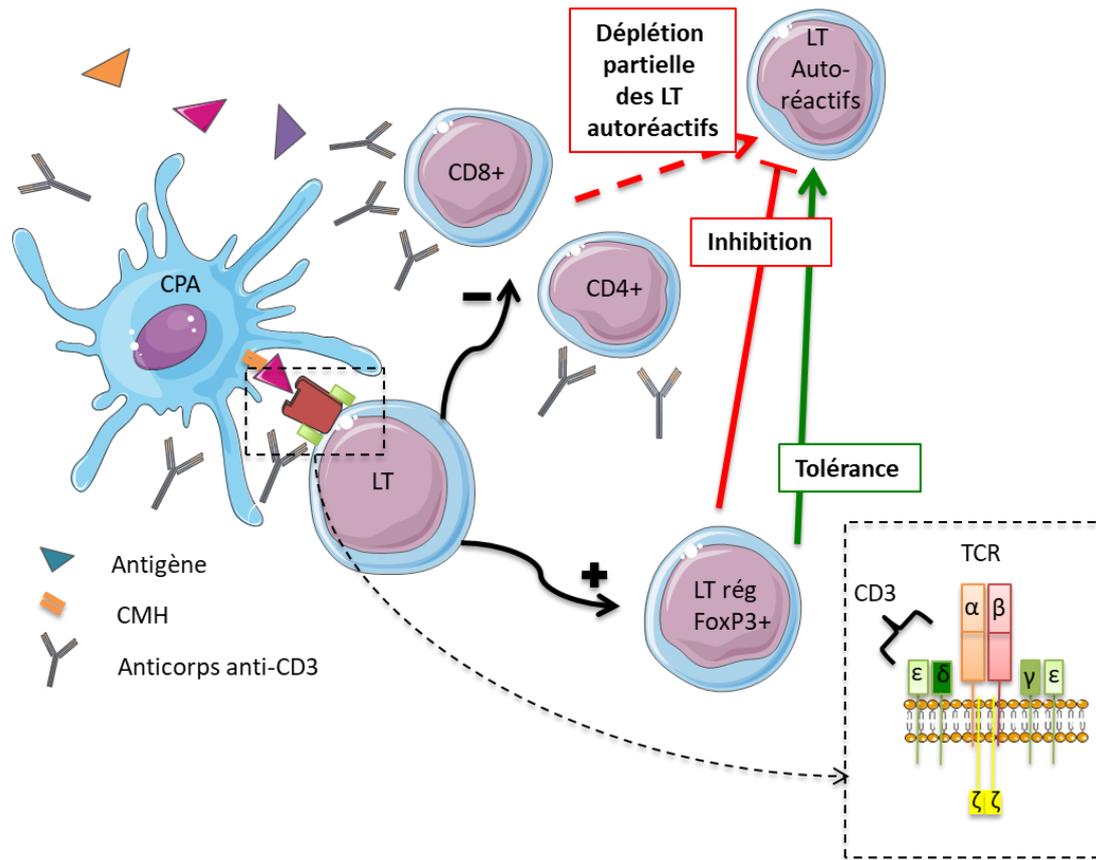
L'intérêt thérapeutique de l'inhibition de BAFF est toujours en cours d'évaluation dans le SJP. Comme évoqué précédemment, des données encourageantes, sur l'efficacité du bélimumab, ont été publiées dans un essai clinique ouvert <sup>122</sup>. Par ailleurs, il a été montré, chez les souris NOD, que l'induction par thérapie génique de la conversion de BAFF par saut d'exon en son antagoniste physiologique, delta-BAFF, dans les glandes salivaires, permettait d'améliorer la sécheresse, et de diminuer l'infiltrat salivaire <sup>164</sup>. Chez ces mêmes souris, la neutralisation de BAFF réduit l'insulite et prévient le développement du diabète <sup>165,166</sup>. Le mécanisme d'action des Ac anti-BAFF est représenté dans la **figure 5**. De nouveaux Ac anti-BAFF ont été développés, chez l'homme et la souris, pour leur action conjointe de ciblage de BAFF et de déplétion lymphocytaire B.



*Figure 5. Mécanisme d'action des Ac anti-BAFF*

## 2. Ciblage du LT

Les Ac ciblant la molécule CD3 (étroitement associée, à la surface du LT, au TCR, récepteur de la reconnaissance de l'antigène) représentent un mode d'inhibition des LT qui permet d'étudier à la fois l'intérêt thérapeutique de l'inhibition des LT et le rôle des cellules T régulatrices. En effet, le traitement par Ac anti-CD3 a montré une efficacité durable sur le contrôle du diabète de type I chez la souris NOD qui développe un diabète spontané <sup>167</sup> et chez l'Homme présentant un diabète de type I d'origine récente <sup>168</sup>. Ce traitement est en mesure de restaurer la tolérance immunitaire chez des souris récemment diabétiques. Ainsi, un traitement de courte durée (5 jours) par un Ac anti-CD3 administré à faibles doses chez des souris NOD, dans les 10 premiers jours de l'apparition des premiers signes de maladie (hyperglycémie, glycosurie), permet d'induire, en l'absence de toute administration d'insuline exogène, des rémissions durables de la maladie chez la plupart des animaux. Le mécanisme proposé est celui d'une diminution du nombre de LT pathogènes mais l'effet à long terme n'implique pas leur élimination mais plutôt l'induction d'une sous-population distincte de Trég (**Figure 6**). De plus, il est maintenant compris que de faibles doses (comme celles utilisées dans notre étude) entraînent une diminution de la réponse cellulaire T alors que des doses plus élevées conduisent à une déplétion T. L'efficacité des Ac anti-CD3 n'a jamais été évaluée sur la composante « Sjögren » de la souris NOD.



**Figure 6. Mécanisme de la thérapie immunomodulatrice de préservation de fonction des cellules pancréatiques  $\beta$  dans le diabète de type 1 par un traitement par Ac anti-CD3**

*(D'après Waldron-Lynch and Herold <sup>169</sup>)*

### 3. Ciblage conjoint du LB et du LT

Concernant l'intérêt de cibler conjointement LB et LT, il a été démontré chez les souris diabétiques NOD, qu'un traitement combiné par Ac anti-CD20 (ciblant les LB) + anti-CD3 (ciblant les LT) était plus efficace que chaque traitement pris séparément <sup>170</sup>. Cela souligne l'effet bénéfique d'un traitement combiné agissant sur ces deux acteurs physiopathologiques clés, au cours du diabète.

## 4. Objectifs de notre étude

Ainsi, pour les raisons évoquées précédemment, l'objectif de notre projet a été d'évaluer l'effet thérapeutique des Ac anti-CD3 et Ac anti-BAFF et l'effet potentiellement synergique de l'association de ces deux Ac chez la souris NOD, modèle murin spontané de SjP.

Dans un premier temps, le retentissement fonctionnel de la sialadénite a été comparé, par la mesure des flux salivaires stimulés des souris NOD et B6 de même âge afin de s'assurer de la diminution du flux salivaire chez les souris NOD. La sialadénite des souris NOD mâles et femelles à différents âges a également été comparée par histologie pour vérifier l'atteinte du modèle utilisé par la suite dans l'étude thérapeutique.

Dans un deuxième temps, nous avons comparé, les traitements par Ac anti-CD3, Ac anti-BAFF, un Ac contrôle isotypique de l'Ac anti-BAFF ou une combinaison des Ac anti-CD3 et anti-BAFF. Un groupe de souris NOD femelles a été traité par Ac anti-CD3 de façon plus tardive (entre leur 13ème et 21ème semaine de vie, dès lors qu'elles présentaient une glycosurie synonyme de diabète débutant) puis nous avons suivi l'évolution de leur flux salivaire au cours du temps.

Les méthodes et les résultats de ces premières investigations sont présentés ici dans les parties respectives B et C.

Enfin dans un troisième temps, nous avons traité davantage de souris par Ac anti-BAFF et analysé leur transcriptome après traitement en comparaison à des souris traitées par un Ac contrôle isotypique de l'Ac anti-BAFF. Les méthodes et les résultats sont contenus dans la partie D. Article : « *Efficacy of BAFF inhibition and B-cell depletion in non-obese diabetic mice as a spontaneous model for Sjögren's syndrome* » reprenant notre article soumis.

## B. Matériel et méthodes

### 1. Laboratoire et animaux

Les souris ont été issues de l'animalerie, exempte d'organisme pathogène spécifique, de l'Institut Necker Enfants Malades, grâce à la collaboration du Pr Lucienne Chatenoud et de son équipe, Immunorégulation et Immunopathologie, de l'hôpital Necker à Paris, qui dispose de ces souris et de l'expertise de l'utilisation de l'Ac anti-CD3 dans le diabète.

Au total, pour les deux premières parties de nos investigations, une soixantaine de souris ont été étudiées : 8 souris NOD traitées par Ac anti-BAFF, 8 par l'Ac contrôle isotypique, 6 par la combinaison Ac anti-BAFF + Ac anti-CD3, 5 par Ac anti-CD3 seul et des souris NOD femelles contrôles non-traitées. Sept souris NOD femelles traitées par anti-CD3 de façon tardive (entre 13 et 21 semaines d'âge) ont également été suivies, longitudinalement, afin d'évaluer l'évolution de leur flux salivaire. Enfin, 24 souris NOD mâles ont servi à une analyse histologique des glandes salivaires à différents âges. Cinq souris femelles C57BL/6 dites B6, issues de la même animalerie, ont servi de contrôles « non-auto-immuns ».

### 2. Traitement par anticorps anti-CD3 et anti-BAFF

L'Ac monoclonal anti-CD3 F(ab')<sub>2</sub> (hybridome 145 2C11 produisant une IgG de hamster spécifique pour la chaîne  $\epsilon$  du CD3 murin) et le protocole d'administration précédemment utilisés dans les études sur le diabète ont été utilisés dans notre travail. Cinq souris ont ainsi été traitées à 10 ou 11 semaines de vie par 50  $\mu$ g/jour en intra-veineux (I.V) d'Ac anti-CD3 pendant cinq jours consécutifs. Ce schéma d'administration permet d'induire une immunotolérance prolongée de plusieurs semaines avec seulement une dose I.V de cinq jours<sup>171</sup>. Sept souris NOD femelles ont également été traitées entre leur 13<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> semaine de vie dès lors

qu'elles développaient une glycosurie, synonyme de diabète débutant, par la même dose d'anti-CD3 et selon les mêmes modalités.

L'Ac anti-BAFF utilisé est une IgG1 de souris anti-BAFF bloquant (Sandy-2 commercialisé par Adipogen). C'est la première fois que cet Ac est utilisé dans une étude thérapeutique sur le SJp. Développé par le Dr Pascal Schneider, il a l'intérêt d'induire rapidement dans les souris de type sauvage, en plus de son effet bloquant pour BAFF, une lymphodéplétion B proche de celle des souris déficientes pour BAFF. Il possède également une demi-vie favorable et est entièrement d'origine murine. Une injection intra-péritonéale (I.P) à 2 mg/kg suffit à induire une déplétion des LB à J18. Pour une déplétion plus durable, des réinjections toutes les deux semaines sont nécessaires. Huit souris ont été traitées par une dose à 10 semaines puis toutes les 2 semaines de 2mg/kg I.P jusqu'à analyse. De la même manière, des injections de l'Ac contrôle de même isotype que l'Ac anti-BAFF, EctoD1 une IgG1 de souris anti-EDA (Ectodysplasin) non bloquant, à la même dose et selon le même schéma, chez 8 souris, ont été utilisées pour constituer un groupe contrôle.

Enfin, une combinaison des deux Ac, anti-CD3 et anti-BAFF selon les mêmes modalités mais de façon combinée, chez 6 souris de 10 ou 11 semaines a également été testée.

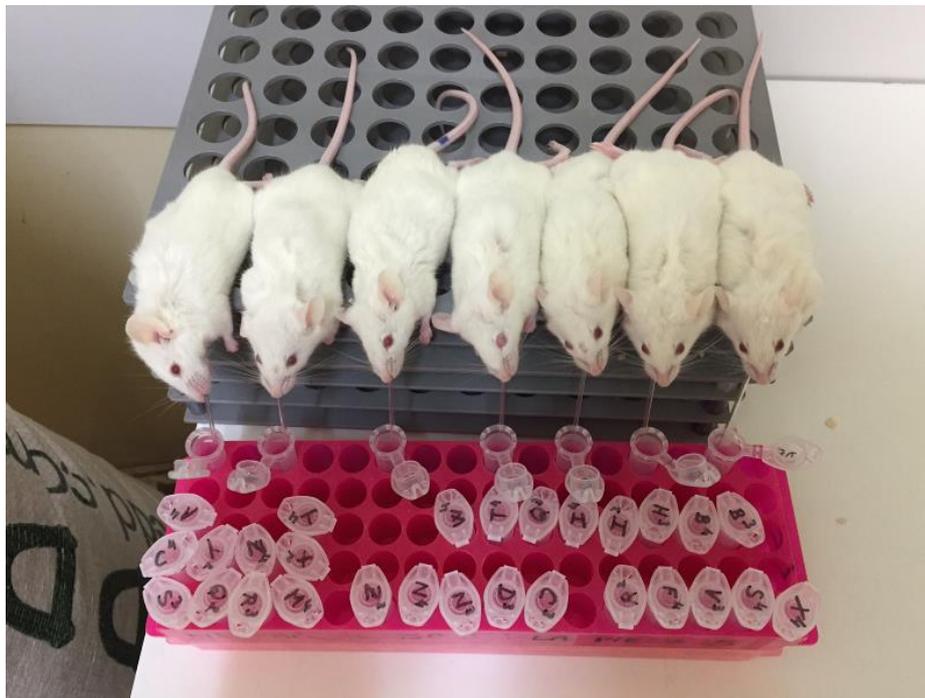
Le calendrier des injections a été décidé en fonction des études précédentes réalisées sur le diabète chez les souris NOD et par l'étude de l'inhibition de BAFF par saut d'exon chez la souris NOD dans le SJp<sup>164,167,170</sup>.

### 3. Flux salivaire stimulé

Les souris NOD et B6 ont été anesthésiées par une solution de Kétamine et Xylazine : 30 µL de Kétamine (Centravet, Maison-Alfort, France) à 100 mg/mL pour les NOD (en raison d'une plus grande sensibilité à l'anesthésie) et 40 µL pour les B6 à 100 mg/mL et 100 µL de Xylazine (Centravet) à 2% complétée à 1 mL par de l'eau stérile. Une dose de 100 µL de cette solution

pour 10 g de souris, par voie I.P, a alors été injectée. La sécrétion salivaire a été induite par l'injection sous-cutanée de Pilocarpine (5µg/10g de souris) après préparation d'une solution à base de Pilocarpine (Sigma-Aldrich®, Saint-Louis, Etats-Unis) en poudre, diluée dans de l'eau pure, de manière à obtenir une solution injectable à la concentration de 0,2 mg/mL. L'ensemble de la salive de la cavité buccale a été collecté par capillarité pendant une durée de 20 minutes, avec un tube à hématocrite (**Figure 7**). La quantité de salive a été déterminée par gravimétrie puis le flux salivaire stimulé a été exprimé en µL de salive/20 minutes/g de souris.

Des analyses intermédiaires ont été effectuées sur l'ensemble des souris aux différents âges, notamment à 10, 12 et 15 semaines puis avant sacrifice à 18/20 semaines pour les souris NOD traitées, à 2, 4, 6 et 12 semaines après traitement chez les souris NOD devenues diabétiques et traitées plus tardivement et à 8, 10, 12 et 15 et 18 semaines pour les souris B6.



*Figure 7. Réalisation des flux salivaires stimulés. Photographie représentant le recueil de la salive des souris NOD, une fois anesthésiées et stimulées par l'injection de Pilocarpine*

## 4. Analyse histologique

### 4.1. Sialadénite et focus score en hématoxyline-éosine

Les glandes salivaires de 25 souris NOD femelles et de 24 souris NOD mâles non traitées, ont été prélevées à différents âges (3, 7, 10, 15 et jusqu'à 38 semaines pour les femelles et jusqu'à 15 semaines pour les mâles) ainsi que celles des souris traitées (groupe contrôle isotypique n = 3, groupe anti-BAFF n = 4, groupe anti-CD3 n = 3, groupe traitement combiné n = 3 ; les deux tiers d'une des glandes prélevées lors du sacrifice ont servi à l'analyse histologique) afin de déterminer le niveau de sialadénite alors présent. Après le sacrifice des souris, les organes ont été prélevés et plongés dans une solution de PFA 4% pendant 24 heures à 4°C, minimum, et envoyés à la plateforme d'Histologie et de Morphologie du petit animal de la structure fédérative de recherche de l'hôpital Necker. Là-bas, ils ont été inclus en paraffine à l'aide d'un automate d'infiltration des tissus sous vide (ASP300S, Leica, Wetzlar, Allemagne) et d'une plaque d'inclusion (EC - 350, Microm France, Francheville, France). Les coupes ont ensuite été réalisées à l'aide d'un microtome (RM2145, Leica) à une épaisseur de 7 µm et disposées sur des lames Superfrost (Dutscher, Brumath, France). Deux lames par souris ont ensuite été colorées, à l'hématoxyline-éosine, par un automate (Shandon Varistan Gemini ES, Thermo Fischer Scientific, Asnières-sur-Seine, France). Le reste des lames servira à des marquages immuno-histochimiques ou en immunofluorescence réalisés ultérieurement.

Le score de sialadénite a alors été lu au microscope (Leica DM LS) aux grossissements x100 et x200, pour chaque souris : 0 : pas d'infiltrat, 1 : infiltrat minime, 2 : infiltrat modéré ou moins de 1 focus/4 mm<sup>2</sup>, 3 : 1 focus/4 mm<sup>2</sup>, 4 : plus de 1 focus/4 mm<sup>2</sup>. (1 focus = agrégats de plus de 50 lymphocytes), de même que le Focus score : nombre moyen de foci par 4 mm<sup>2</sup>. Une double lecture a été effectuée pour chaque souris dont la deuxième en aveugle des traitements reçus. La moyenne des deux a ensuite été utilisée pour l'analyse des résultats. Des photographies représentatives ont pu être prises à l'aide du microscope Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss, Marly

Le Roi, France) et du logiciel informatique Motic Images Plus 2.0 (Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Allemagne).

## 5. Analyse des sous-populations lymphocytaires en cytométrie en flux

### 5.1. Anticorps utilisés et analyse

Les Ac suivants ont été utilisés : CD45 APC-Cy7 (clone 30-F11, BioLegend, San Diego, Etats-Unis), CD19 FITC (clone 1D3, BD Pharmingen, San Diego, Etats-Unis), CD3e PerCp (clone 145-2C11, BD Pharmingen), CD4 V450 (clone RM4-5, BD Pharmingen), CD8a/Ly-2 PE (clone 53-6.7, eBioscience), CD138 PE (clone 281.2, BD Pharmingen) et IgD APC (11-26c2a, BD Pharmingen), Fixable Viability Dye EF506 ( eBiosciences), CD45.1 FITC (clone A20, BD Pharmingen), CD3e APC (clone 145-2C11, BD Pharmingen), CD4 V450 (clone RM4-5, BD Pharmingen), CD8a/Ly-2 PE (clone 53-6.7, eBiosciences), CD19 PE-Cy7 (clone 1D3, BD Pharmingen), CD4 PerCp (clone RM4-5, BD Pharmingen), FoxP3 APC (clone FJK-16S, eBiosciences), tous dilués au 1/200e sauf le Fixable Viability Dye au 1/1000e.

La proportion des sous-populations lymphocytaires B et T sanguines a été analysée à mi-traitement et au sacrifice afin d'évaluer les répercussions des traitements : la déplétion lymphocytaire B induite par l'anti-BAFF et la déplétion T induite par l'anti-CD3 notamment. La proportion des différentes sous-populations lymphocytaires des glandes salivaires, de la rate et des ganglions pancréatiques a été étudiée au sacrifice.

L'analyse des résultats a été réalisée grâce au logiciel FlowJo version 7.6.5 (TreeStar, Ashland, Oregon, Etats-Unis).

### 5.2. Préparation de la suspension cellulaire sur sang total

200 µL de sang ont été prélevés par ponction intra-orbitaire (analyse intermédiaire) ou ponction intra-cardiaque après anesthésie à l'Uréthane (600 à 800 µL I.P à la concentration de 75 mg/mL,

Sigma, au sacrifice), dans un micro-tube hépariné (Sanofi-Aventis, Paris, France). Les marquages ont été réalisés en y ajoutant alors le mélange d'Ac destiné au marquage, pour une dilution finale au 1/200e, dans du PBS-SVF 2% (PBS ; SVF : sérum de veau fœtal, GIBCO), volume à volume avec le sang. Les cellules marquées ont été incubées 30 minutes à 4°C. Ensuite 2 mL de FACS-lysing solution (349202, BD Biosciences, San Jose, Etats-Unis) ont été ajoutés pour une incubation de 15 minutes à température ambiante. Les cellules ont enfin été centrifugées 5 minutes à 400 g, puis lavées au PBS-SVF 2% 2 fois avant d'être reprises dans 300 µL pour passage au cytomètre (FACS Canto II, BD Biosciences).

### 5.3.Préparation des glandes salivaires

Une des deux glandes salivaires, prélevées au sacrifice, a servi pour les analyses en cytométrie de flux. Après le prélèvement, le milieu de digestion (RPMI 2%SVF, Collagénase D: 1,5 mg/ml, DNase I: 1U/ml ; RPMI, Gibco ; SVF, Gibco ; Collagénase, Roche, Boulogne-Billancourt, France ; DNase I, Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis) a été directement injecté au sein de la glande salivaire, pour une digestion in situ de 5 minutes. Puis la glande a été broyée à l'aide du gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec, Bergisch, Allemagne). Enfin le broyat a été à nouveau disposé dans le milieu de digestion pendant 30 minutes à 37°C avant un nouveau broyage dans le gentleMACS™ Dissociator. La suspension cellulaire a ensuite été passée sur un tamis 70 µm puis centrifugée à 400 g pendant 5 minutes avant d'être déposée en plaques 96 puits. Un premier marquage Fixable Viability Dye a d'abord été effectué (à la dilution de 1/1000e) après deux lavages des puits au PBS 1x sans SVF (Gibco). Puis les cellules marquées ont été incubées 10 minutes à 4°C à l'obscurité. Après deux nouveaux lavages au PBS-2%SVF (Gibco), les cellules marquées avec les Ac membranaires (dilués au 1/200e) ont été incubées pendant 20 minutes à 4°C à l'obscurité. Les marquages intra-cellulaires ont été réalisés après Fixation-Perméabilisation par le FoxP3 / Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience) pendant une heure à 4°C à l'obscurité, puis les cellules incubées 30 minutes à

4°C à l'obscurité. Après lavage, les cellules marquées ont été resuspendues dans 350 µL de PBS-SVF 2% (Gibco) pour l'analyse en cytométrie de flux.

#### 5.4.Préparation de la rate et des ganglions pancréatiques

Après prélèvement des organes, la rate a été plongée dans 3 mL de PBS-SVF 2% (Gibco) puis broyée sur un tamis de 100 µm à l'aide du piston d'une seringue de 2 mL. La suspension de cellules a été centrifugée 5 minutes à 400 g puis resuspendue dans 1 mL d'un tampon de lyse des globules rouges (ACK, Life Technologies) et incubée pendant 4 minutes à 4°C. Après lavage au PBS-SVF 2% (Gibco) puis nouvelle centrifugation, les cellules ont été comptées sur lame de Malassez après dilution au 1/20e au bleu de Trypan puis ont été reprises dans du PBS-SVF 2% (Gibco) à une concentration de  $10 \cdot 10^6$  cellules par mL. 100 µL de la suspension cellulaire a alors été déposée dans les puits d'une plaque 96 puits.

Les ganglions pancréatiques ont quant à eux été plongés dans 1mL de PBS-SVF 2% (Gibco) puis broyés à l'aide d'un petit potère. La suspension de cellules a été traitée à l'ACK tel que décrit pour la rate puis passée sur tamis de 40 µm avant d'être déposée dans les puits d'une plaque 96 puits.

Les marquages ont été réalisés comme décrit précédemment. Après lavage, les cellules marquées ont été resuspendues dans 350 µL de PBS-SVF 2% (Gibco) pour le passage au cytomètre.

#### 5.5.Incidence du diabète

Au cours de notre étude, la glycosurie de chaque souris (présence de glucose dans les urines) a été surveillée toutes les semaines à l'aide d'une bandelette urinaire Glucotest (Roche diabetes care, Meylan, France) mise en présence d'urine fraîche, de manière à dépister la survenue d'un diabète. L'incidence du diabète dans les différents groupes de traitement (Ac contrôle isotypique, Ac anti-BAFF, Ac anti-CD3 ou traitement combiné Ac anti-CD3 + anti-BAFF) et dans une population témoin de souris NOD femelles de la même animalerie, ont été comparées.

Certaines souris ayant présenté un diabète avant l'issue de leur traitement, prévu à leur 20<sup>e</sup> semaine de vie, ont ainsi dû être sacrifiées. La moitié des effectifs initiaux de chaque groupe a été conservée à l'issue du traitement pour continuer à suivre l'incidence du diabète.

## 6. Analyses statistiques

Dans la suite du texte, les différents résultats sont tous exprimés en moyenne +/- écart-type.

L'analyse statistique des résultats a été réalisée grâce au logiciel informatique Graphpad Prism (Graphpad software Inc, version 8, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Les comparaisons entre les groupes ont été réalisées grâce au test de Mann-Whitney qui permet la comparaison de deux échantillons indépendants de faibles effectifs ne vérifiant pas la condition de normalité (répartition non gaussienne). La corrélation a été calculée à l'aide de la corrélation de Spearman qui permet de trouver un coefficient de corrélation entre les rangs de deux valeurs non paramétriques. Pour ces tests, le seuil de significativité retenu a été de 5%. Les p-valeurs inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives.

## C. Résultats

### 1. Evaluation des flux salivaires stimulés

#### 1.1. Comparaison des flux salivaires stimulés des souris femelles NOD et B6

Dans la littérature, il a été démontré que les souris NOD ont une diminution de leur flux salivaire par rapport aux souris B6<sup>33,172</sup>. Afin de confirmer cela chez nos souris avec notre protocole de mesure du flux salivaire stimulé, les flux salivaires de souris B6 femelles (n = 5) à ceux de souris NOD femelles (n = 5-11) ont été comparés. Au même âge, les souris NOD ont une diminution significative du flux salivaire par rapport aux souris B6 (à l'âge de 18-20 semaines, B6 : 12,5 µL/20 minutes/g +/- 2,6 vs NOD 5,5 µL/20 minutes/g +/- 1,7), (p < 0,01) (**Figure 8 A**).

#### 1.2. Evolution des flux salivaires stimulés des souris femelles NOD après traitement

En comparant les flux salivaires, avant et après traitement, dans chaque groupe, on s'aperçoit que seul l'Ac anti-BAFF est efficace pour améliorer de manière significative le flux salivaire de la souris NOD, jusqu'à atteindre un flux salivaire moyen comparable à ce que l'on observe chez des souris B6 du même âge (10,4 µL/20 minutes/g +/- 1,3 pour les NOD traitées par Ac anti-BAFF vs 12,5 µL/20 minutes/g +/- 2,5 chez les B6, p < 0,001, **Figure 8 B-D**).

La **figure 5 C-D** illustre que seul le traitement par Ac anti-BAFF a permis une augmentation significative du flux salivaire en comparaison aux souris non traitées ou traitées par contrôle isotypique.

Lorsque les souris sont traitées plus tardivement (entre leur 13<sup>ème</sup> et leur 21<sup>ème</sup> semaine de vie), il existe une augmentation progressive et statistiquement significative de leur flux salivaire tout au long du suivi (**Figure 8 E**).

Enfin, dans le groupe du traitement combiné anti-CD3 + anti-BAFF, le flux salivaire est significativement plus élevé uniquement 4 semaines après le début du traitement.

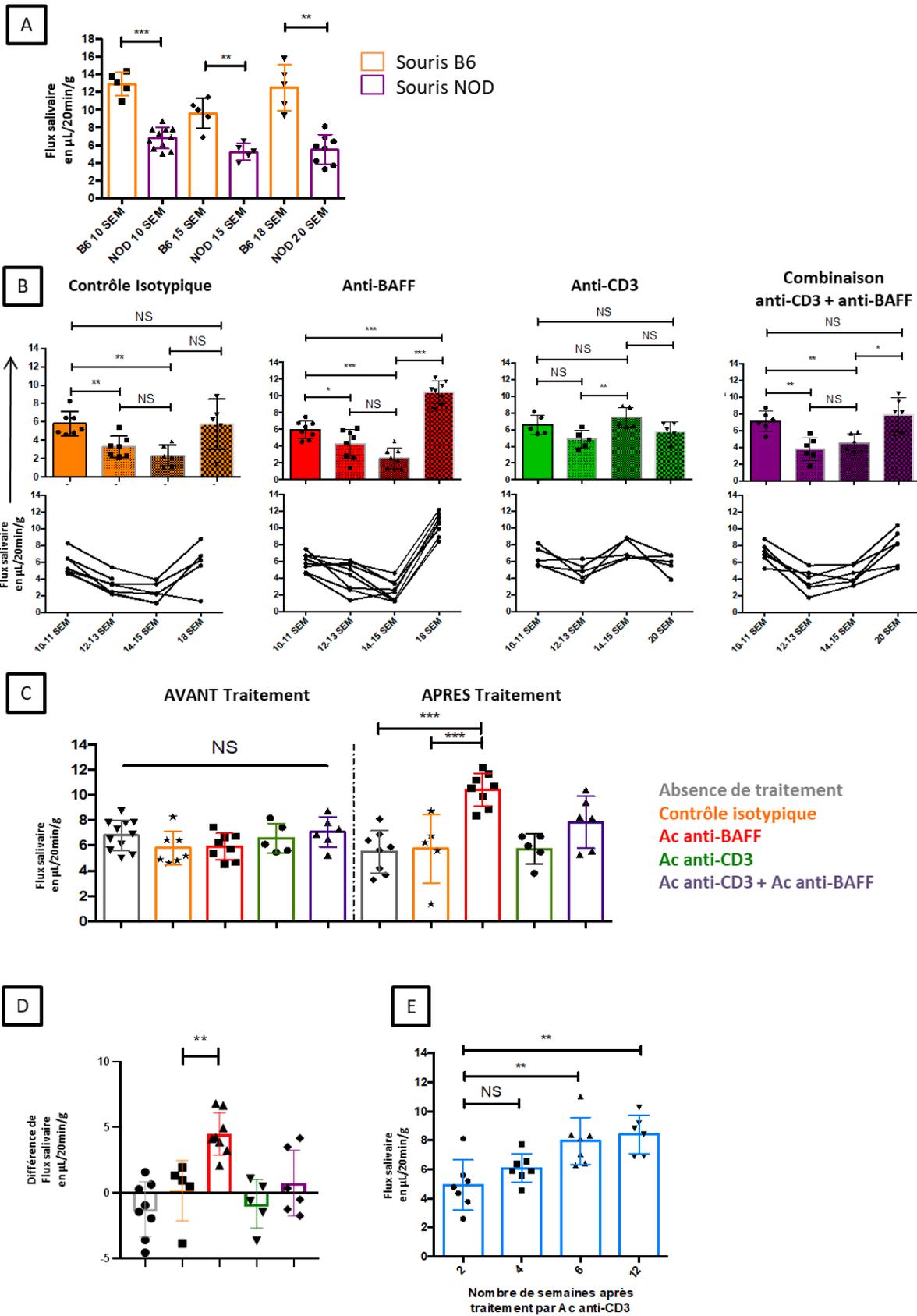


Figure 8. Flux salivaires stimulés

(A) Flux salivaires stimulés des souris femelles NOD non traitées et des souris femelles B6 ( $n = 5$  à  $10$  souris par groupe). (B) Evolution des flux salivaires stimulés des souris femelles NOD traitées (groupe contrôle isotypique  $n = 5$  à  $8$ , groupe anti-BAFF  $n = 8$ , groupe anti-CD3  $n = 5$ , groupe traitement combiné  $n = 6$ ). (C) Comparaison des flux salivaires des souris femelles NOD avant et après traitement ( $n = 5$  à  $11$  souris selon le groupe). (D) Comparaison des différences de flux salivaires des souris femelles NOD avant et après traitement ( $n = 5$  à  $11$  souris selon le groupe). (E) Evolution des flux salivaires chez les souris NOD femelles traitées tardivement par anti-CD3 (entre leur 13<sup>ème</sup> et leur 21<sup>ème</sup> semaine), ( $n = 6-7$ ). Les valeurs ont été comparées statistiquement par le test de Mann-Whitney : NS :  $p > 0,05$ , \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ . Sur tous ces graphiques, chaque point est représentatif d'un recueil de flux salivaire chez une souris et chaque barre d'histogramme représente la moyenne du groupe et la barre d'erreur leur écart-type.

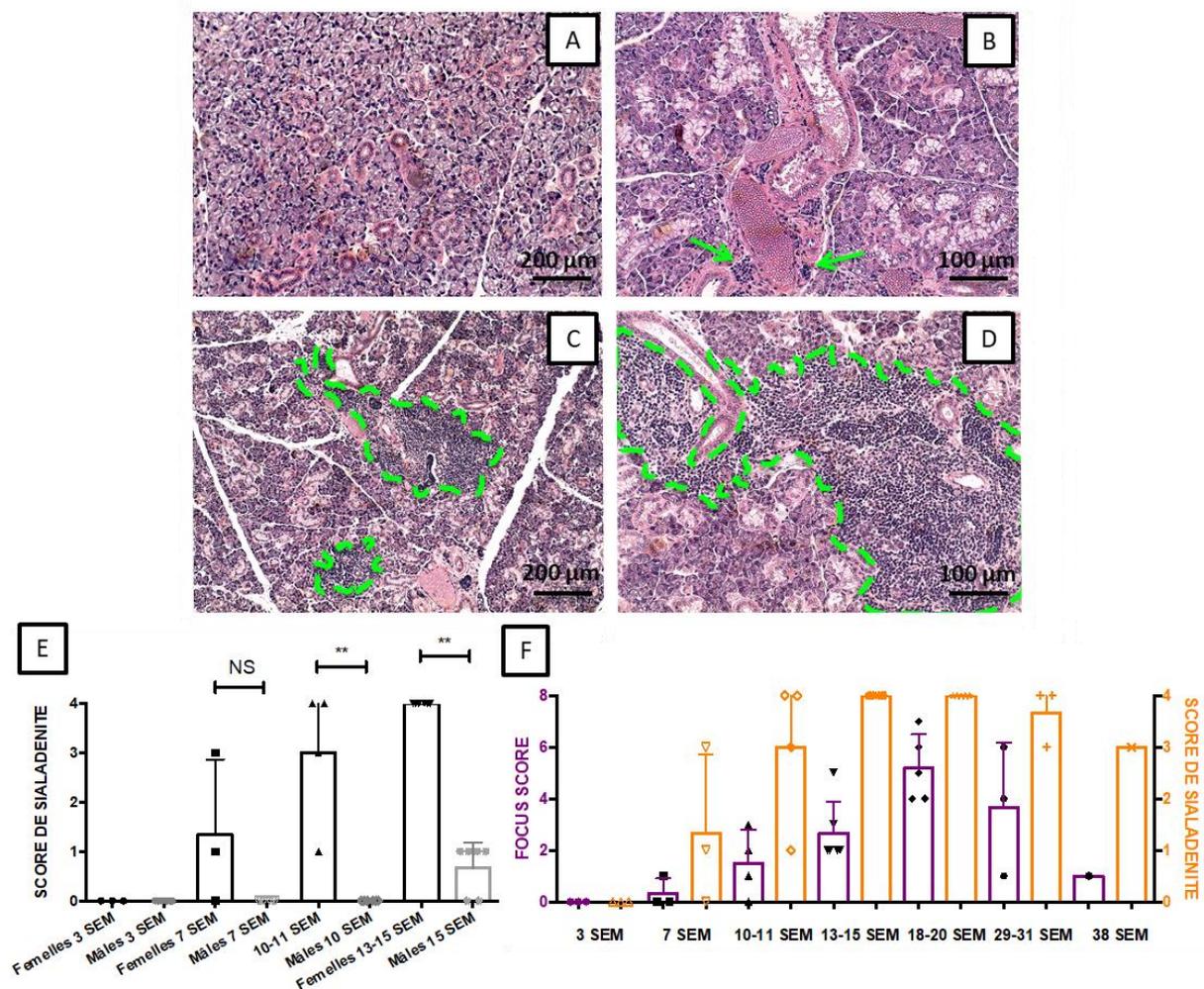
## 2. Etude histologique de la sialadénite

### 2.1. Evolution et comparaison de la sialadénite et focus score des souris NOD

La **figure 9 A-D** illustre les différents stades de sialadénite à partir de coupes de souris NOD femelles non traitées de différents âges, que l'on peut observer par microscopie optique après un marquage à l'hématoxyline-éosine sur coupes paraffines. Le score de sialadénite correspond à la présence ou non d'une inflammation des glandes salivaires, hiérarchisé en 5 stades, de 0 (pas d'inflammation) à 4 (inflammation intense) comme suit : 0 : pas d'infiltrat, 1 : infiltrat minime, 2 : infiltrat modéré ou moins de 1 focus/4 mm<sup>2</sup>, 3 : 1 focus/4 mm<sup>2</sup>, 4 : plus de 1 focus/4 mm<sup>2</sup>. (1 focus = agrégats de plus de 50 lymphocytes), alors que le Focus score, correspondant au nombre moyen de foci par 4 mm<sup>2</sup>, va permettre de mieux différencier le degré d'atteinte des glandes salivaires présentant une telle inflammation.

L'analyse des glandes salivaires de souris NOD mâles et femelles à différents âges (3, 7, 10 et 15 semaines) confirme que la sialadénite est exclusivement présente chez les femelles, à ces âges, et que l'infiltrat débute dès le plus jeune âge avec des infiltrats visibles dès 7 semaines de vie (**Figure 9 E**).

Enfin, l'analyse des glandes salivaires des 25 souris NOD femelles non traitées à différents âges (à 3 semaines n = 3, à 7 semaines n = 3, à 10-11 semaines n = 4, à 13-15 semaines n = 6, à 18-20 semaines n = 5, à 29-31 semaines n = 3 et à 38 semaines n = 1) montre que la sialadénite et le focus score ont tendance à augmenter jusqu'à l'âge de 20 semaines pour décroître par la suite chez les souris plus âgées (**Figure 9 F**, Focus score à 18-20 semaines à 5,2 +/- 1,3 vs 3,7 +/- 2,5 à 29-31 semaines et 1,0 à 38 semaines).



**Figure 9. Vue et analyse microscopique de l'infiltrat inflammatoire des glandes salivaires sous-maxillaires des souris NOD**

Les glandes salivaires de 25 souris NOD femelles non traitées et de 24 souris NOD mâles ont été prélevées à différents âges (3, 7, 10, 15 et jusqu'à 38 semaines) afin de déterminer le niveau de sialadénite alors présent. Des sections de 7  $\mu\text{m}$  fixées sur paraffine et colorées par hématoxyline-éosine ont été analysées. Le score de sialadénite a alors été lu pour chaque souris : 0 : pas d'infiltrat, 1 : infiltrat minime, 2 : infiltrat modéré ou moins de 1 focus/4  $\text{mm}^2$ , 3 : 1 focus/4  $\text{mm}^2$ , 4 : plus de 1 focus/4  $\text{mm}^2$ . (1 focus = agrégats de plus de 50 lymphocytes), de même que le Focus score correspondant au nombre moyen de foci par 4  $\text{mm}^2$ . (A) Score de sialadénite = 0, représentatif des 3 souris femelles NOD âgées de 3 semaines et d'une souris NOD femelle de 7 semaines et des 18 souris mâles NOD jusqu'à 15 semaines ; ici souris NOD femelles de 3 semaines. Grossissement initial x 100. (B) Score de sialadénite = 1, représentatif d'une souris NOD femelle de 7 semaines, d'une de 10 semaines et de 4 souris NOD mâles de 15 semaines, ici souris NOD femelles de 10 semaines. Grossissement initial x 200. (C) Score de sialadénite = 3, représentatif d'une souris NOD femelle de 7 semaines, une de 10 semaines, une de 29 semaines et une de 38 semaines, ici souris NOD femelles de 38 semaines. Grossissement initial x 100. (D) Score de sialadénite = 4, représentatif de 2 souris NOD femelles de 10-11 semaines, de l'ensemble des souris NOD femelles de 13-15 et 18-20 semaines ( $n = 6$  et  $5$ ) et de 2 souris de 29-31 semaines, ici souris NOD femelles de 20 semaines. Grossissement initial x 200. (E) Comparaison de la sialadénite des mâles et femelles NOD à 3, 7, 10 et 15 semaines ( $n = 3$  à  $6$  par groupe). (F) Sialadénite et Focus score des NOD femelles non traitées de 3 à 38 semaines ( $n = 1$  à  $6$  par groupe). Les valeurs ont été comparées statistiquement par le test de Mann-Whitney : NS :  $p > 0,05$ , \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ . Sur tous ces graphiques, chaque point est représentatif d'une souris et chaque barre d'histogramme représente la moyenne du groupe et la barre d'erreur leur écart-type.

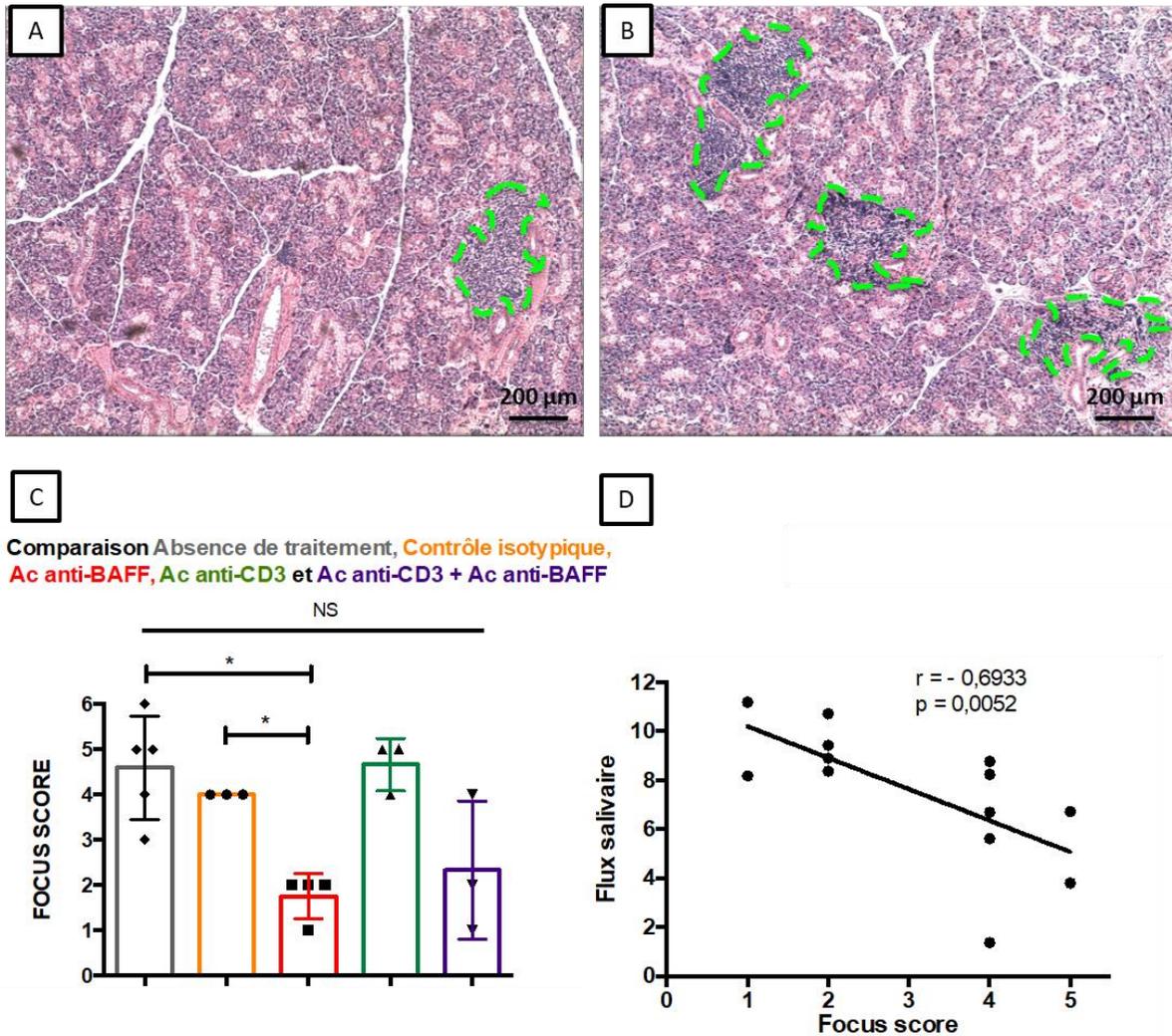
## 2.2.Comparaison de la sialadénite des souris femelles NOD après traitement

L'analyse des coupes histologiques de glandes salivaires des souris après traitement permet d'évaluer l'impact des différents traitements sur l'infiltrat inflammatoire salivaire. Ainsi, en cas d'efficacité du traitement, on attend une diminution du focus score.

La **figure 10 A-B** illustre l'infiltrat salivaire représentatif des souris traitées par Ac anti-BAFF ou traitement combiné et celui des souris non traitées ou traitées par Ac anti-CD3 ou Ac contrôle isotypique.

La **figure 10 C** compare les focus score de chaque souris traitée (groupe contrôle isotypique n = 3, groupe anti-BAFF n = 4, groupe anti-CD3 n = 3, groupe traitement combiné n = 3) aux souris non traitées de même âge (n = 5, âgées de 18 à 20 semaines). Seul le traitement par Ac anti-BAFF s'avère efficace pour réduire la sialadénite (focus score moyen de 1,75 +/- 0,5 dans le groupe Ac anti-BAFF vs 4,6 +/- 1,14 dans le groupe non traité et 4,0 +/- 0 dans le groupe contrôle isotypique,  $p < 0,05$ ).

De plus, il existe une corrélation inverse significative entre le focus score et le flux salivaire stimulé ( $r = -0,6933$ ,  $p = 0,0052$ , **Figure 10 D**).



**Figure 10. Vue et analyse microscopique de l'infiltrat inflammatoire des glandes salivaires sous-maxillaires des souris NOD après traitement**

Les glandes salivaires de 13 souris NOD femelles traitées à partir de 10 semaines puis sacrifiées entre 18 et 20 semaines, et de 5 souris NOD femelles non traitées âgées de 18 à 20 semaines ont été analysées par microscopie optique. (A) Photographie représentative de la sialadénite des glandes salivaires des souris traitées par Ac anti-BAFF ( $n = 4$ ) et de souris traitées par la combinaison Ac anti-CD3 + anti-BAFF ( $n=2$ ), grossissement initial  $\times 100$ . (B) Photographie représentative des glandes salivaires des souris non traitées ( $n = 5$ ), traitées par Ac isotype contrôle ( $n = 3$ ), Ac anti-CD3 ( $n = 3$ ) ou la combinaison Ac anti-CD3 + anti-BAFF ( $n = 1$ ), grossissement initial  $\times 100$ . (C) Comparaison du focus score des souris non traitées et

traitées par les différents traitements de 18 à 20 semaines, (groupe non traité  $n = 5$ , groupe contrôle isotypique  $n = 3$ , groupe anti-BAFF  $n = 4$ , groupe anti-CD3  $n = 3$ , groupe traitement combiné  $n = 3$ ) Les valeurs ont été comparées statistiquement par le test de Mann-Whitney : NS :  $p > 0,05$ , \*  $p < 0,05$ . (D) Corrélation entre le flux salivaire stimulé en  $\mu\text{L}/20\text{min/g}$  et le focus score de chaque souris traitée (groupe contrôle isotypique  $n = 3$ , groupe anti-BAFF  $n = 4$ , groupe anti-CD3  $n = 3$ , groupe traitement combiné  $n = 3$ ). La corrélation a été étudiée par le test de Spearman. Sur ces graphiques, chaque point est représentatif d'une souris et chaque barre d'histogramme représente la moyenne du groupe et la barre d'erreur leur écart-type.

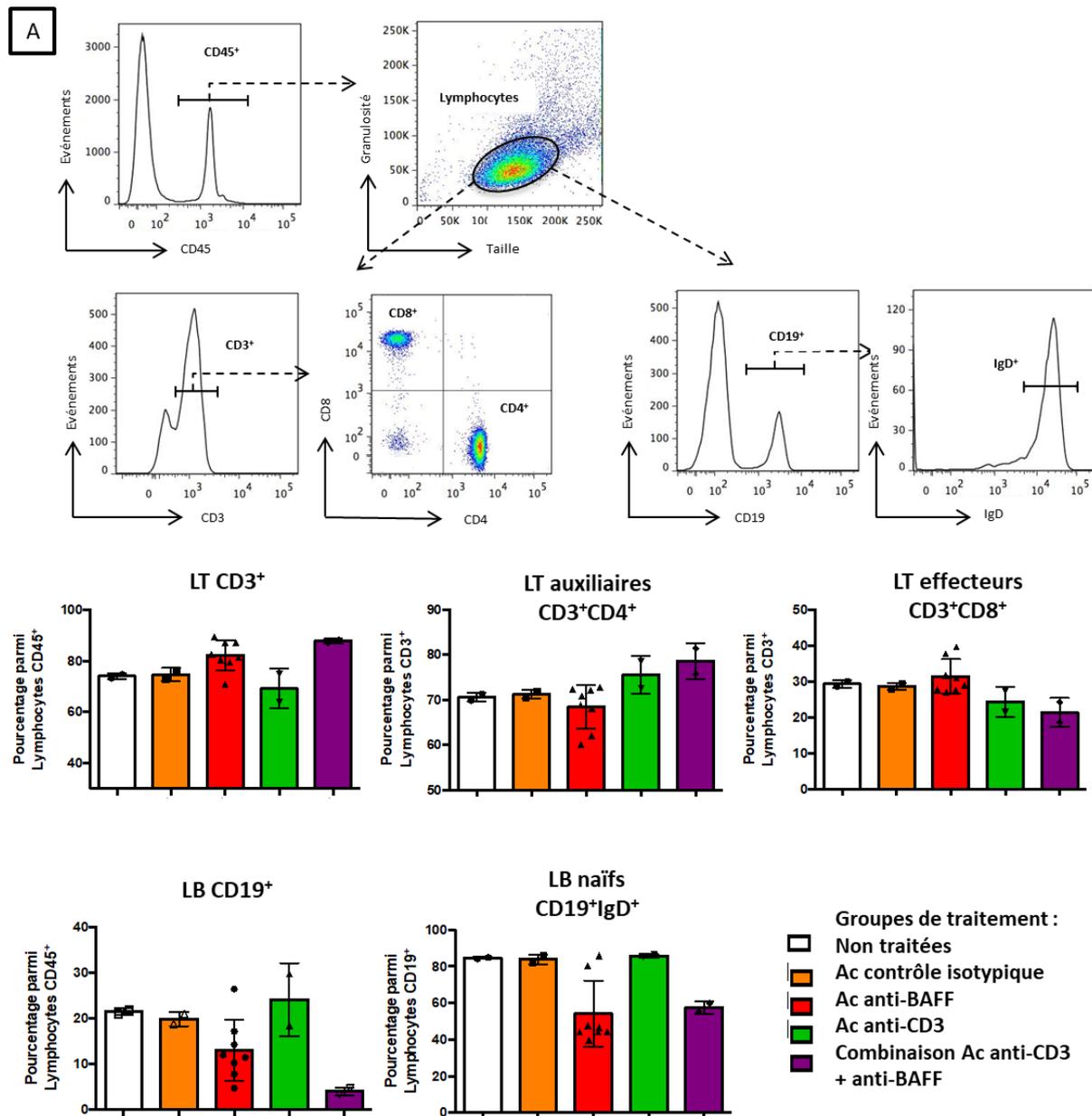
### 3. Analyse des sous-populations lymphocytaires en cytométrie en flux

#### 3.1. Analyse intermédiaire sur sang total

A 8 semaines après le début du traitement, dans les groupes ayant reçu l'Ac anti-CD3 et la combinaison Ac anti-CD3 + anti-BAFF, et, 6 semaines après le début du traitement, dans les groupes ayant reçu l'Ac contrôle isotypique et l'Ac anti-BAFF, une analyse en cytométrie en flux sur sang total a été effectuée, dans le but de vérifier l'impact des différents traitements sur les sous-populations lymphocytaires circulantes. La **figure 11 A** représente la stratégie d'identification de ces différentes sous-populations. Parmi les cellules exprimant le marqueur CD45 (cellules immunitaires) puis les lymphocytes (reconnus par leur taille et leur granulosité), les populations suivantes ont été définies : les LT, par leur expression du marqueur CD3, les LT auxiliaires ( $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ ), les LT effecteurs ( $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ ) et les LB, par leur expression du CD19, les LB naïfs ( $\text{CD19}^+\text{IgD}^+$ ) et les LB mémoires switchés ( $\text{CD19}^+\text{IgD}^-$ ).

Cette expérience n'ayant concerné qu'un nombre restreint de souris (groupe non traité  $n = 2$ , groupe contrôle isotypique  $n = 2$ , groupe anti-BAFF  $n = 8$ , groupe anti-CD3  $n = 2$ , groupe traitement combiné  $n = 2$ ), aucune comparaison statistique entre les groupes n'a pu être réalisée.

Il existe une tendance à un excès relatif de LT auxiliaires CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> par rapport aux LT effecteurs CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> dans les groupes traités par Ac anti-CD3 (**Figure 11 B**). L'anti-BAFF induit une déplétion partielle des LB circulants (21,4% +/- 0,7 de cellules CD19<sup>+</sup> dans le groupe non traité, 19,8% +/- 1,6 dans le groupe traité par Ac contrôle isotypique, 12,9% +/- 6,6 dans le groupe traité par Ac anti-BAFF, 24,0% +/- 8,0 dans le groupe traité par Ac anti-CD3, 4,0% +/- 0,9 dans le groupe traité par traitement combiné). Le marquage IgD<sup>+</sup> montre que le traitement par Ac anti-BAFF entraîne une diminution du nombre de LB naïfs CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> au détriment de LB CD19<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> mémoires switchés (54,1% +/- 18,1 de LB naïfs CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> dans le groupe traité par Ac anti-BAFF et 57,5% +/- 3,4 dans le groupe du traitement combiné contre 84,7% +/- 1,6 pour l'ensemble des autres groupes).



**Figure 11. Sous-populations lymphocytaires circulantes lors du prélèvement intermédiaire des souris NOD**

(A) Stratégie d'identification des sous-populations lymphocytaires. Les cellules immunitaires ont été sélectionnées grâce à l'expression du marqueur CD45 puis les cellules vivantes ont été identifiées par leurs caractéristiques de taille et de granulocité. Les LT ont été sélectionnés par leur expression du co-récepteur CD3 et les lymphocytes B par le marqueur CD19. Sur les lymphocytes T ont ensuite été distingués les LT CD4<sup>+</sup> et les LT CD8<sup>+</sup> en fonction de l'expression de ces marqueurs. Sur les LB, les LB naïfs IgD<sup>+</sup> ont été distingués des LB

mémoires switchés IgD- grâce à leur expression du marqueur IgD. (B) Analyse des sous-populations lymphocytaires en fonction du traitement reçu. NOD femelles non traitées ( $n = 2$ ), Ac contrôle isotypique ( $n = 2$ ), Ac anti-BAFF ( $n = 8$ ), Ac anti-CD3 ( $n = 2$ ) et combinaison Ac anti-CD3 + anti-BAFF ( $n = 2$ ). Sur tous ces graphiques, chaque point est représentatif d'une souris et chaque barre d'histogramme représente la moyenne du groupe et la barre d'erreur leur écart-type.

### 3.2. Analyse des glandes salivaires, de la rate, des ganglions pancréatiques et du sang après traitement

Treize souris ont été utilisées pour cette analyse, à l'issue de leur traitement, 3 du groupe traité par l'Ac contrôle isotypique, 4 du groupe traité par Ac anti-BAFF, 3 du groupe traité par Ac anti-CD3 et 3 du groupe traité par la combinaison des deux, entre leur 18<sup>e</sup> et leur 20<sup>e</sup> semaine. La **figure 12 A** résume la stratégie d'identification des différentes sous-populations lymphocytaires au sein des glandes salivaires. A l'aide d'un marqueur de viabilité cellulaire, le Fixable Viability Dye, réagissant avec les groupements amines, les cellules vivantes ont été sélectionnées (moins marquées car l'intégrité de leur membrane cytoplasmique empêche la réaction entre le marquage et les amines intra-cellulaires). Puis, les cellules immunitaires (reconnues par leur expression du marqueur CD45 et leur granulosité) et les lymphocytes ont été sélectionnés tel que précédemment pour définir parmi cette population : les LT (CD3<sup>+</sup>), les LT auxiliaires (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), les LT effecteurs (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), les LT doublement négatifs (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>), les Trég (CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) et les LB (CD19<sup>+</sup>).

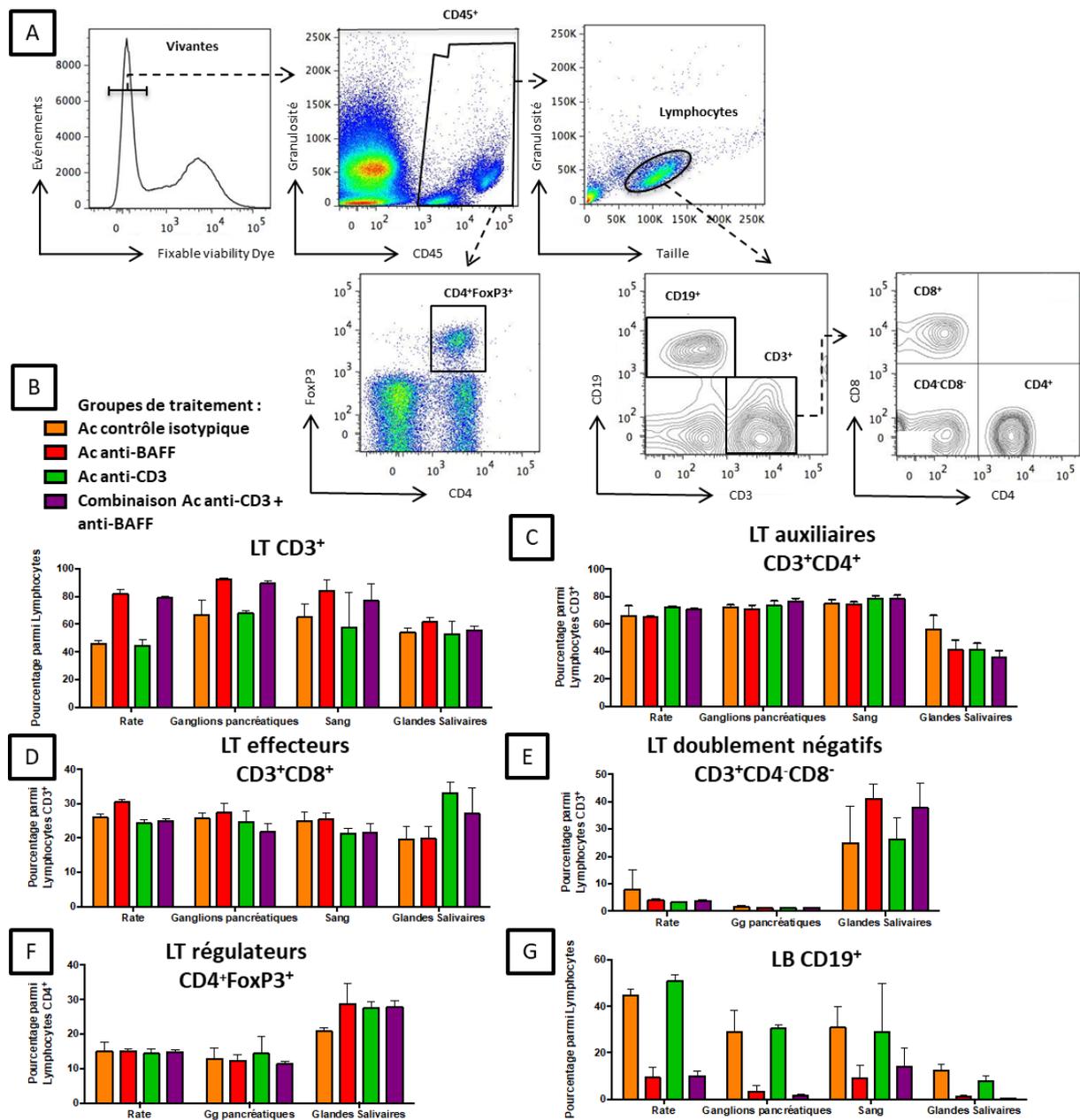
L'ensemble des expériences n'ayant concerné qu'un nombre restreint de souris (sur la rate, les ganglions et le sang : groupe contrôle isotypique  $n = 3$ , groupe anti-BAFF  $n = 4$ , groupe anti-CD3  $n = 3$ , groupe traitement combiné  $n = 3$ , sur les glandes salivaires : groupe contrôle isotypique  $n = 2$ , groupe anti-BAFF  $n = 4$ , groupe anti-CD3  $n = 3$ , groupe traitement combiné  $n = 3$ ), des analyses statistiques n'ont pas pu être réalisées.

Le traitement par Ac anti-CD3 n'entraîne pas de diminution du nombre de LT CD3<sup>+</sup> au niveau central (rate) ou périphérique (sang, ganglions pancréatiques) par rapport au groupe traité par Ac contrôle isotypique, ni n'entraîne d'importantes différences quantitatives dans l'infiltrat des glandes salivaires sur la proportion de lymphocytes CD (Figure 12 B). Le traitement anti-BAFF induit une surreprésentation relative des LT dans les organes et le sang des souris traitées par Ac anti-BAFF, liée à la déplétion lymphocytaire B (54,2% +/- 3,3 de LT CD3<sup>+</sup> dans les glandes salivaires du groupe contrôle isotypique, 61,4% +/- 3,7 dans le groupe anti-BAFF, 52,7% +/- 9,2 dans le groupe anti-CD3 et 55,8% +/- 2,7 dans le groupe ayant reçu le traitement combiné). En ce qui concerne les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, il semble que la proportion de LT auxiliaires CD4<sup>+</sup> soit plus faible dans les glandes salivaires chez les souris traitées par Ac anti-BAFF et/ou Ac anti-CD3 par rapport aux souris traitées par l'Ac contrôle isotypique (LT CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> dans le groupe contrôle isotypique à 56,2% +/- 9,9, 41,3% +/- 7,0 dans le groupe anti-BAFF, 41,4% +/- 4,7 dans le groupe anti-CD3 et 35,6% +/- 4,9 dans le groupe traitement combiné), alors qu'on ne retrouve pas d'aussi franche différence de cette proportion au niveau de la rate, des ganglions ou du sang (Figure 12 C). Le traitement par Ac anti-CD3, seul ou associé à l'Ac anti-BAFF, semble provoquer une très légère diminution en LT effecteurs CD8<sup>+</sup> au niveau central (rate) et périphérique (sang et ganglions pancréatiques) alors que le phénomène inverse est observé au niveau des glandes salivaires, avec une augmentation de leur proportion à ce niveau (19,7% +/- 3,5 de LT CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> dans les glandes salivaires des souris traitées par Ac contrôle isotypique, 19,9% +/- 3,5 dans le groupe traité par Ac anti-BAFF, 33,0% +/- 3,2 dans le groupe traité par Ac anti-CD3 et 27,2% +/- 7,3 dans le groupe traité par traitement combiné) (Figure 12 D). Une importante population de LT doublement négatifs CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> a été mise en évidence au sein des glandes salivaires. Cette population semble être davantage augmentée dans les groupes traités par Ac anti-BAFF (Ac anti-BAFF seul ou Ac anti-CD3 + anti-BAFF). Ainsi, cette population représente 24,8% +/- 13,5 des LT CD3<sup>+</sup> infiltrant les glandes salivaires dans le

groupe contrôle isotypique, 41,0% +/- 5,5 dans le groupe anti-BAFF, 26,4% +/- 7,8 dans le groupe anti-CD3 et 37,7% +/- 8,9 dans le groupe traitement combiné. De plus, on remarque une diminution de cette population dans les rates de souris traitées par rapport à celle du contrôle isotypique (**Figure 12 E**).

La proportion de Trég CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> est augmentée dans chacun des groupes traités par rapport au groupe contrôle isotypique au niveau des glandes salivaires (20,7% +/- 1,0 dans le groupe contrôle isotypique contre 28,7% +/- 5,9 dans le groupe anti-BAFF, 27,6% +/- 1,8 dans le groupe anti-CD3 et 27,7% +/- 1,9 dans le groupe traitement combiné, **Figure 12 F**) alors que l'on n'observe pas de différence au niveau de la rate ou des ganglions pancréatiques.

Enfin, concernant les LB, le traitement par Ac anti-BAFF entraîne une déplétion partielle en LB CD19<sup>+</sup>, centrale et périphérique (ainsi le pourcentage moyen de LB sur le nombre de lymphocytes dans la rate est de 44,9% +/- 2,4, dans le groupe contrôle isotypique, 9,3% +/- 4,3 dans le groupe anti-BAFF, 51,0% +/- 2,7 dans le groupe anti-CD3 et 10,0% +/- 2,0 dans le groupe traitement combiné) et dont l'effet se ressent également au niveau des glandes salivaires, avec une quasi absence de LB à ce niveau (pourcentage moyen de LB sur le nombre de lymphocytes dans les glandes salivaires : 12,5% +/- 2,3, dans le groupe contrôle isotypique, 1,0% +/- 0,9 dans le groupe anti-BAFF et 7,6% +/- 2,6 dans le groupe anti-CD3, 0,3% +/- 0,2 dans le groupe traitement combiné) (**Figure 12 G**).

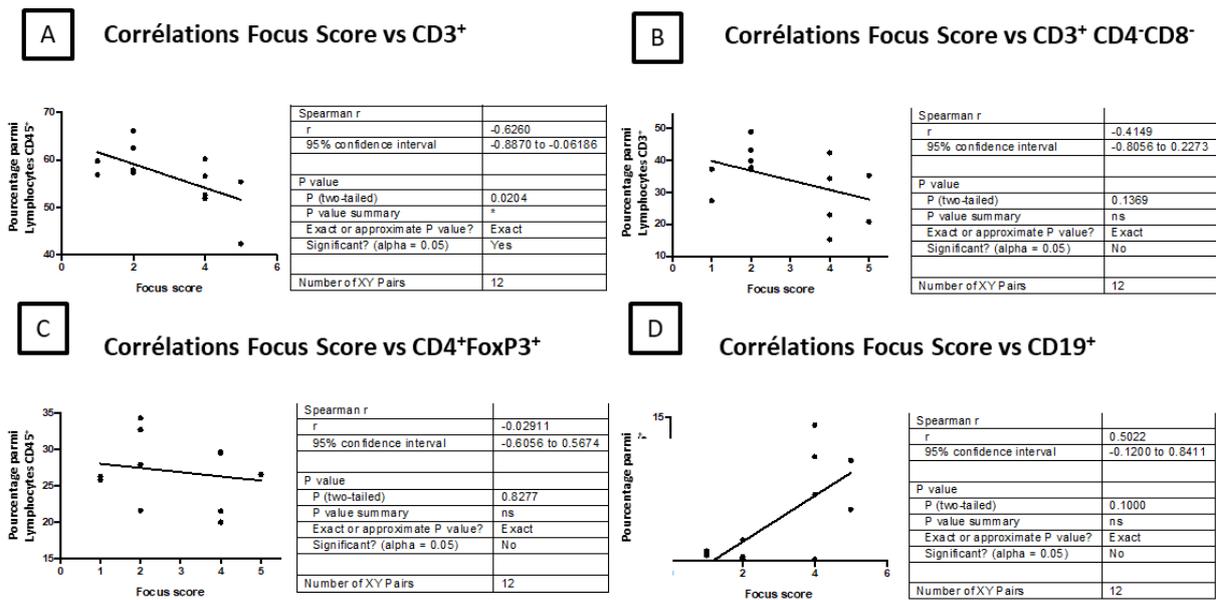


**Figure 12. Sous-populations lymphocytaires au niveau de la rate, des ganglions pancréatiques, du sang et des glandes salivaires après traitement**

(A) Stratégie d'identification des sous-populations lymphocytaires dans les glandes salivaires. Les cellules immunitaires ont été sélectionnées grâce à l'expression du marqueur CD45 puis les cellules vivantes ont été identifiées par leurs caractéristiques de taille et de granulosité. Les LT ont été sélectionnés par leur expression du co-récepteur CD3 et les LB par le marqueur CD19. Parmi les LT ont ensuite été distingués les LT CD4<sup>+</sup> et les LT CD8<sup>+</sup> en fonction de

*l'expression de ces marqueurs. Les Trég ont quant à eux été sélectionnés par leur expression conjointe des marqueurs CD4 et FoxP3 sur les cellules CD45+ vivantes. (B-G) Analyse de la proportion des sous-populations lymphocytaires CD3+ (A), CD19+ (B), CD3+CD4+ (C), CD3+CD8+ (D), CD3+CD4-CD8- (E) et CD4+FoxP3+ (F) par cytométrie en flux au niveau, de la rate, des ganglions pancréatiques, du sang et des glandes salivaires pour chacun des groupes étudiés (sur la rate, les ganglions et le sang : groupe contrôle isotypique n = 3, groupe anti-BAFF n = 4, groupe anti-CD3 n = 3, groupe traitement combiné n = 3, sur les glandes salivaires : groupe contrôle isotypique n = 2, groupe anti-BAFF n = 4, groupe anti-CD3 n = 3, groupe traitement combiné n = 3). Sur tous ces graphiques, chaque barre d'histogramme représente la moyenne du groupe et la barre d'erreur leur écart-type.*

Il existe une corrélation statistiquement significative entre le pourcentage de LT et le focus score ( $r = -0,6260$ ,  $p = 0,0204$ , **Figure 13 A**), alors qu'on ne retrouve pas de corrélation significative entre le focus score et le nombre de LT doublement négatifs, de Trég ou de LB (**Figure 13 B-D**) même s'il existe une tendance pour les corrélations entre le focus score et le nombre de LT doublement négatifs ( $r = -0,4149$ ,  $p = 0,1369$ ) et des LB ( $r = 0,5022$ ,  $p = 0,1000$ ).



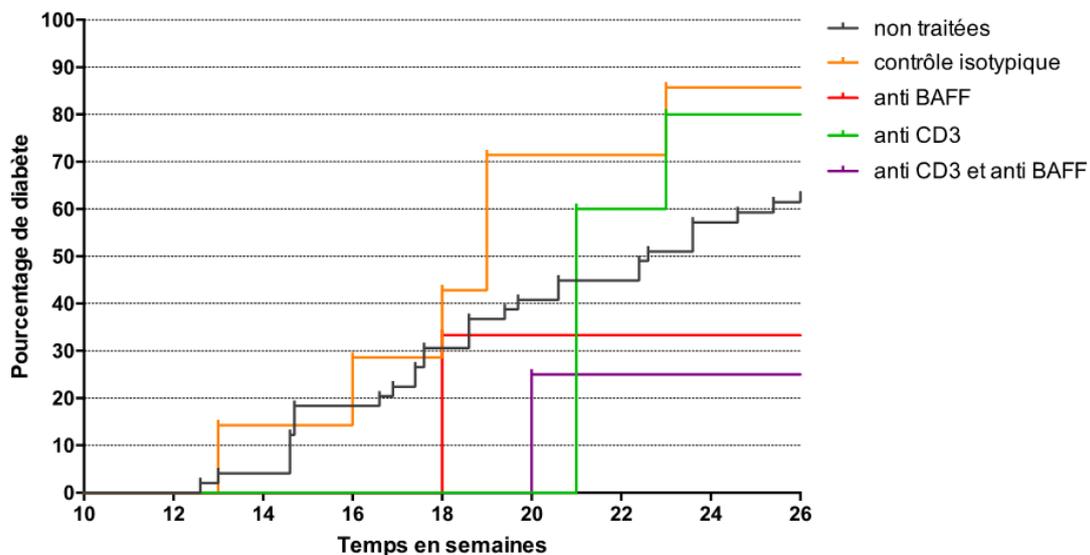
**Figure 13. Corrélations entre les résultats de cytométrie en flux au niveau des glandes salivaires et le focus score histologique chez les souris NOD traitées**

Corrélations entre le focus score histologique et : (A) le pourcentage de LT, (B) le pourcentage de LT doublement négatifs CD4-CD8-, (C) le pourcentage de Trég, (D) le pourcentage de LB, dans les glandes salivaires. Effectif : groupe contrôle isotypique n = 2, groupe anti-BAFF n = 4, groupe anti-CD3 n = 3, groupe traitement combiné n = 3. Les corrélations ont été étudiées statistiquement par le test de Spearman. Sur ces graphiques chaque point représente 1 souris.

#### 4. Incidence du diabète

La **figure 14** illustre l'incidence cumulée du diabète chez les souris traitées et un groupe contrôle de souris non traitées provenant de la même animalerie (groupe contrôle isotypique n = 8, groupe anti-BAFF n = 8, groupe anti-CD3 n = 5, groupe traitement combiné n = 6, groupe non traité n = 49). Un certain nombre de souris ayant servi pour les analyses à l'issue du traitement administré, toutes n'ont pas pu être comptabilisées dans l'analyse de l'incidence du diabète car elles ont été sacrifiées pour analyse. Ainsi au final, les effectifs étudiés sont de : groupe contrôle isotypique n = 7, groupe anti-BAFF n = 6, groupe anti-CD3 n = 5, groupe

traitement combiné n = 4, groupe non traité n = 49. Sous réserve des faibles effectifs, les traitements par Ac anti-BAFF et le traitement combiné par Ac anti-CD3 + anti-BAFF semblent prévenir le diabète (entre 25 et 32% de souris diabétiques dans ces groupes à 26 semaines contre plus de 60% dans le groupe contrôle) alors que le traitement par Ac anti-CD3 ne semble avoir aucun effet bénéfique sur la prévention du diabète.



**Figure 14. Incidence du diabète dans les différents groupes étudiés**

L'étude de chaque groupe a concerné : groupe contrôle isotypique n = 8, groupe anti-BAFF n = 8, groupe anti-CD3 n = 5, groupe traitement combiné n = 6, groupe non traité n = 49. Un certain nombre de souris ayant servi pour les analyses à l'issue du traitement administré, toutes n'ont pas pu être comptabilisées dans l'analyse de l'incidence du diabète. Ainsi au final, les effectifs étudiés sont de : groupe contrôle isotypique n = 7, groupe anti-BAFF n = 6, groupe anti-CD3 n = 5, groupe traitement combiné n = 4, groupe non traité n = 49. Les souris ont été testées toutes les semaines par mesure de leur glycosurie par Glucotest (Roche).

D.Article “Efficacy of BAFF inhibition and B-cell depletion in non-obese diabetic mice as a spontaneous model for Sjögren's syndrome”

## **Efficacy of BAFF inhibition and B-cell depletion in non-obese diabetic mice as a spontaneous model for Sjögren's syndrome**

R. Felten<sup>1,3</sup> \*, Anne-Perrine Foray<sup>2</sup> \*, P. Schneider<sup>4</sup>, Cindy Marquet<sup>2</sup>, Coralie Pecquet<sup>2</sup>, Fanny Monneaux<sup>3</sup>, Hélène Dumortier<sup>3</sup>, Jean Sibilia<sup>1</sup>, Fabrice Valette<sup>2</sup>, L. Chatenoud<sup>2</sup>#, J-E. Gottenberg<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Rhumatologie et Centre national de référence pour les maladies auto-immunes, CHU Hautepierre, Strasbourg, France

<sup>2</sup> Université Paris Cité, CNRS UMR 8253, INSERM UMR 1151, Institut Necker Enfants Malades-INEM, Paris, France

<sup>3</sup> Immunologie, Immunopathologie et Chimie Thérapeutique, CNRS UPR 3572, IBMC, Strasbourg, France

<sup>4</sup> Département de biochimie, Université de Lausanne, Lausanne, Switzerland

\* These authors contributed equally to the work

# These authors contributed equally to the work

### **Corresponding authors:**

Pr Jacques-Eric GOTTENBERG, Service de rhumatologie, Centre National de Référence des Maladies Autoimmunes et Systémiques Rares, IBMC, UPR3572, CNRS, Hôpital de Hautepierre, 1 Avenue Molière BP 83049, 67098 Strasbourg Cedex, France. Phone: 03 88 12 79 53 | email: [jacques-eric.gottenberg@chru-strasbourg.fr](mailto:jacques-eric.gottenberg@chru-strasbourg.fr)

Dr Renaud FELTEN, Service de rhumatologie, Centre National de Référence des Maladies Autoimmunes et Systémiques Rares, IBMC, UPR3572, CNRS, Hôpital de Hautepierre, 1 Avenue Molière BP 83049, 67098 Strasbourg Cedex, France. Phone: 03 88 12 88 04 | email: [renaud.felten@chru-strasbourg.fr](mailto:renaud.felten@chru-strasbourg.fr)

### **KEY WORDS**

primary Sjögren's syndrome; NOD mouse; BAFF; regulatory T cells

### **COMPETING INTERESTS**

There are no competing interests for any author.

### **CONTRIBUTORSHIP**

The authors confirm contribution to the paper as follows: study conception and design: RF, PS, LC and JEG; data collection: RF, APF, CP, CM; interpretation of results: all authors; preparation of the manuscript: RF and JEG. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are indebted to Mrs. Laurene Magne for the technical training of Renaud Felten.

### **FUNDING SOURCE**

- RF was funded by the French Society of Rheumatology.
- LC laboratory was supported by the European Research Council Advanced Grant, (Hygiene No. 250290) INSERM institutional funding and Fondation Day Solvay
- The transcriptomic analysis was supported by the Innovative Medicines Initiative 2 Joint Undertaking (IMI 2 JU) (NECESSITY grant 806975).
- JEG received a grant from Geneviève Garnier (Association Française du Syndrome de Gougerot-Sjögren et des syndromes secs).
- PS is funded by the Swiss National Science Foundation (31003A–176256 and 310030–205196).
- This work was supported by the French Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)

### **ETHICAL APPROVAL INFORMATION**

The animal experimentation was conducted according to the “Principles of Laboratory Animal Care” and the experiments were approved by the French Ministry of Education and Research (no. 04463.02).

### **PATIENT AND PUBLIC INVOLVEMENT**

Patients and/or the public were not involved in the design, conduct, reporting, or dissemination plans of this study.

**DATA AVAILABILITY**

The data underlying this article will be shared on reasonable request to the corresponding author.

## **ABSTRACT**

**Objective:** The therapeutic interest of targeting B-cell activating factor (BAFF) in primary Sjögren's syndrome (pSS) can be suspected from the results of two phase II clinical trials but has not been evaluated in an animal model of the disease. We aimed to evaluate the therapeutic efficacy of this strategy on dryness and salivary gland infiltrates in the NOD mouse model of pSS.

**Methods:** Female NOD mice between age 10 and 18 weeks were treated with a BAFF-blocking monoclonal antibody, Sandy-2, or an isotype control. Dryness was measured by the stimulated salivary flow. Salivary lymphocytic infiltrates were assessed by immunohistochemistry. Blood, salivary glands, spleen and lymph-node lymphocyte sub-populations were analysed by flow cytometry. Salivary gland mRNA expression was analysed by transcriptomic analysis.

**Results:** BAFF inhibition significantly decreased salivary gland lymphocytic infiltrates, which was inversely correlated with salivary flow. The treatment markedly decreased B-cell number in salivary glands, blood, lymph nodes and spleen and increased Foxp3<sup>+</sup> regulatory and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> double negative T-cell numbers in salivary glands.

**Conclusion:** A monoclonal antibody blocking BAFF and depleting B cells had therapeutic effectiveness in the NOD mouse model of pSS. The increase in regulatory T-lymphocyte populations might underlie the efficacy of this treatment.

## INTRODUCTION

Primary Sjogren's syndrome (pSS) is an auto-immune epithelitis leading to ocular and mucosal dryness, pain and various systemic manifestations<sup>1</sup>. pSS is characterized by lymphoid infiltration of the salivary glands (SGs) and lacrimal glands responsible for dryness and the secretion of autoantibodies. B lymphocytes play a key pathogenic role in pSS by their secretion of autoantibodies, proinflammatory cytokines, and antigen presentation. B-cell activating factor (BAFF) is crucial for the activation and survival of autoreactive B cells and for autoantibody secretion. Systemic lupus erythematosus- and SS-like symptoms spontaneously develop in BAFF transgenic mice<sup>2,3</sup>. In patients with pSS, BAFF levels are increased in serum, saliva, and SGs<sup>4,5</sup>. In pSS, BAFF is expressed by dendritic cells and monocytes but also salivary and conjunctival epithelial cells and some autoreactive B and T cells<sup>5,6</sup>. An open-label phase II study suggested the efficacy of belimumab, an inhibitor of BAFF, in nearly two thirds of pSS patients, as assessed by an alleviation of disease indicators, including dryness, pain, fatigue, systemic activity, and B-cell biomarkers<sup>7</sup>. Two randomized controlled trials -- a trial combining rituximab and belimumab, and a trial using a B cell-depleting, BAFF receptor-blocking monoclonal antibody, ivalumab -- showed a decrease in systemic disease activity and an improvement in salivary dryness<sup>8,9</sup>.

The efficacy of BAFF specific inhibition has not been assessed in animal models of pSS. NOD mice are mostly used as an animal model for type 1 diabetes but also exhibit relevant features of pSS. Female NOD mice have focal infiltrates in SGs typically between age 8 and 12 weeks, which increase over time<sup>10</sup>. NOD mice show the same progressive decrease in salivary flow as pSS patients<sup>11</sup>. Analyses of lymphocyte populations infiltrating the exocrine tissues have revealed a similar profile in NOD islets and human SS, with a predominance of T-cell receptor  $\alpha\beta^+$  and CD4<sup>+</sup> T cells and significantly fewer CD8<sup>+</sup> T or B cells<sup>12</sup>. Anti-Ro/SSA and autoantibodies against the

muscarinic 3 receptor, the acetylcholine receptor responsible for fluid secretion from the SGs, can be detected in sera from NOD mice <sup>12,13</sup>.

Sandy-2, a mouse monoclonal antibody that inhibits BAFF, was developed <sup>14</sup>. Sandy-2 blocks mouse BAFF and prevents it from binding to BAFF receptor, transmembrane activator and CAML interactor (TACI) and B-cell maturation antigen (BCMA). B-cell depletion by administration of Sandy-2 *in vivo* phenocopies BAFF-knockout mice. The B-cell depletion achieved in mice with Sandy-2 administration exceeds that achievable in humans with belimumab.

We investigated the potential effect of this monoclonal antibody that blocks BAFF and depletes B cells in the NOD mouse model of pSS.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Mice and treatment***

Female NOD mice were bred in the animal facility of Hôpital Necker-Enfants Malades, INSERM U1013-CNRS UMR 8147, under specific pathogen-free conditions. The B-cell depleting, mouse BAFF blocking monoclonal antibody (Sandy-2) and its isotype control (EctoD1, a mouse IgG1 anti-ectodysplasin) were used as previously described<sup>14</sup>. The animal experimentation was conducted according to the “Principles of Laboratory Animal Care” and the experiments were approved by the French Ministry of Education and Research (no. 04463.02; 19/08/2016).

Sandy-2 or its isotype control, at 2 mg/kg, was injected intraperitoneally every other week from age 10 to 18 weeks. In total, 31 mice received Sandy-2 and 30 the isotype control.

With the exception of the measure of stimulated salivary flow, experiments were performed at sacrifice in surviving mice that had not become diabetic between age 18 and 20 weeks.

### ***Stimulated salivary flow***

Mice were anesthetised with a mild anesthesia induced by 100 µL/10 g body weight of a solution of ketamine (30 µL; Centravet, Maison-Alfort, France) and xylazine (100 µL at 2%; Centravet) with 1 mL sterile water, given i.p. Saliva secretion was induced by subcutaneous injection of pilocarpine (0.5 mg/kg body weight; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Stimulated whole saliva was collected for 20 min from the oral cavity with hematocrit tubes and placed into pre-weighed 1.2-mL microcentrifuge tubes. Volume was determined gravimetrically. To smooth out the differences that may be related to the dose and injection of pilocarpine according to the experiments, we present the variation in salivary flow in delta (difference between the value at 20 weeks and the baseline value [10 weeks]). Delta of stimulated salivary flow was assessed in 27 mice (16 receiving Sandy-2 and 11 the isotype control).

### ***Histology***

Sections from the submandibular glands of NOD mice at age 18 to 20 weeks were examined histologically. SGs were embedded in paraffin. Sections were cut at 7  $\mu\text{m}$ , and six non-consecutive sections were stained with hematoxylin and eosin. The focus score (FS) was determined<sup>15</sup>, one focus defined as an aggregate of  $\geq 50$  lymphocytes and the FS defined as the average number of foci per 4  $\text{mm}^2$  SG tissue. Submandibular glands were also graded according to the scale of Chisholm and Mason<sup>16</sup>: 0 = absent infiltrates, 1 = slight infiltrates, 2 = moderate infiltrates or  $< 1$  focus per 4  $\text{mm}^2$ , 3 = 1 focus per 4  $\text{mm}^2$ , 4 =  $> 1$  focus per 4  $\text{mm}^2$ .

For immunofluorescence microscopy, paraffin sections were stained with primary anti-CD3 polyclonal rabbit antibody (DAKO) and anti-B220 biotin (clone RA3-6B2; eBioscience) and Streptavidin-Alexa-Fluor 546 (Molecular Probes) and goat anti-rabbit IgG Alexa-Fluor 647 (Life Technologies) as secondary antibodies. To determine the proportion of B cells in SG infiltrates, the proportion of B220-positive area to total lymphocytic infiltrates was assessed. Treatment and analyses were performed with Fiji (ImageJ) software. The FS was assessed in 23 mice (14 receiving Sandy-2 and 9 the isotype control) and immunostaining was performed in 15 mice (9 and 6 mice, respectively).

### ***Flow cytometry***

Blood cells, lymph node cells, SG cells and splenic cells were obtained from individual mice at sacrifice.

Submandibular glands were removed at sacrifice and one gland was used for flow cytometry. After removal, the digestive milieu (RPMI 2% BSA, Collagenase D: 1.5 mg/ml, DNase I: 1U/ml; RPMI, Gibco; BSA, Gibco; Collagenase, Roche, Boulogne-Billancourt, France; DNase I, Invitrogen,

Carlsbad, CA, USA) was injected directly in situ and left for 5 min at room temperature. Then glands were mashed by using gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec, Bergisch, Germany), digested again in the same digestive milieu for 30 min at 37°C and mashed again. The cellular suspension was passed through a 70-µm filter before staining.

After removal, the spleen was immersed in 3 mL PBS-2% FCS, and submandibular lymph node cells were immersed in 1 mL PBS-2% FCS, then mashed on a 100-µm filter. Cellular suspensions were centrifuged and incubated into 1 mL ammonium-chloride-potassium for 4 min at 4°C. Finally, cells were washed, counted and distributed in a 96-well plate.

An amount of 200 µL blood was collected by intracardiac puncture after anaesthesia with urethane (600-800 µL i.p. at 75 mg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in a heparinised micro-tube (Sanofi-Aventis, Paris, France).

Cells were stained for 30 min at 4°C with the following antibodies/reagents: CD45 APC-Cy7 (clone 30-F11, BioLegend, San Diego, CA, USA), CD19 FITC (clone 1D3, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), CD3e PerCP (clone 145-2C11, BD Pharmingen), CD4 V450 (clone RM4-5, BD Pharmingen), CD8a/Ly-2 PE (clone 53-6.7, eBioscience, San Diego, CA, USA), Fixable Viability Dye EF506 (eBioscience), CD45.1 FITC (clone A20, BD Pharmingen), CD3e APC (clone 145-2C11, BD Pharmingen), CD4 V450 (clone RM4-5, BD Pharmingen), CD8a/Ly-2 PE (clone 53-6.7, eBioscience), CD19 PE-Cy7 (clone 1D3, BD Pharmingen), CD4 PerCP (clone RM4-5, BD Pharmingen) and FoxP3 APC (clone FJK-16S, eBioscience). Antibodies used for staining (volume per volume for a final dilution of 1/200 in 2% PBS-FCS, GIBCO) were incubated with cells for 30 min at 4°C. FoxP3 intracellular staining was performed after permeabilization using a Foxp3/Transcription Factor staining buffer set (00-5523-00, eBioscience).

For blood cells, a red blood cell lysing solution (349202, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) was added for 15 min at room temperature. Finally, cells were centrifuged for 5 min at 400 g and washed twice with PBS-2% FCS.

SGs were stained with fixable viability dye before other stainings and incubated for 10 min at 4°C in the dark. Cell acquisition involved a Canto II cytometer (BD Biosciences). Data were analyzed with FlowJo (Tree Star).

### ***Transcriptomic analysis***

From one of the two salivary glands taken from mice receiving Sandy-2 (n=5) or the isotype control (n=4), total RNA was isolated and reverse transcribed to cDNA by using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA quality was validated by using the RNA 6000 Nano Kit and the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). An amount of 75 ng total RNA was reverse transcribed by using the GeneChip WT Plus Reagent kit (ThermoFisher Scientific reference: 902281), without globin mRNA reduction. Briefly, the resulting double-stranded cDNA was used for in vitro transcription with T7 RNA polymerase. After purification, 5.5 µg of the resulting sense-strand cDNA was fragmented and labelled with biotin. These steps involved using the GeneChip WT Plus Reagent kit according to the manufacturer's instructions. After size analysis of fragmented sense-strand cDNA using the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), cDNA was then hybridized to the GeneChip Clariom S Human (Affymetrix) at 45°C for 17 hr. After hybridization, chips were washed on the GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix) according to the manufacturer's instructions and scanned by using the GeneChip Scanner 3000 7G system. The scanned images were then analysed by using Expression Console software (Affymetrix) to obtain raw data (.cel files) and quality control metrics.

### ***Statistical analysis***

Differences were assessed with the nonparametric Mann–Whitney test. Spearman rank correlation was used for correlation analysis. All the analyses were performed with GraphPadPrism 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).  $P < 0.05$  was considered statistically significant. Genes with adjusted absolute fold change in expression  $>2$  and  $P < 0.05$  were identified as differentially expressed genes (DEGs). Gene Ontology (GO) annotation of DEGs involved using Enrichr<sup>17</sup> and GO<sup>18</sup> databases. Significantly enriched Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathways and GO terms were identified at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### *Anti-BAFF therapy significantly decreased SG lymphocytic infiltrates and increased salivary flow*

Anti-BAFF antibody treatment significantly decreased SG infiltrates as compared with the isotype control (median FS 1.8 [interquartile range 1.1-2.5] vs 3.9 [3.5-4.8],  $p=0.002$ , **Fig. 1A-C**) and significantly increased salivary flow (median difference between sacrifice value and baseline value [10 weeks] 2.1 [0.8-4.2] vs 0.6 [-1.6-1.9],  $p=0.020$  **Fig. 1D**). Salivary flow rate ratio was inversely correlated with the FS ( $r^2=0.31$ ,  $p=0.0093$ , **Fig. 1E**).

### *Anti-BAFF therapy markedly decreased B-cell number in blood, spleen, lymph nodes and SGs*

Anti-BAFF antibody treatment markedly decreased B-cell number assessed by flow cytometry, as compared with the isotype control, in blood (proportion of B lymphocytes among total lymphocytes: median 12.0% [4.9-26.4] vs 29.2% [23.3-40.6],  $p=0.02$ ), SGs (3.1% [1.1-61.1] vs 22.6% [16.4-38.3],  $p<0.0001$ ), spleen (7.2% [6.7-13.5] vs 43.0% [42.1-46.2],  $p<0.0001$ ) and submandibular lymph nodes (3.6% [1.1-5.5] vs 25.2% [22.4-39.6],  $p=0.06$ ) (**Fig. 2A**). Anti-BAFF antibody treatment also decreased B-cell staining in SG tissue as compared with the isotype control (median stained area of B220<sup>+</sup> infiltrates: 5.1 [1.5-12.5] vs 34.0 [14.8-40.5],  $p=0.0028$ , **Fig. 2B-D**).

### ***Treatment-induced increase in regulatory T-cell subsets in SGs and spleen***

#### ***Total CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> subpopulations***

Anti-BAFF antibody treatment decreased the proportion of CD4<sup>+</sup> T cells in SGs but not blood, spleen or lymph nodes as compared with the isotype control (median proportion of CD4<sup>+</sup> T cells among total T cells in SGs: 46.8% [41.8-49.1] vs 57.4% [50.5-61.9],  $p=0.0007$ ; blood: 74.6% [72.9-76.1] vs 74.7 [72.7-77.6],  $p=0.86$ ; spleen: 66.8% [65.1-70.4] vs 67.6% [64.1-68.2],  $p=0.91$ ; lymph nodes: 70.9% [68.4-73.7] vs 72.7% [70.6-73.7],  $p=0.86$ ; **Fig. 3A**). The two treatments did not differ in proportion of CD8<sup>+</sup> T cells in SGs, blood, spleen or lymph nodes (median proportion of CD8<sup>+</sup> T cells among total T cells in SGs: 19.0% [15.8-23.5] vs 19.3% [16.5-24.3],  $p=0.55$ ; blood: 25.4% [23.9-27.2] vs 25.3 [22.5-27.3],  $p=0.86$ ; spleen: 28.5% [27.2-30.2] vs 27.2% [26.5-29.7],  $p=0.19$ ; lymph nodes: 27.5% [24.9-29.8] vs 24.7% [24.6-27.5],  $p=0.46$ ; **Fig. 3B**).

Anti-BAFF antibody treatment increased the proportion of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> double negative (DN) T cells in SGs but not spleen or lymph nodes as compared with the isotype control (proportion of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> DN T cells among total CD3<sup>+</sup> T lymphocytes in SGs: 37.5% [26.5-39.8] vs 22.7% [17.3-26.5],  $p=0.0007$ ; spleen: 3.9% [3.5-4.6] vs 4.8% [2.8-16.2],  $p=0.63$ ; lymph nodes: 1.1% [0.9-1.4] vs 1.3% [0.9-2.1],  $p=0.94$ ; **Fig. 3C**). The proportion of salivary DN CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T cells was inversely correlated with the FS ( $r^2 = 0.65$ ,  $p = 0.027$ ; **Fig. 3E**).

#### ***Regulatory T-cells***

Anti-BAFF antibody treatment increased the proportion of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in SGs but not spleen or lymph nodes as compared with the isotype control (median proportion of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells among total CD4<sup>+</sup> T cells in SGs: 33.0% [30.7-34.9] vs 25.4% [23.4-29.6],  $p=0.0014$ ; spleen: 14.9% [14.7-15.8] vs 14.3% [13.0-17.9],  $p=0.63$ ; lymph nodes: 13.1% [10.2-13.3] vs 13.3% [9.6-15.6],  $p=0.80$ ; **Fig. 3D**). The proportion of salivary Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells was not significantly correlated with the FS ( $r^2 = 0.24$ ,  $p = 0.32$ ; **Fig. 3F**).

### *Transcriptomics analysis of therapy-induced gene expression change in SGs*

We used transcriptomic analysis to analyse mRNA SG expression. A total of 85 genes were differentially expressed: 27 downregulated and 58 upregulated (**Fig. 4A-B**). On GO analysis, “biological process” and “cellular component” terms were identified ( $p < 0.05$ , **Fig. 4C-D**). The antigen receptor-mediated and T-cell receptor signalling pathways were the two most enriched biological processes ( $p = 1.39 \times 10^{-5}$  and  $5.78 \times 10^{-5}$ , respectively). The B-cell receptor signalling pathway was also significantly enriched ( $p = 4.03 \times 10^{-4}$ ). Eleven (13%) DEGs were related to the homeostasis and function of T regulatory cells (Tregs; **Fig. 4A**).

## DISCUSSION

The present results demonstrate a significant decrease in lymphocytic infiltration of SGs and a significant improvement in salivary flow with BAFF inhibition. They confirm the pathogenic role of BAFF and B cells in pSS.

No previous data were available regarding the efficacy of specific BAFF inhibition in animal models of pSS. Of note, BAFF and APRIL inhibition using BCMA-Fc ameliorated insulinitis in NOD mice <sup>19</sup>, but the effect of their inhibition on salivary infiltrates and salivary flow was not studied. TACI-Fc gene therapy to inhibit BAFF and APRIL, reduced SG lymphocytic infiltrates in NOD mice but had no effect on dryness <sup>20</sup>. Overexpression of  $\Delta$ BAFF, a physiological inhibitor of BAFF, in SGs decreased SG infiltrates and improved salivary flow in the NOD mouse model <sup>21</sup>, with no marked decrease in BAFF expression.

In the present study, the efficacy of BAFF-specific inhibition was related to deep immunological changes affecting not only B but also T cells. First, the treatment with this mouse monoclonal antibody against BAFF markedly depleted B cells, as expected and previously reported <sup>14</sup>. The decrease in B-cell proportion was even more striking in SGs and lymph nodes rather than in blood or spleen, which might be related to the higher dependence on BAFF of auto-reactive B cells that infiltrate SGs than allo-reactive B cells, which are more abundant in blood and spleen <sup>22</sup>. In addition, transitional B cells, the stage for which B-cell differentiation requires BAFF, do not express CD62L, which allows more mature B cells to home to lymph nodes <sup>23</sup>. This dual effect (BAFF inhibition and B-cell depletion) might contribute to the decrease in dryness we observed, as in a trial combining rituximab and belimumab <sup>8</sup> and in one using a B cell-depleting BAFF receptor-blocking monoclonal antibody <sup>9,24</sup>.

Indeed, several arguments suggest that targeting BAFF and B cells could have a synergistic effect<sup>25</sup>. The ectopic expression of BAFF in inflamed tissues was found an important factor mediating the resistance to B-cell depletion by rituximab<sup>26,27</sup>. The upregulation of BAFF after B-cell depletion could contribute to the repopulation of autoreactive B cells<sup>28</sup>. Plasmablasts can persist in the peripheral blood after rituximab treatment because they do not express CD20 and because of BAFF-driven survival<sup>29</sup>. In addition, the increase in circulating memory B cells observed after treatment with belimumab, a BAFF-blocking antibody, likely renders B cells more susceptible to rituximab-mediated depletion<sup>30</sup>.

The role of BAFF on T-cell function has been known for decades but is often sidelined by the choice to focus on the impact of BAFF on B cells<sup>31</sup>. In the present study, BAFF inhibition increased regulatory T-lymphocyte populations, which might contribute to the therapeutic efficacy observed. The increase in proportion of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells agrees with three studies evaluating B-cell targeted therapies (anti-CD20<sup>32</sup>, anti-CD22<sup>33</sup> and BCMA-Fc<sup>19</sup>) in diabetes in NOD mice but not with another study evaluating BAFF inhibition<sup>34</sup>. In humans, belimumab therapy could restore the Treg/T helper 17 cell balance in patients with refractory systemic lupus erythematosus and the number of Tregs increased after belimumab therapy and were fully functional<sup>35</sup>. However, the protective role of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells remains uncertain in patients with pSS<sup>36-39</sup>.

The proportion of another potentially regulatory T-cell population, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> cells, was increased after BAFF inhibition and B-cell depletion in SGs. In NOD mice, CD4<sup>+</sup> T cells converted to pancreatic islet B-cell antigen-specific DN T cells can prevent the development of autoimmune diabetes and promote islet allograft survival<sup>40</sup>. These splenic DN T cells from young NOD mice also provided long-lasting protection against diabetes transfer in NOD/Scid immunodeficient mice

<sup>41</sup>. We found increased proportion of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> cells in SGs, which was inversely correlated with the FS which suggests a regulatory role of this population in mice. The expansion of these DN cells might also explain the decrease in total CD4<sup>+</sup> T cells in SGs that may be “converted” within SGs (i.e., lose their CD4<sup>+</sup> expression). In the context of pSS, a higher proportion of DN T cells in SGs was found associated with more severe tissue inflammation, presence of germinal centre-like structures and major xerostomia <sup>42</sup>. This increase in proportion of DN T cells with disease severity can reflect a compensatory but insufficient regulatory mechanism in patients with pSS or a different role of DN T cells in humans and mice.

Our transcriptomic results complemented those of flow cytometry on the impact on T cells, BAFF inhibition and B-cell depletion. The antigen receptor-mediated, T-cell receptor and B-cell signalling pathways were the most enriched biological processes. Cd79a, also known as B-cell antigen receptor complex-associated protein alpha chain, was significantly downregulated. CD79a is expressed on the surface of B cells throughout their life cycle <sup>43</sup>. The association of the CD79a/b heterodimer with immunoglobulin heavy chain is required for surface expression of the B-cell receptor <sup>44</sup>. Differential expression of genes involved in Treg ontogeny might reflect the impact of BAFF-specific inhibition and B-cell depletion on Tregs. Thus, the IL-7 receptor, which supports the functional activity of effector Tregs by increasing their IL-2 sensitivity <sup>45</sup>; Ccl21b, increasing Treg function and migration <sup>46</sup>; and Il-27ra, essential for Foxp3<sup>+</sup> Treg suppressive function <sup>47</sup> were upregulated in treated mice in the present study. Nr4a3, expressed by Tregs and B regulatory cells, was upregulated after BAFF-specific inhibition. Of note, excess BAFF was recently found to decrease Nr4a3 expression and B regulatory cell function <sup>48</sup>. Therefore, the results of the transcriptomic analysis agree with those of flow cytometry regarding the increase in regulatory populations after BAFF blockade and B-cell depletion.

In conclusion, a monoclonal antibody that blocks BAFF and depletes B cells significantly improved dryness and markedly reduced SG lymphocytic infiltrates in the NOD mouse model of pSS. The increase in regulatory T-lymphocyte populations might underlie the efficacy of BAFF inhibition and B-cell depletion. This study strengthens the rationale to target BAFF and B cells in pSS.

## REFERENCES

- 1 Mariette X, Criswell LA. Primary Sjögren's Syndrome. *N Engl J Med* 2018; **378**: 931–9.
- 2 Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, *et al*. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med* 1999; **190**: 1697–710.
- 3 Groom J, Kalled SL, Cutler AH, *et al*. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. *J Clin Invest* 2002; **109**: 59–68.
- 4 Mariette X, Roux S, Zhang J, *et al*. The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2003; **62**: 168–71.
- 5 Lavie F, Miceli-Richard C, Quillard J, Roux S, Leclerc P, Mariette X. Expression of BAFF (BLyS) in T cells infiltrating labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *J Pathol* 2004; **202**: 496–502.
- 6 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.
- 7 Mariette X, Seror R, Quartuccio L, *et al*. Efficacy and safety of belimumab in primary Sjögren's syndrome: results of the BELISS open-label phase II study. *Ann Rheum Dis* 2013; published online Dec 17. DOI:10.1136/annrheumdis-2013-203991.
- 8 Mariette X, Barone F, Baldini C, *et al*. A randomized, phase II study of sequential belimumab and rituximab in primary Sjögren's syndrome. *JCI Insight* 2022; **7**: e163030.
- 9 Bowman SJ, Fox R, Dörner T, *et al*. Safety and efficacy of subcutaneous ianalumab (VAY736) in patients with primary Sjögren's syndrome: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b dose-finding trial. *Lancet Lond Engl* 2022; **399**: 161–71.
- 10 Yamano S, Atkinson JC, Baum BJ, Fox PC. Salivary gland cytokine expression in NOD and normal BALB/c mice. *Clin Immunol Orlando Fla* 1999; **92**: 265–75.
- 11 Chiorini JA, Cihakova D, Ouellette CE, Caturegli P. Sjögren syndrome: Advances in the pathogenesis from animal models. *J Autoimmun* 2009; **33**: 190–6.
- 12 Skarstein K, Wahren M, Zaura E, Hattori M, Jonsson R. Characterization of T cell receptor repertoire and anti-Ro/SSA autoantibodies in relation to sialadenitis of NOD mice. *Autoimmunity* 1995; **22**: 9–16.
- 13 Robinson CP, Brayer J, Yamachika S, *et al*. Transfer of human serum IgG to nonobese diabetic Igmu null mice reveals a role for autoantibodies in the loss of secretory function of exocrine tissues in Sjögren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 7538–43.
- 14 Kowalczyk-Quintas C, Schuepbach-Mallepell S, Vigolo M, *et al*. Antibodies that block or activate mouse B cell activating factor of the TNF family (BAFF) respectively induce B cell depletion or B cell hyperplasia. *J Biol Chem* 2016; : jbc.M116.725929.
- 15 Greenspan JS, Daniels TE, Talal N, Sylvester RA. The histopathology of Sjögren's syndrome in labial salivary gland biopsies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974; **37**: 217–29.
- 16 Chisholm DM, Mason DK. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's disease. *J Clin Pathol* 1968; **21**: 656–60.

- 17 Chen EY, Tan CM, Kou Y, *et al.* Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 2013; **14**: 128.
- 18 Ashburner M, Ball CA, Blake JA, *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 2000; **25**: 25–9.
- 19 Mariño E, Villanueva J, Walters S, Liuwantara D, Mackay F, Grey ST. CD4(+)CD25(+) T-cells control autoimmunity in the absence of B-cells. *Diabetes* 2009; **58**: 1568–77.
- 20 Vosters JL, Roescher N, Illei GG, Chiorini JA, Tak PP. TACI-Fc gene therapy improves autoimmune sialadenitis but not salivary gland function in non-obese diabetic mice. *Oral Dis* 2012; **18**: 365–74.
- 21 Roescher N, Vosters JL, Alsaleh G, *et al.* Targeting the Splicing of mRNA in Autoimmune Diseases: BAFF Inhibition in Sjögren's Syndrome as a Proof of Concept. *Mol Ther* 2014; **22**: 821–7.
- 22 Liu Z, Davidson A. BAFF and selection of autoreactive B cells. *Trends Immunol* 2011; **32**: 388–94.
- 23 Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 2005; **105**: 4390–8.
- 24 Dörner T, Posch MG, Li Y, *et al.* Treatment of primary Sjögren's syndrome with ialumab (VAY736) targeting B cells by BAFF receptor blockade coupled with enhanced, antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Ann Rheum Dis* 2019; **78**: 641–7.
- 25 Gandolfo S, De Vita S. Double anti-B cell and anti-BAFF targeting for the treatment of primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 2019; **37 Suppl 118**: 199–208.
- 26 Gong Q, Ou Q, Ye S, *et al.* Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. *J Immunol Baltim Md 1950* 2005; **174**: 817–26.
- 27 Wild J, Schmiedel BJ, Maurer A, *et al.* Neutralization of (NK-cell-derived) B-cell activating factor by Belimumab restores sensitivity of chronic lymphoid leukemia cells to direct and Rituximab-induced NK lysis. *Leukemia* 2015; **29**: 1676–83.
- 28 Lavie F, Miceli-Richard C, Ittah M, Sellam J, Gottenberg J-E, Mariette X. Increase of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) after rituximab treatment: insights into a new regulating system of BAFF production. *Ann Rheum Dis* 2007; **66**: 700–3.
- 29 Pers J-O, Devauchelle V, Daridon C, *et al.* BAFF-modulated repopulation of B lymphocytes in the blood and salivary glands of rituximab-treated patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2007; **56**: 1464–77.
- 30 Teng YKO, Bruce IN, Diamond B, *et al.* Phase III, multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, 104-week study of subcutaneous belimumab administered in combination with rituximab in adults with systemic lupus erythematosus (SLE): BLISS-BELIEVE study protocol. *BMJ Open* 2019; **9**: e025687.
- 31 Mackay F, Leung H. The role of the BAFF/APRIL system on T cell function. *Semin Immunol* 2006; **18**: 284–9.
- 32 Hu C, Rodriguez-Pinto D, Du W, *et al.* Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. *J Clin Invest* 2007; **117**: 3857–67.
- 33 Fiorina P, Vergani A, Dada S, *et al.* Targeting CD22 reprograms B-cells and reverses autoimmune diabetes. *Diabetes* 2008; **57**: 3013–24.

- 34 Zekavat G, Rostami SY, Badkerhanian A, *et al.* In vivo BlyS/BAFF neutralization ameliorates islet-directed autoimmunity in nonobese diabetic mice. *J Immunol Baltim Md 1950* 2008; **181**: 8133–44.
- 35 Prete M, Leone P, Frassanito MA, *et al.* Belimumab restores Treg/Th17 balance in patients with refractory systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2018; **27**: 1926–35.
- 36 Gottenberg J-E, Lavie F, Abbed K, *et al.* CD4 CD25high regulatory T cells are not impaired in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Autoimmun* 2005; **24**: 235–42.
- 37 Li X, Li X, Qian L, *et al.* T regulatory cells are markedly diminished in diseased salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 2007; **34**: 2438–45.
- 38 Liu M-F, Lin L-H, Weng C-T, Weng M-Y. Decreased CD4+CD25+bright T cells in peripheral blood of patients with primary Sjögren's syndrome. *Lupus* 2008; **17**: 34–9.
- 39 Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos NM, Moutsopoulos HM. Foxp3+ T-regulatory cells in Sjogren's syndrome: correlation with the grade of the autoimmune lesion and certain adverse prognostic factors. *Am J Pathol* 2008; **173**: 1389–96.
- 40 Zhang D, Zhang W, Ng TW, *et al.* Adoptive cell therapy using antigen-specific CD4-CD8-T regulatory cells to prevent autoimmune diabetes and promote islet allograft survival in NOD mice. *Diabetologia* 2011; **54**: 2082–92.
- 41 Duncan B, Nazarov-Stoica C, Surls J, *et al.* Double negative (CD3+ 4- 8-) TCR alpha beta splenic cells from young NOD mice provide long-lasting protection against type 1 diabetes. *PLoS One* 2010; **5**: e11427.
- 42 Alunno A, Carubbi F, Bistoni O, *et al.* CD4(-)CD8(-) T-cells in primary Sjögren's syndrome: association with the extent of glandular involvement. *J Autoimmun* 2014; **51**: 38–43.
- 43 Sakaguchi N, Kashiwamura S, Kimoto M, Thalmann P, Melchers F. B lymphocyte lineage-restricted expression of mb-1, a gene with CD3-like structural properties. *EMBO J* 1988; **7**: 3457–64.
- 44 Yang J, Reth M. Oligomeric organization of the B-cell antigen receptor on resting cells. *Nature* 2010; **467**: 465–9.
- 45 Schmalzer M, Broggi MAS, Lagarde N, *et al.* IL-7R signaling in regulatory T cells maintains peripheral and allograft tolerance in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; **112**: 13330–5.
- 46 Chauhan SK, Saban DR, Dohlman TH, Dana R. CCL-21 conditioned Tregs induce allotolerance through enhanced homing to lymphoid tissue. *J Immunol Baltim Md 1950* 2014; **192**: 817–23.
- 47 Do J -s, Visperas A, Sanogo YO, *et al.* An IL-27/Lag3 axis enhances Foxp3+ regulatory T cell-suppressive function and therapeutic efficacy. *Mucosal Immunol* 2016; **9**: 137–45.
- 48 Doyon-Laliberté K, Aranguren M, Byrns M, *et al.* Excess BAFF Alters NR4As Expression Levels and Breg Function of Human Precursor-like Marginal Zone B-Cells in the Context of HIV-1 Infection. *Int J Mol Sci* 2022; **23**: 15142.

**Figure 1: Sialadenitis and salivary flow**

*A: Representative section of a salivary gland of an anti-BAFF-treated NOD mouse (H&E staining). One focus can be observed (highlighted by the dotted green line).*

*B: Representative section of a salivary gland of an isotype control-treated NOD mouse. Three foci can be observed.*

*C: Focus score of anti-BAFF-treated mice (n=13) and isotype control (n=10). One focus defined as an aggregate of  $\geq 50$  lymphocytes and the FS defined as the average number of foci per 4 mm<sup>2</sup> SG tissue.*

*D: Change from baseline of stimulated salivary flow (final – baseline) in anti-BAFF-treated NOD mice (n = 16) and isotype control-treated NOD mice (n=11)*

*E: Correlation between change from baseline in stimulated salivary flow (final – baseline) and focus score after treatment of NOD mice (n=21).*

*Mann-Whitney and Spearman correlation: \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ . Data are median (interquartile range)*

**Figure 2: B-cell depletion**

*A: The proportion of CD19<sup>+</sup> B-cells to total lymphocytes in blood, salivary glands, spleen and lymph nodes determined by flow cytometry in NOD mice treated with anti-BAFF antibody (n=8, 12, 9 and 4 respectively) and isotype control (n=3, 13, 8 and 3 respectively)*

*B: The area of the infiltrate delimited on microscopy slides. The proportion of this area occupied by B220<sup>+</sup> cells was determined in salivary glands of NOD mice treated with anti-BAFF antibody (n=9) and isotype control (n=6).*

*C: Representative photograph of a salivary gland embedded in paraffin and stained with DAPI (blue), CD3 (green) and B220 (pink) from an anti-BAFF-treated NOD mouse.*

*D: Representative photograph of a salivary gland embedded in paraffin and stained with DAPI (blue), CD3 (green) and B220 (pink) from an isotype control-treated NOD mouse.*

*Mann-Whitney: NS: non-significant \*:  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ . Data are median (interquartile range).*

**Figure 3: Modifications of T-cell subpopulations**

*A: Proportion of CD4<sup>+</sup> T cells among all T cells in blood, salivary glands, spleen and lymph nodes of NOD mice treated with anti-BAFF antibody (n=4, 13, 8 and 4, respectively) or the isotype control (n=3, 12, 8 and 3, respectively)*

*B: Proportion of CD8<sup>+</sup> T cells among all T cells in blood, salivary glands, spleen and lymph nodes of NOD mice treated with anti-BAFF antibody (n=4, 13, 9 and 4, respectively) or the isotype control (n=3, 12, 8 and 3, respectively).*

*C: Proportion of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> T cells among all T cells in salivary glands, spleen and lymph nodes of NOD mice treated with anti-BAFF antibody (n=13, 4 and 4 respectively) or the isotype control (n=12, 3 and 3, respectively).*

*D: Proportion of CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T cells among all T cells in salivary glands, spleen and lymph nodes of NOD mice treated with anti-BAFF antibody (n=13, 4 and 3, respectively) or the isotype control (n=12, 3 and 3 respectively).*

*Data are median (interquartile range).*

*E: Correlation between the proportion of salivary CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> T cells among all T cells and the focus score for NOD mice treated with anti-BAFF antibody (n=4) or the isotype control (n=2).*

*F: Correlation between the proportion of salivary CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells among all T cells and the focus score for NOD mice treated with anti-BAFF antibody (n=4) or the isotype control (n=3).*

*Mann-Whitney and Spearman correlation: \*\*: p < 0.01, \*\*\*: p < 0.001. NS = not significant*

**Figure 4: Transcriptomic analysis.**

*A: List of differentially expressed genes (DEGs) (absolute fold change in expression >2,  $p < 0.05$ ) and their known predominant implication in the pathophysiology of B cells, T cells, T regulatory cells (Tregs) and others. Among those involved in T-cell pathophysiology, those related to Tregs are in italics and their numbers are in brackets. \* Some genes might be involved in different pathways but were mentioned only once.*

*B: Volcano plot. The  $\log_2$  fold change indicates the mean expression level for each gene. Each dot represents one gene. After BAFF inhibition, grey dots represent no significant DEGs between the anti-BAFF therapy group and the isotype control group; the green dots represent downregulated genes and red dots upregulated genes.*

*C: Gene Ontology (GO) classifications of DEGs. With GO functional enrichment, "biological process", "molecular function" and "cellular component" are ranked by p-value (all  $p < 0.05$ ).*

*D: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment of DEGs.*

Figure 1

[Click here to access/download;Figure;Figure 1.jpg](#)

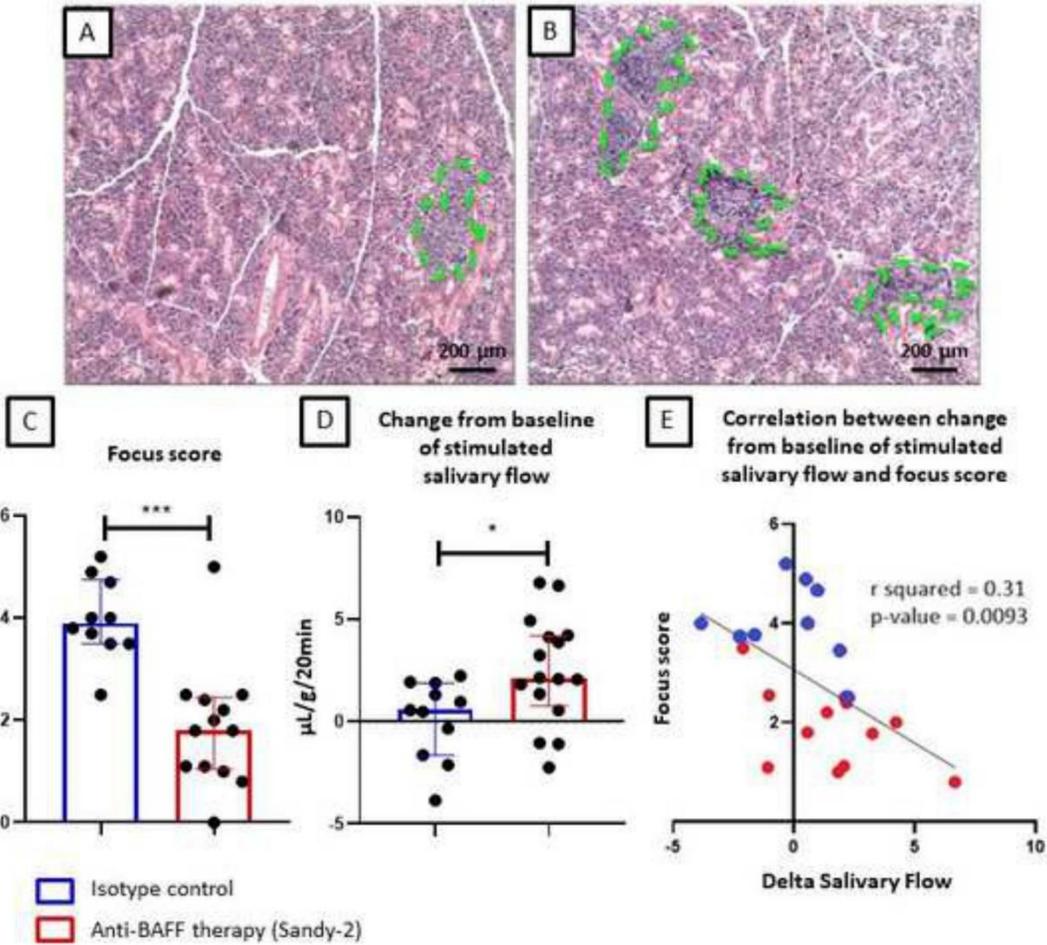


Figure 2

[Click here to access/download;Figure;Figure 2.jpg](#)

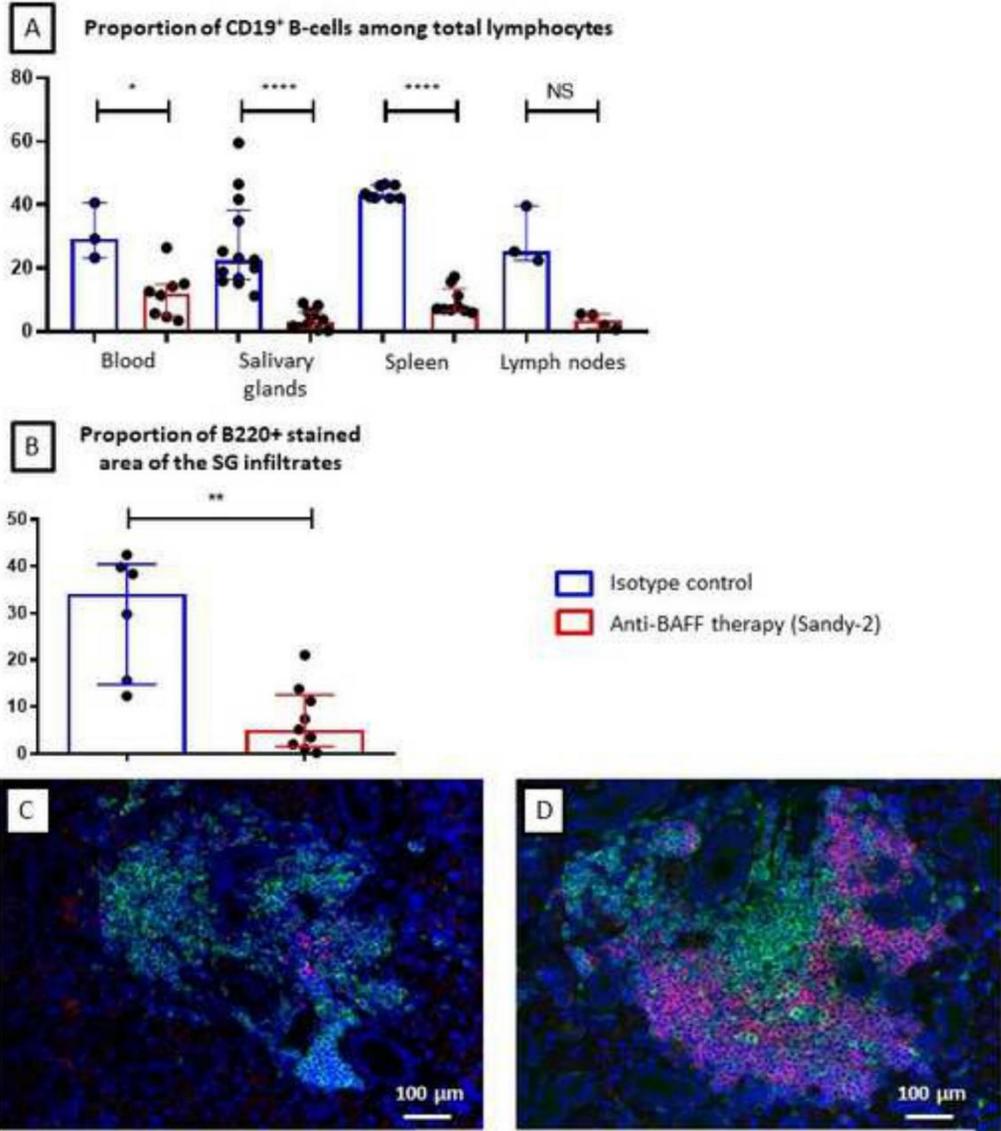


Figure 3

[Click here to access/download;Figure;Figure 3.jpg](#)

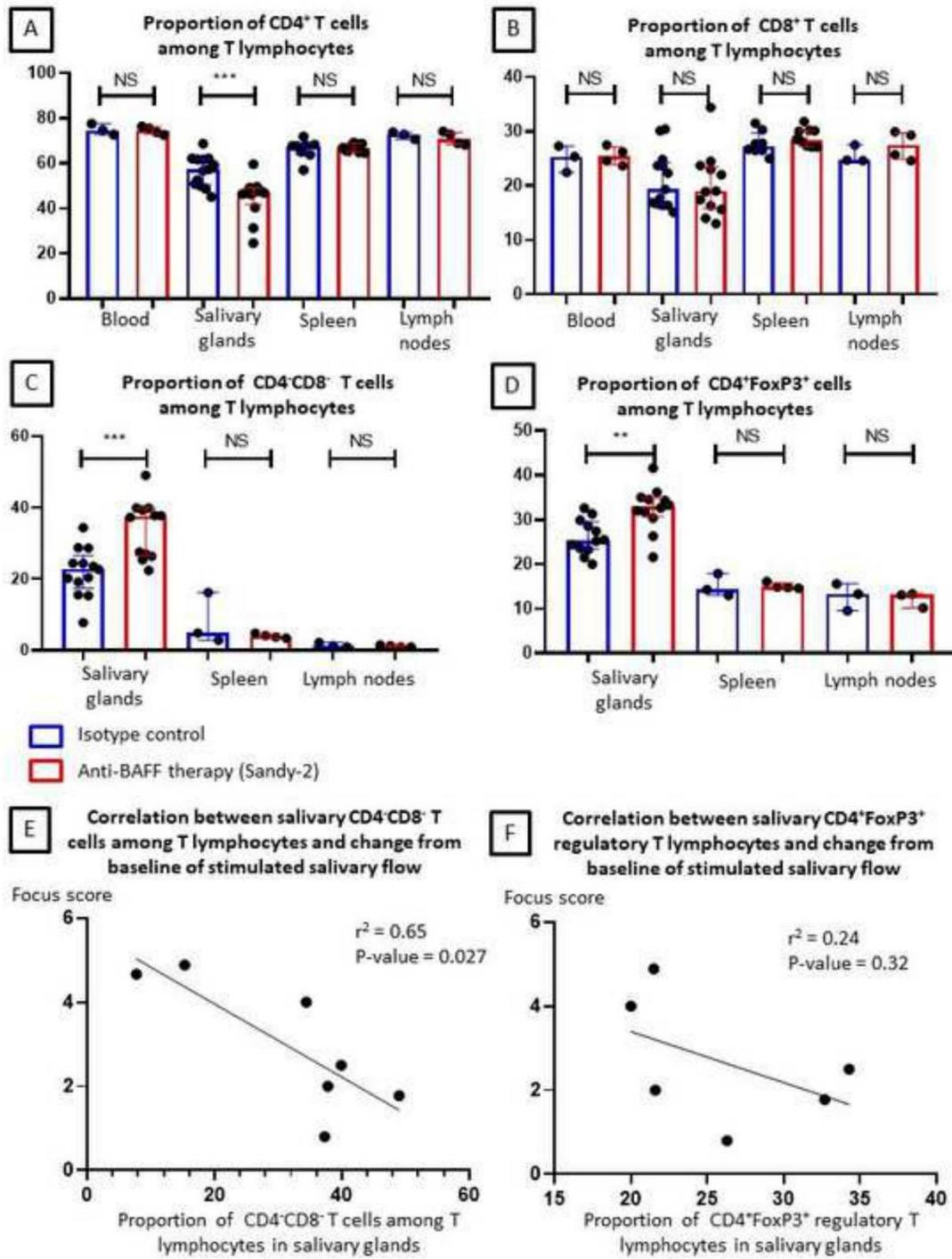
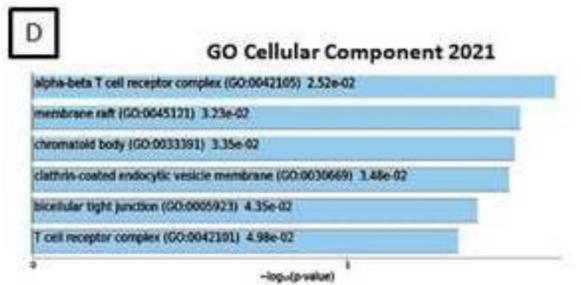
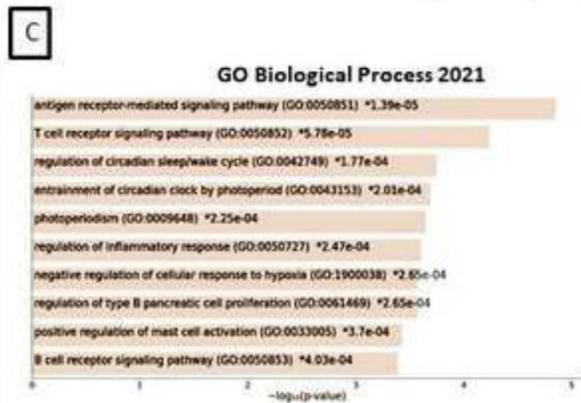
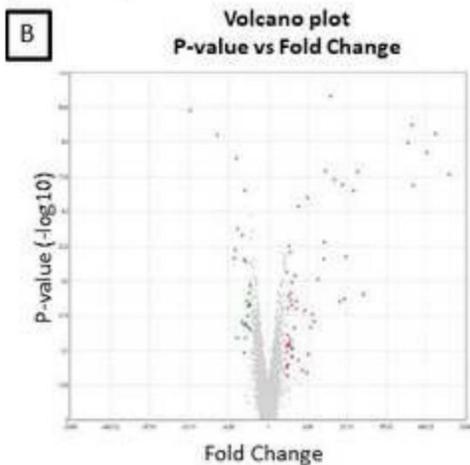


Figure 4

[Click here to access/download;Figure;Figure 4.jpg](#)

A	Predominant implication in pathophysiology*	Dysregulated genes	Number of genes	Total
Down-regulated DEGs	B cells	Cd79a;	1	27
	T cells (Treg)	<i>Gabrp</i> ; <i>Usp18</i> ; <i>Ifi44</i> ; <i>March1</i> ; <i>Aldh1a1</i> ;	5 (5)	
	Other cells	<i>Dbp</i> ; <i>Per3</i> ; <i>Nr1d1</i> ; <i>Usp2</i> ; <i>H2-DMb2</i> ; <i>Nr1d2</i> ; <i>Per2</i> ; <i>Dtna</i> ; <i>Iapp</i> ; <i>Cpxm2</i> ; <i>Coch</i> ; <i>Irf7</i> ; <i>Bhlhe41</i> ; <i>Cldn8</i> ; <i>Slc9a4</i> ; <i>Slco1a5</i> ; <i>Esp18</i> ; <i>Wee1</i> ; <i>Ank</i> ; <i>Mc4r</i> ; <i>Hepacam2</i>	21	
Up-regulated DEGs	B cells		0	58
	T cells (Treg)	<i>itk</i> ; <i>Lck</i> ; <i>Grap2</i> ; <i>Txk</i> ; <i>Themis</i> ; <i>Cd3d</i> ; <i>Cd226</i> ; <i>Ptger4</i> ; <i>il7r</i> ; <i>il27ra</i> ; <i>il6ra</i> ; <i>Nfil3</i> ;	12 (6)	
	Other cells	4833423E24Rik; Ms4a6b; Ddah1; Slc16a6; B4galnt3; Tuba4a; Gm13304; Gm10591; Galnt1; Arl4a; Scd2; Ttpa; Sphk1; Hyoul1; Dusp10; Man1a; Car3; Sell; Slitrk6; Rnase1; Npas2; St3gal6; Ggh; Ttr; Gm8882; Nr4a3; Cd27; Cd96; Amy2a1; Amy2b; Bpifa2; Arntl; Amy2a5; Odam; Amy2a2; Crisp1; Prmp5; Amy2a3; Amy2a4; Cldn22; Cst10; Amy1; Dnase1; Chia1; Bpifb1; Smr3a;	46	



# **DEUXIEME PARTIE**

**Etude de la présence et du rôle  
potentiel des ILCs dans le  
syndrome de Gougerot-Sjögren  
primaire**

# A.Introduction

## 1. Justification de l'étude des ILC dans la physiopathologie du SjP

### 1.1.Hypothèses sur la participation des ILC dans la physiopathologie du SjP

Les glandes salivaires accessoires (GSA) de patients atteints de SjP sont soumises à l'activation persistante du système immunitaire<sup>31</sup>. Or, il a été démontré que, lorsqu'elles sont hyperactivées de façon chronique par des stimuli inflammatoires, les ILC sont dérégulées et interviennent dans le développement de pathologies chroniques<sup>95</sup>. Il semble donc possible qu'un phénomène similaire ait lieu dans le SjP.

De plus, plusieurs études ont mis en évidence l'implication de l'axe IL-7/CD127 (sous-unité  $\alpha$  du récepteur à l'IL-7) dans la physiopathologie du SjP. En effet, chez les patients atteints de SjP, les cellules épithéliales glandulaires sécrètent de l'IL-7, sous l'influence de l'IFN, et les taux d'IL-7 sont augmentés dans le sang, les glandes salivaires et la salive<sup>173-175</sup>. L'expression de CD127 apparaît également majorée dans les glandes salivaires<sup>176</sup>. Le CD127 étant fortement exprimé par toutes les ILC, et l'IL-7 étant impliqué dans leur survie et leur fonction<sup>86,87</sup>, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une augmentation du nombre et d'une hyperactivation des ILC dans le SjP.

Les ILC pourraient donc être majorées et hyperactivées dans le SjP, et être sources de plusieurs cytokines impliquées dans la physiopathologie du SjP comme l'IFN- $\gamma$ , l'IL-22 ou l'IL-17<sup>83</sup>.

## 1.2. Données actuelles sur l'implication des cellules lymphoïdes innées auxiliaires dans la physiopathologie du SjP

A l'heure actuelle, seule une étude a spécifiquement concerné l'implication des ILC dans la physiopathologie du SjP. Blokland et al. ont étudié les ILC sanguines chez des patients atteints soit de SjP, soit de lupus<sup>177</sup>. Ils ont mis en évidence une association significative entre le taux sanguin d'ILC1 et l'activité du SjP. Ils ont également montré que la signature IFN de type I est corrélée à une surexpression de Fas par les ILC2 et ILC3 chez les patients atteints de SjP ou de lupus. Ces résultats suggèrent la participation probable des ILC dans la physiopathologie du SjP, mais restent limités. Ils justifient donc une exploration approfondie des ILC dans le SjP.

Une analyse complémentaire au sein des tissus cibles semble également justifiée, car les taux sanguins ne sont pas forcément représentatifs des taux tissulaires d'ILC. En effet, comme évoqué précédemment, les ILC peuvent migrer du sang vers les tissus, mais également s'auto-régénérer localement ou évoluer d'un sous-type à un autre en fonction du milieu. De plus, les ILC sont principalement résidentes des tissus, et l'analyse des tissus est plus représentative de la physiopathologie de la maladie.

## 2. Etude au laboratoire des proportions d'ILC sanguines et salivaires dans le SjP

La première étape de mon travail a été de mettre au point une technique d'identification des ILC sanguines par cytométrie en flux afin d'en étudier les proportions sanguines des ILC chez les patients atteints de SjP en comparaison de témoins sains.

Les ILC ont été recherchées parmi les PBMC par une approche en cytométrie en flux. La stratégie d'identification des ILC, mise au point à partir des données de la littérature<sup>178-181</sup>, était la suivante, avoir éliminé les doublets et les cellules mortes (DAPI<sup>+</sup>) (**figure 15**) :

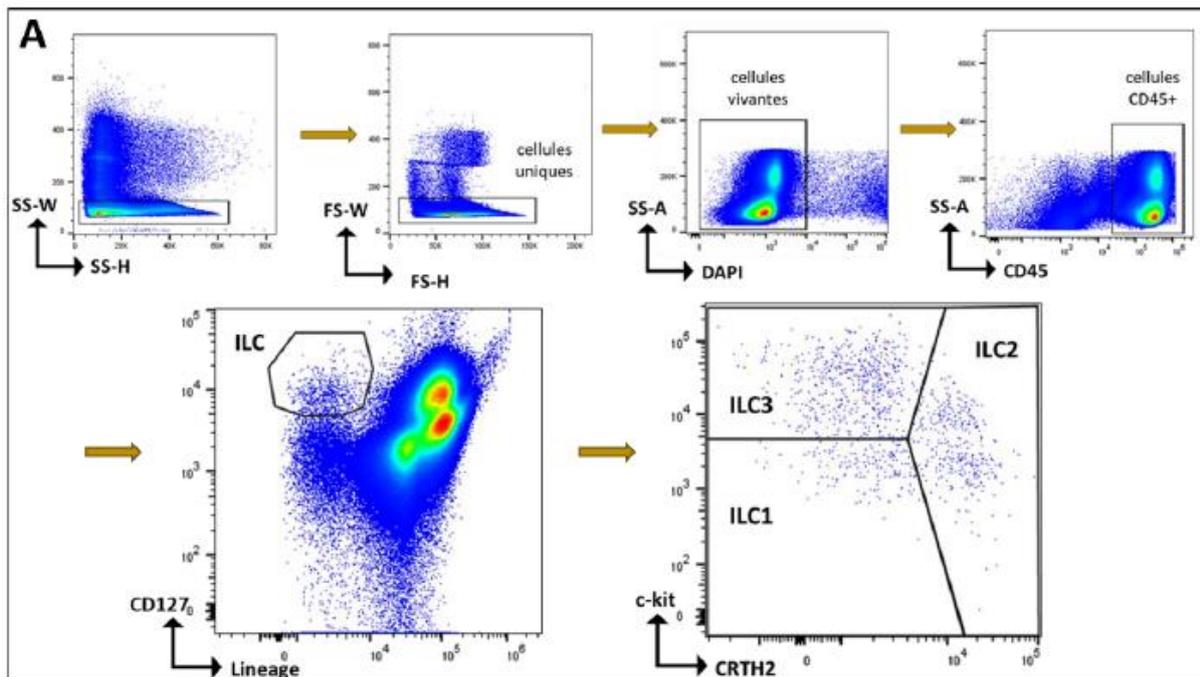
- ILC : CD45<sup>+</sup> lineage<sup>-</sup> CD127<sup>+</sup>

- ILC1 : CD45<sup>+</sup> lineage<sup>-</sup> CD127<sup>+</sup> CRTH2<sup>-</sup> c-kit<sup>-</sup>

- ILC2 : CD45<sup>+</sup> lineage<sup>-</sup> CD127<sup>+</sup> CRTH2<sup>+</sup>

- ILC3 : CD45<sup>+</sup> lineage<sup>-</sup> CD127<sup>+</sup> CRTH2<sup>-</sup> c-kit<sup>+</sup>.

« Lineage » correspond à une association d'anticorps de même fluorochrome dirigés contre CD1a, CD3, CD4, CD14, CD16, CD19, CD34, CD303, et FcεRI, permettant d'éliminer les cellules hématopoïétiques autres que les ILC (CD1a : cellules dendritiques ; CD3 : lymphocytes T, CD4 : lymphocytes T CD4, LTi ; CD14 : monocytes, macrophages, polynucléaires neutrophiles ; CD16 : cellules NK, monocytes, macrophages, polynucléaires neutrophiles ; CD19 : lymphocytes B ; CD34 : cellules souches et progénitrices ; CD303 : cellules dendritiques plasmacytoïdes ; FcεRI : mastocytes).



*Figure 15. Stratégie d'identification des ILC et de leurs sous-types dans le sang*

Selon la même méthodologie, nous avons cherché à identifier les ILC au sein des glandes salivaires après digestion avant de changer d'option pour une analyse histologique en raison des difficultés techniques.

Le résultat de cette étude a été publié dans RMD Open dans l'article « *Alteration of innate lymphoid cell homeostasis mainly concerns salivary glands in primary Sjögren's syndrome* » ci-joint. Nous ne reviendrons donc pas sur les résultats contenus dans l'article mais exposons simplement ici le matériel et les méthodes utilisées de manière détaillée car ils sont décrits de manière plus succincte dans l'article.

## B. Matériel et méthodes

### 1. Inclusion des patients dans l'étude

Trente-sept patients atteints de SJp et 33 témoins ont été inclus dans l'étude. Le critère d'inclusion pour les patients atteints de SJp était un diagnostic de SJp posé selon les critères américains et européens de classification du SJp de 2016 <sup>182</sup>. D'un point de vue éthique, les démarches de recueil de consentement, de non-opposition pour l'utilisation des données à visée de recherche se conforment aux recommandations en vigueur (autorisation du Comité de Protection des Personnes pour la constitution d'une banque à visée de recherche du Centre National de Référence des maladies auto-immunes et systémiques rares). Une déclaration à la Commission nationale de l'informatique et des libertés a été effectuée afin de pouvoir colliger et stocker les données personnelles à visée de recherche selon la méthodologie de référence MR-004

### 2. Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins de 21 patients atteints de SJp, de 28 témoins soins ont été obtenus par des moyens différents. Vingt-et-un patients et 18 témoins sains ont été inclus prospectivement lors d'une consultation de suivi ou lors d'une hospitalisation au service de rhumatologie du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Strasbourg après avoir donné leur consentement éclairé et 10 témoins sains ont été inclus lors d'un don de sang à l'Etablissement Français du Sang.

### 3. Prélèvements de glandes salivaires accessoires

Les GSA de 24 patients ont été obtenues par deux moyens différents. D'une part, 7 GSA, prélevées par des biopsies de lèvre inférieure entre décembre 2021 et août 2022, ont été recueillies et déposées dans un milieu de culture (Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI, Corning, New-York, USA) + sérum de veau fœtal 2% (SVF, Dutscher, Bernolsheim, France) + Penicilline-Streptomycine 1% (Dutscher)). Ces glandes ont été digérées pour analyse en cytométrie en flux ou incluses en paraffine pour analyse en microscopie (cf paragraphes 3b et 4a). D'autre part, 17 GSA, prélevées entre 2016 et 2021, et conservées dans des blocs de paraffine au Centre de Ressources Biologiques (CRB) du CHU de Strasbourg, ont été analysées.

### 4. Quantification des ILC par cytométrie en flux sur cellules mononucléées du sang périphérique et cellules de glandes salivaires accessoires digérées

#### 4.1. Prélèvements sanguins et isolement de cellules mononucléées du sang périphérique

Le sang a été prélevé dans des tubes héparinés chez les patients atteints de SJp et les témoins sains. Le sang, dilué au 1:1 dans du tampon phosphate salin (PBS) ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  795 mg/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  144 mg/L, NaCl 9 mg/L, pH 7.1, Lonza, Bâle, Suisse), a été déposé sur un coussin de Ficoll de densité 1.077 g/mL (Cytiva, Fribourg en Brigsau, Allemagne) avant centrifugation (Eppendorf, Hambourg, Allemagne) pendant 30 minutes à 400g sans frein. Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC), situées entre le plasma et le liquide de Ficoll par un phénomène de gradient de densité, ont été récupérées. Après deux lavages au PBS, le culot cellulaire a été suspendu dans 200 $\mu$ L de PBS-SVF 2%. Les cellules vivantes ont été comptées sur une lame de Malassez en présence de bleu trypan (Corning).

## 4.2. Digestion de glandes salivaires accessoires

Les GSA ont été coupées au scalpel en fins fragments, placées dans des tubes contenant 5mL de milieu de dissociation enzymatique (RPMI + SVF 10% + collagénase P 50 µL/mL (Sigma, Saint-Louis, USA) + DNase I 10 µL/mL (Sigma) + HEPES 20 µL/mL (Sigma)), puis dissociées mécaniquement à l'aide de la machine gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne) (programme C01). Les lysats ont ensuite été incubés à 37°C, dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>, pendant 30 minutes, avec une resuspension toutes les 5 minutes. Après ajout de 3.75 mM d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA, Sigma), une deuxième dissociation mécanique a été réalisée à l'aide du gentleMACS Dissociator™ (programme Lung01). Les lysats ont ensuite été lavés dans du PBS-SVF 2%-EDTA 2mM et filtrés au tamis à 40µm. Après centrifugation pendant 10 minutes à 300g, le culot cellulaire a été suspendu dans 200µL de PBS-SVF-EDTA. Les cellules vivantes ont été comptées sur une lame de Malassez en présence de bleu trypan.

## 4.3. Identification et quantification des ILC par cytométrie en flux

L'analyse a été réalisée sur 3 millions de PBMC, et entre 500 000 et 3 millions de cellules de GSA digérées. Les cellules ont été marquées avec les anticorps détaillés dans le **tableau 4**, et incubées pendant 15 minutes à 4°C à l'abri de la lumière. Après deux lavages, les cellules marquées ont été suspendues dans 200µL de PBS-SVF 2% et 0,1µg/ml de 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, Thermofisher, Waltham, USA) a été ajouté comme marqueur de mort cellulaire. L'acquisition des données a été effectuée à l'aide d'un cytomètre Gallios (Beckman Coulter, Brea, USA) et les données ont été analysées en utilisant le logiciel FlowJo version 10 (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA). Les seuils de positivité ont été définis par la réalisation de contrôles « Fluorescence Minus One », correspondant aux marquages des cellules par l'ensemble des fluorochromes du panel d'anticorps, sauf un.

	Cible	Fluorochrome	Fournisseur	Isotype	Clone	Volume par test (sur 109.5 µL de volume total)
Lineage	CD1a	FITC	BD Pharmingen	Souris IgG1, κ	HI149	20 µL
	CD3	FITC	Miltenyi	Souris IgG2a, κ	BW264/56	2 µL
	CD4	FITC	Miltenyi	Souris IgG2a, κ	VIT4	2 µL
	CD14	FITC	BD Pharmingen	Souris IgG2a, κ	M5E2	20 µL
	CD16	FITC	Miltenyi	Humain recombinant IgG1	REA423	2 µL
	CD19	FITC	BD Pharmingen	Souris IgG1, κ	HIB19	20 µL
	CD34	FITC	Miltenyi	Souris IgG2a, κ	AC136	2 µL
	CD303	FITC	Biologend	Souris IgG2a, κ	201A	5 µL
	FcεRI	FITC	eBioscience	Souris IgG2b, κ	AER-37	5 µL
	CD127	PE	BD Pharmingen	Mouse IgG1, κ	HIL-7R-M21	2 µL
	CD45	PE-Cy7	BD Pharmingen	Souris IgG1, κ	H130	2.5 µL
	c-kit	APC	Miltenyi	Humain recombinant IgG1	REA787	2 µL
	CRTH2	APC-Vio770	Miltenyi	Humain recombinant IgG1	REA598	5 µL

**Tableau 4. Anticorps utilisés en cytométrie en flux**

*FITC* : isothiocyanate de fluoroscéine ; *PE* : phycoérythrine ; *Cy* : cyanine ; *APC* : allophycocyanine

## 5. Analyse et quantification des ILC en microscopie par immunofluorescence sur coupes glandes salivaires accessoires

### 5.1. Inclusion de glandes salivaires accessoires en paraffine et coupe au microtome

Les GSA ont été fixées dans du Formol 4% (Microm Microtech, Brignais, France) pendant 24h à 48h, puis incubées dans du PBS pendant 30 minutes à 4°C. Après rinçage rapide à l'eau distillée, les GSA ont été déshydratées grâce à des bains d'alcool à degrés croissants : éthanol 70% (v/v) (Carlo Erba, Emmendingen, Allemagne) pendant 1h, éthanol 96% (v/v) (Carlo Erba) pendant 1h, éthanol 100% (v/v) (Carlo Erba) pendant 2x1h, puis butan-1-ol (VWR, Radnor, USA) pendant 2x1h. Les glandes salivaires accessoires ont été imprégnées en paraffine Paraplast Plus (Leica, Wetzlar, Allemagne) grâce à deux bains de 12h et 4h à 60°C, avant d'être incluses en paraffine dans une cupule en plastique. Elles ont ensuite été coupées avec un

microtome (Leica) en sections de 5µm et montées sur des lames SuperFrost Plus (Thermofisher).

## 5.2.Sélection des coupes analysées et classification de la sévérité des infiltrats

Toutes les 9 coupes, la section obtenue a été déparaffinée au toluène (Thermofisher) pendant 10 minutes, réhydratée (éthanol 100% (v/v) pendant 2 minutes, éthanol 96% (v/v) pendant 1 minute, eau distillée pendant 5 minutes), puis colorée à l'hématoxyline (Sigma) - éosine (Labelians, Nemours, France) grâce à des bains successifs : hématoxyline pendant 30 secondes, rinçage à l'eau courante, eau distillée pendant 2 minutes, éosine pendant 3 minutes, rinçage à l'eau distillée, éthanol 100% (v/v) pendant 1 minute, toluène pendant 10 minutes. Les lames ont été montées dans un milieu Eukitt, puis observées au microscope optique, afin de rechercher la présence d'anomalies histologiques spécifiques du SJP, qui sont focales. Les sections adjacentes à celles présentant des anomalies histologiques ont été sélectionnées pour les immunomarquages.

## 5.3.Immunomarquages des ILC et acquisition au microscope à fluorescence

Après déparaffinage et réhydratation, un démasquage antigénique a été réalisé dans un tampon citrate ( $C_6H_8O_7$ ,  $H_2O$  0.1M (Merck, Darmstadt, Allemagne) +  $C_6H_5O_7Na_3$  0.1M (Sigma)) à 10mM et pH 0.6, chauffé au micro-onde pendant 15 minutes à 750 W, suivi d'une perméabilisation par PBS-Triton 0.1% (v/v) (Sigma) pendant 2 minutes, et d'un blocage des sites de fixations non spécifiques par une solution de saturation (PBS-Triton 0.1%-sérum de cheval 5% (v/v) (Sigma)) pendant 1 heure à température ambiante. Les anticorps primaires, détaillés dans le **tableau 5**, dilués dans la solution de saturation, ont été déposés sur les coupes et incubés pendant une nuit à 4°C. Après 3 lavages successifs au PBS, les anticorps secondaires (**tableau 5**), dilués au 1/1000 dans du PBS, ont été déposés sur les coupes et incubés pendant 2

heures à température ambiante à l'abri de la lumière. Après marquage au DAPI (0,1µg/ml) pendant 5 minutes et 3 lavages, les lames ont été montées au fluoromount-GTM (Thermofisher). Tous les immunomarquages ont été réalisés dans les mêmes conditions. Les coupes marquées ont été observées au microscope à fluorescence (LSM 780, Zeiss, Oberkochen, Allemagne) en mode confocal au grossissement x40, après immersion de l'objectif à l'huile (Zeiss), en utilisant 4 canaux de fluorescence (A405, A488, A561 et A642). Tous les infiltrats cellulaires de chaque section de GSA ont été scannés. L'acquisition a été réalisée grâce au logiciel Metamorph (Molecular Device, San Jose, USA), avec des temps d'exposition similaires pour chaque acquisition (300ms en A405, 150ms en A488, 300ms en A561, 1000ms en A642).

		<b>Anticorps primaire</b>				<b>Anticorps secondaire</b>				
		<b>Cible</b>	<b>Isotype</b>	<b>Clone</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Dilution</b>	<b>Isotype</b>	<b>Clone</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Fluorochrome</b>
<b>Lineage</b>		CD127	Lapin IgG	6H0T7	Clinisciences	1/200	Âne IgG	polyclonal	Thermofisher	A488
		CD3	Rat IgG	KT3	Clinisciences	1/500	Âne	polyclonal	Jackson	Cy3
		CD19	Rat Ig2a, κ	6OMP31	Thermofisher	1/4000	IgF(ab)2			
		CD14	Mouton IgG	polyclonal	Biotechne	1/200	Âne IgF(ab)2	polyclonal	Jackson	Cy3
		CRTH2	Souris IgG1, κ	G-12	SantaCruz Biotechnology	1/200	Âne IgG	polyclonal	Thermofisher	A647
		T-bet	Souris IgG1, κ	eBio4B10	Thermofisher	1/200				

**Tableau 5. Anticorps utilisés en immunofluorescence**

#### 5.4. Quantification des ILC par infiltrat cellulaire de GSA

Les données acquises en microscopie ont été analysées sur le logiciel ImageJ version 1.8.0 (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Les réglages de contraste et de luminosité post-acquisition des images ont été réalisés de façon à obtenir une intensité globale des couleurs similaire pour chaque image. Le nombre d'ILC totales et de chaque sous-types d'ILC a été quantifié pour chaque infiltrat cellulaire. Les surfaces des infiltrats cellulaires ont été évaluées par contour manuel sur chaque image acquise. Le nombre d'ILC et de sous-type d'ILC a été

rapporté à la surface de l'infiltrat cellulaire. Les quantités d'ILC de chaque infiltrat d'une même GSA ont été additionnées et rapportées à la surface totale d'infiltrat de la GSA.

## 6. Recueil des données cliniques et biologiques des patients

Les données cliniques et biologiques ont été recueillies par lecture rétrospective des dossiers médicaux des patients, sur le logiciel DxCare, utilisé par le CHU de Strasbourg. L'activité de la maladie a été évaluée par calcul du score clinESSDAI<sup>183</sup> (une variante du score ESSDAI avec des pondérations différentes de chaque domaine et ne prenant pas en compte le domaine biologique, score complet en **Annexe 4**) ; les patients étaient considérés comme inactifs si le clinESSDAI était égal à 0, faiblement actifs s'il était compris entre 1 et 4, modérément actifs s'il était compris entre 5 et 13, et fortement actifs s'il était supérieur ou égal à 14. Les taux de lymphocytes, complément, FR, Ig et cryoglobuline ont été recueillis. La sévérité de l'atteinte glandulaire a été évaluée par le focus score, défini comme le nombre d'infiltrats cellulaires de plus de 50 lymphocytes par 4mm<sup>2</sup> de tissu glandulaire.

## 7. Analyses statistiques

Les variables quantitatives ont été décrites par la médiane et les interquartiles 25-75 (IQR), et les variables qualitatives ont été décrites par pourcentages. La normalité de la distribution des variables a été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk. Les comparaisons des variables quantitatives ont été réalisées un test de Mann-Whitney, car la distribution des variables n'était pas normale. Pour les analyses de corrélations, le coefficient de Spearman a été utilisé. Les p-valeurs inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant les logiciels JMP 7 (SAS Institute, Cary, USA) et GraphPad Prism 8.0 (Dotmatics, Boston, USA).

C. Article : “Alteration of innate lymphoid cell homeostasis mainly concerns salivary glands in primary Sjögren’s syndrome”

## SHORT REPORT

## Alteration of innate lymphoid cell homeostasis mainly concerns salivary glands in primary Sjögren's syndrome

Lou Kawka,<sup>1,2</sup> Renaud Felten ,<sup>1,2</sup> Cédric Schleiss,<sup>2</sup> Jean-Daniel Fauny,<sup>2</sup> Pauline Le Van Quyen,<sup>3</sup> Hélène Dumortier,<sup>2</sup> Fanny Monneaux,<sup>2</sup> Jacques-Eric Gottenberg <sup>1,2</sup>

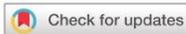
**To cite:** Kawka L, Felten R, Schleiss C, et al. Alteration of innate lymphoid cell homeostasis mainly concerns salivary glands in primary Sjögren's syndrome. *RMD Open* 2023;**9**:e003051. doi:10.1136/rmdopen-2023-003051

► Additional supplemental material is published online only. To view, please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/rmdopen-2023-003051>).

LK and RF contributed equally.

LK and RF are joint first authors.

Received 6 February 2023  
Accepted 26 April 2023



© Author(s) (or their employer(s)) 2023. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

For numbered affiliations see end of article.

**Correspondence to**

Dr Renaud Felten;  
renaud.felten@chru-strasbourg.fr

Dr Jacques-Eric Gottenberg;  
jacques-eric.gottenberg@chru-strasbourg.fr

**ABSTRACT**

**Objective** Innate lymphoid cells (ILCs) are a cell population implicated in the pathogenesis of various chronic inflammatory diseases, but little is known about their role in primary Sjögren's syndrome (pSS). The aim of this study was to assess the frequency of ILC subsets in peripheral blood (PB) and their quantity and location in minor salivary glands (MSGs) in pSS.

**Methods** The frequency of ILC subsets was analysed in the PB of patients with pSS and healthy controls (HCs) by flow cytometry. The amount and location of ILC subsets in MSGs were studied in patients with pSS and sicca controls by immunofluorescence assay.

**Results** In PB, the frequency of ILC subsets did not differ between patients with pSS and HCs. The circulating frequency of the ILC1 subset was increased in patients with pSS with positive anti-SSA antibodies and that of the ILC3 subset was reduced in patients with pSS with glandular swelling. In MSGs, the ILC3 number was higher in lymphocytic-infiltrated than non-infiltrated tissue in patients with pSS and normal glandular tissues in sicca controls. The ILC3 subset was preferentially located at the periphery of infiltrates and was more abundant in small infiltrates of recently diagnosed pSS.

**Conclusion** Altered ILC homeostasis mainly concerns salivary glands in pSS. Most ILCs in MSGs consist of the ILC3 subset, located at the periphery of lymphocytic infiltrates. The ILC3 subset is more abundant in smaller infiltrates and in recently diagnosed pSS. It might play a pathogenic role in the development of T and B lymphocyte infiltrates in the early stages of pSS.

**INTRODUCTION**

Primary Sjögren's syndrome (pSS) is an autoimmune disease characterised by a chronic infiltration of exocrine glands by T and B lymphocytes.<sup>1</sup> Activated type I and II interferon pathways result in B cell hyperactivation and lymphocytic infiltrations of affected tissues, often organised as germinal centres. Little is known about the early stages leading to the autoimmune process in pSS.<sup>2,3</sup> Some data suggest the involvement of innate immunity both in the disease initiation and maintenance

**WHAT IS ALREADY KNOWN ON THIS TOPIC**

- ⇒ Innate immunity is implicated in the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome (pSS), especially in the early stages.
- ⇒ Innate lymphoid cells (ILCs) are involved in the pathogenesis of various chronic inflammatory diseases. The subset ILC3 contributes to the formation of lymphoid structures under physiological conditions and in some pathological situations.

**WHAT THIS STUDY ADDS**

- ⇒ Most ILCs in minor salivary glands are the ILC3 subset. The ILC3 subset is preferentially located at the periphery of the inflammatory infiltrates in minor salivary glands of patients with pSS. It is more abundant in the smaller infiltrates and in recently diagnosed pSS.

**HOW THIS STUDY MIGHT AFFECT RESEARCH, PRACTICE OR POLICY**

- ⇒ The ILC3 subset may play a role in the development of T and B lymphocyte infiltrates in minor salivary glands in pSS.

of autoimmunity in pSS, but more studies are needed to dissect the role of innate immune cell actors.<sup>4</sup> Among innate immune cells, natural killer cells and interleukin 22 (IL-22)-secreting NKp44<sup>+</sup> cells have a role.<sup>5,6</sup>

Innate lymphoid cells (ILCs) are a group of innate effector cells with a lymphoid morphology but lack rearranged antigen-specific receptors. They are characterised by the expression of the  $\alpha$ -chain of the IL-7 receptor (CD127) and are divided into three groups, including ILC1, 2 and 3 subsets, on the basis of their transcription factors and cytokine production profiles.<sup>7</sup> Although ILCs are normally involved in the maintenance of tissue homeostasis, they can also help generate tertiary ectopic lymphoid structures, as observed in some patients with pSS, and

potentiate inflammatory processes in different chronic inflammatory diseases.<sup>8,9</sup>

The involvement of ILCs in the pathogenesis of pSS was mainly investigated in peripheral blood (PB),<sup>10,11</sup> but the distribution of ILC1, 2 and 3 subsets in the minor salivary glands (MSGs) of patients with pSS has never been studied. The aim of this study was to analyse the frequency of ILC subsets in PB and their quantity and location in MSGs in pSS.

## MATERIALS AND METHODS

### PB and MSG collection

A total of 37 patients with pSS and 33 controls were included in this study (online supplemental table 1). Patients with pSS were included if they fulfilled the American-European Consensus Group criteria<sup>12</sup> without any immunosuppressive agents. PB samples were collected from 21 patients with pSS and 28 healthy controls (HCs). MSG samples were collected from 16 other patients with pSS and 5 sicca controls, those with no autoantibodies and a focus score <1.

### ILC identification

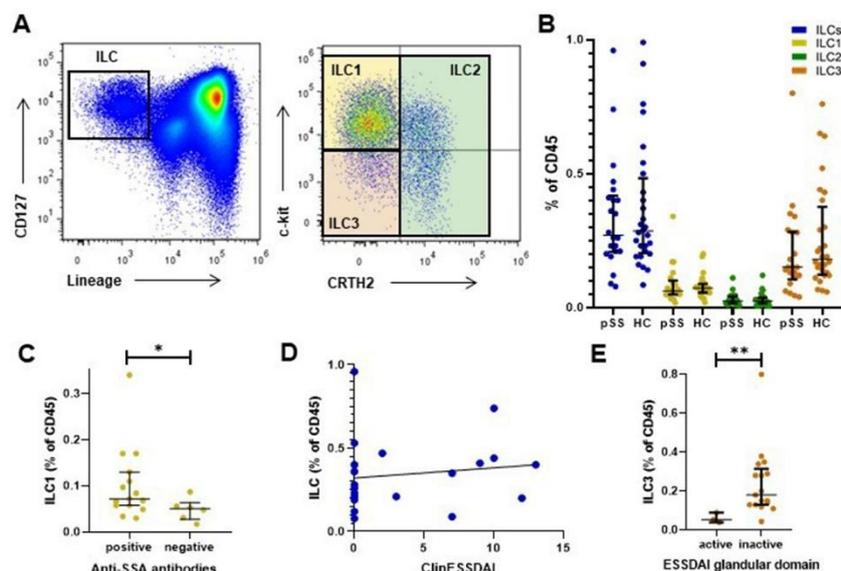
ILCs and their subsets were identified using markers selected from the literature.<sup>13–15</sup>

### Flow cytometry

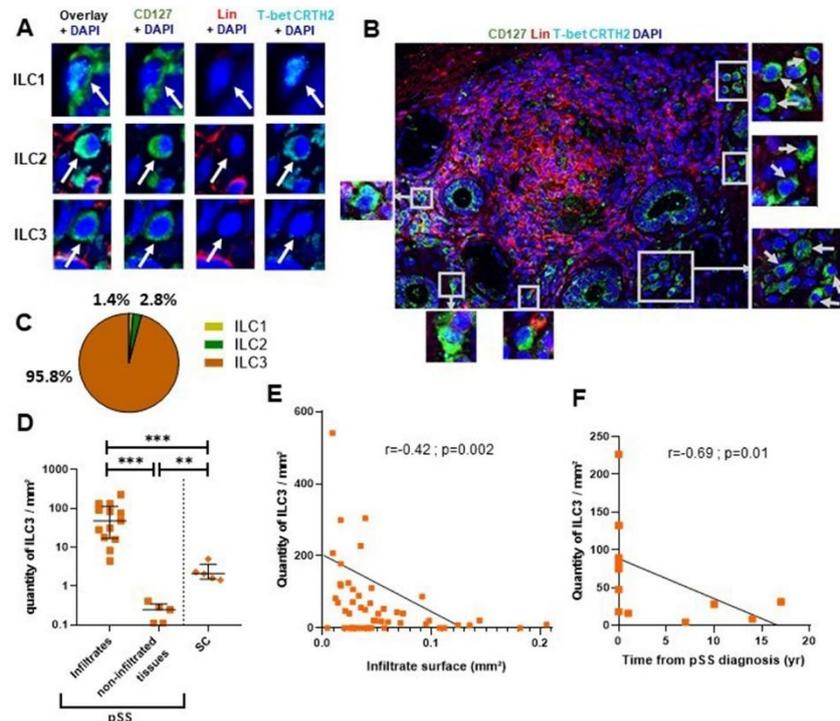
PB mononuclear cells were isolated according to the Ficoll gradient procedure. Flow cytometry was performed on 3 million PB mononuclear cells stained with the antibodies detailed in online supplemental table 2. ILCs were identified as CD45<sup>+</sup>, lineage (CD1a, CD3, CD4, CD14, CD16, CD19, CD34, CD303, FcεR1)<sup>-</sup> and CD127<sup>+</sup>. Within the ILC gate, the ILC1 subset was identified as c-kit<sup>+</sup> and CRTH2<sup>-</sup>, the ILC2 subset as CRTH2<sup>+</sup>, and the ILC3 subset as c-kit<sup>+</sup> and CRTH2<sup>-</sup> (figure 1A).<sup>15</sup>

### Immunofluorescence assay

Paraffin-embedded MSG samples were cut into 5 μm sections, then dewaxed and rehydrated. Antigen retrieval involved heating the sections for 15 min at 750 W in a citrate solution. Permeabilisation involved using 0.1% Triton in phosphate-buffered saline (PBS). We used 5% horse serum in PBS to block non-specific staining. Sections were incubated with primary antibodies and secondary antibodies detailed in online supplemental table 3 and



**Figure 1** Peripheral blood analysis: frequency of total innate lymphoid cells (ILCs) and ILC1, 2 and 3 subsets and association with disease activity or clinical and biological manifestations in primary Sjögren's syndrome (pSS) and healthy controls (HCs). (A) Identification of ILC subsets in peripheral blood by flow cytometry: after gating on singlets and CD45<sup>+</sup> cells, ILCs were identified as CD127<sup>+</sup> and lineage (CD1a, CD3, CD4, CD14, CD16, CD19, CD34, CD303, FcεR1)<sup>-</sup> (top panel), and the ILC1 subset was identified as CRTH2<sup>-</sup> c-kit<sup>+</sup>, the ILC2 subset as CRTH2<sup>+</sup> c-kit<sup>+</sup> and the ILC3 subset as CRTH2<sup>-</sup> c-kit<sup>+</sup> (bottom panel). (B) Proportions of total ILCs and ILC subsets among CD45<sup>+</sup> cells in patients with pSS (N=21) and HCs (N=28). (C) ILC1 frequency in patients with pSS with or without positive anti-SSA antibodies (N=21). (D) Correlation between total ILC frequency and disease activity measured by clinical EULAR Sjogren's Syndrome Disease activity Index (ClinESSDAI) in patients with pSS (N=21). (E) ILC3 frequency in patients with pSS with or without glandular manifestations defined as active ESSDAI glandular domain (N=21). Data are median±IQR. \*P<0.05; \*\*p<0.01.



**Figure 2** Minor salivary gland (MSG) analysis: quantity, proportion and distribution of ILC1, 2 and 3 subsets. (A) Strategy of identification of ILC subsets in MSGs by immunofluorescence multicolour staining: ILCs were identified as CD127+ and lineage (Lin) and the ILC1 subset was identified as T-bet<sup>+</sup> and CRTH2<sup>-</sup>, the ILC2 subset as T-bet<sup>-</sup> and CRTH2<sup>+</sup>, and the ILC3 subset as T-bet<sup>-</sup> CRTH2<sup>-</sup>. The Lin contains antibodies against CD3, CD14 and CD19. (B) Example of identification of ILC3 (surrounded and designed with arrow) in an inflammatory infiltrate in MSGs of a patient with pSS. (C) Mean proportion of ILC subsets among total ILCs in patients with pSS (N=13). (D) Quantity of ILC3 subset per surface area of glandular tissue inflammatory infiltrates (N=13) and non-infiltrated tissues (N=5) in pSS and sicca control (SC) MSGs (N=5). (E) Correlation between the quantity of ILC3 subset in each inflammatory infiltrate of MSGs of a patient with pSS and the infiltrate surface (N=54). (F) Correlation between the quantity of ILC3 subset in infiltrates of MSGs of a patient with pSS and time from pSS diagnosis (N=13). Data are median±IQR unless specified. \*\*P<0.01; \*\*\*p<0.001; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; ILC, innate lymphoid cell; pSS, primary Sjögren's syndrome; yr, years.

counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). MSG sections were scanned by using the Axio observer Z1 imaging system in confocal mode with a 40× objective. ILCs were defined as lineage (CD3, CD14, CD19)- and CD127<sup>+</sup>. The expression of T-bet (nuclear) and CRTH2 (cytoplasmic) was used to distinguish ILC1 (T-bet<sup>+</sup>), ILC2 (CRTH2<sup>+</sup>) and ILC3 (T-bet<sup>-</sup> and CRTH2<sup>-</sup>) subsets (figure 2A).<sup>15 16</sup> The frequency of ILCs was described with the quantity of cells used to analyse surface ratios. Surfaces of MSG tissue or infiltrates were obtained by manual contouring with ImageJ V.1.8.0 (National Institutes of Health, Bethesda, USA).

#### Statistical analysis

Quantitative data are described with median (IQR) and qualitative data with frequencies (percentages). Categorical variables were compared by X<sup>2</sup> test or Fisher's exact

test and quantitative variables by Mann-Whitney U test. Statistical significance was established at p<0.05. All analyses were performed with GraphPad V.8.

## RESULTS

### ILC subset frequencies in PB do not differ between patients with pSS and HCs

We included 21 patients with pSS and 28 HCs for the PB analysis. Many patients with pSS were women (95.2%), and their median age was 56 years (IQR: 42.5–68) (online supplemental table 1). In total, 71.4% patients had positive anti-SSA antibodies and 33.3% had moderate or high systemic disease activity (clinical EULAR Sjögren's Syndrome Disease activity Index [ClinESSDAI] >4).

The frequency of total circulating ILC and ILC subsets did not differ between patients with pSS and

HCs (figure 1B). The ILC1 frequency was significantly increased in patients with pSS with anti-SSA antibodies ( $p=0.03$ , figure 1C). In patients with pSS, the frequency of total ILCs in PB was not correlated with systemic disease activity measured by the ClinESSDAI (figure 1D). The ILC3 frequency was significantly decreased in patients with pSS with glandular involvement defined as positive glandular domain of ClinESSDAI, corresponding, in the present study, to salivary gland swelling ( $p=0.01$ , figure 1E). No other significant difference or association was found between the frequency of total circulating ILC or ILC subsets and pSS clinical or biological parameters (online supplemental file 1).

#### ILC3 subset represents most of the ILCs in MSGs

We included 16 patients with pSS for the MSG analysis. Most were women (81.2%) and their median age was 54 years (IQR: 39.8–58.8) (online supplemental table 1). In total, 56.2% ( $n=9$ ) of patients with pSS had positive anti-SSA antibodies and 46.7% ( $n=7$  of 15) had moderate or high systemic disease activity (ClinESSDAI  $>4$ ). The median focus score was 1.15 (IQR: 1–2.75).

Most of the ILCs identified in MSGs of patients with pSS were the ILC3 subset (95.8%) (figure 2C). In patients with pSS, the ILC3 subset was more frequent in MSG tissue with lymphocyte infiltration than in non-infiltrated tissue ( $p=0.0002$ ) and MSGs of sicca controls ( $p=0.0005$ ; figure 2D) and was more frequent in non-infiltrated tissue of patients with pSS than in sicca controls ( $p=0.008$ , figure 2D). The two groups did not differ in frequency of ILC1 and ILC2 subsets in MSGs (not shown).

#### ILC3 subset locates at the periphery of lymphocytic T and B infiltrates and is associated with smaller infiltrates and recent diagnosis

Most of the ILC3 subset was detected in infiltrates in MSGs of patients with pSS. Within the infiltrates, the ILC3 subset was mostly located at the periphery (figure 2B) and was increased in the smaller infiltrates ( $r=-0.42$ ;  $p=0.002$ , figure 2E). The size of lymphocytic infiltrates was inversely correlated with disease duration after diagnosis ( $r=0.60$ ;  $p<0.0001$ ) (not shown). The quantity of the ILC3 subset was inversely correlated with time since pSS diagnosis ( $r=-0.69$ ;  $p=0.01$ ; figure 2F). The quantity of total ILC or ILC subsets in MSG infiltrates was not associated with anti-SSA antibodies, salivary flow or systemic disease activity measured by ClinESSDAI (ILC3 data shown in online supplemental figure 2).

#### DISCUSSION

The present study demonstrates that most ILCs in MSGs consist of the ILC3 subset and suggests their involvement in the early pathogenic stages of pSS.

In PB, the present results are consistent with two previous studies<sup>10 11</sup> showing no change in ILC subset frequency in pSS versus controls. One of the studies<sup>11</sup> found an increase in the inflammatory ILC2 subset, potential precursors of the ILC3 subset,<sup>17</sup> in pSS. Of note,

the circulating ILC3 subset was decreased in patients with MSG swelling in the present study. This decrease might suggest the migration of the circulating ILC3 subset in salivary glands in some patients with pSS but must be confirmed by the concomitant analysis of ILCs in PB and MSGs of the same patients. As previously observed, here we found an association between autoantibodies and the ILC1 subset. In contrast to a previous study with a low number of patients who had high systemic disease activity,<sup>10</sup> here we found no association between the circulating ILC1 subset and the ClinESSDAI.

Because ILCs are mostly tissue-resident and tissue-effector cells, we then analysed their role in MSGs, one of the main target organs in pSS. Most of the glandular ILCs in MSGs were the ILC3 subset, as in other mucosal tissues.<sup>18</sup> In patients with pSS, the frequency of the ILC3 subset was found increased in lymphocytic infiltrates and decreased in non-infiltrated tissues as compared with controls. A previous study showed a higher frequency of IL-22-secreting NKp44<sup>+</sup>, which might correspond to the ILC3 subset, in salivary glands from patients with pSS than controls.<sup>5</sup> The ILC3 subset was located at the periphery of infiltrates, similar to natural killer cells in pSS.<sup>19</sup> Moreover, the subset was more abundant in recently diagnosed patients. The ILC3 subset might play a role in the early migration of T and B lymphocytes in salivary glands. They were found involved in the migration and activation of lymphoid cells.<sup>20 21</sup> In animal models of pSS, innate immune cells are the first to infiltrate salivary glands.<sup>22 23</sup> In the DMXAA-induced model of pSS in female C57BL/6 (B6) mice, salivary ILC1 population increased significantly within 3 days after induction.<sup>24</sup> Indeed, in this study, the lymphocytic gland infiltration could be assessed at the early initiation of the pathogenic process (as it is an induced disease) in contrast to human pathology. It could be speculated that ILC1 might precede ILC3 in salivary glands but this remains to be demonstrated in patients.

ILC3 might also play a role in the persistent activation of T and B lymphocytes and in lymphoid organisation in salivary glands as reported in other chronic inflammatory diseases.<sup>25 26</sup> Lymphoid tissue inducer cells are a subset of the ILC3 subset, depending on IL-7.<sup>9 27</sup> IL-7 plays a pathogenic role in pSS,<sup>17</sup> and targeting IL-7 receptor, currently evaluated in pSS, might also target ILC.

#### CONCLUSION

Abnormal ILC frequency affects mostly the targeted organs in pSS, the salivary glands, with a specific polarisation to the ILC3 subset and a preferential distribution at the periphery of inflammatory infiltrates. Our results suggest that the ILC3 subset might play a role in the development of infiltrates in the early stages of pSS.

#### Author affiliations

<sup>1</sup>Service de rhumatologie, Centre National de Référence des Maladies Autoimmunes et Systémiques Rares, Hôpitaux universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>2</sup>Laboratoire d'Immunologie, Immunopathologie et Chimie Thérapeutique, CNRS UPR3572, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France

<sup>3</sup>Service d'anatomopathologie, Hôpitaux universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

**Twitter** Lou Kawka @LouKawka and Renaud Felten @DocFelten

**Contributors** Study conception and design—LK, RF and J-EG. Data collection—LK, RF, CS and PLVQ. Interpretation of results—all authors. Preparation—all authors. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

**Funding** This work was supported by the Innovative Medicines Initiative 2 Joint Undertaking (IMI 2 JU) (NECESSITY grant 806975). J-EG received a grant from Geneviève Garnier (Association Française du Syndrome de Gougerot-Sjögren et des syndromes secs).

**Competing interests** None declared.

**Patient consent for publication** Obtained.

**Ethics approval** This study involves human participants and was approved by a "Biobanque/collection d'immuno-rhumatologie" authorization. Informed consent was obtained from participants. The study was also approved by the ethics committee of Strasbourg University Hospital.

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

**Supplemental material** This content has been supplied by the author(s). It has not been vetted by BMJ Publishing Group Limited (BMJ) and may not have been peer-reviewed. Any opinions or recommendations discussed are solely those of the author(s) and are not endorsed by BMJ. BMJ disclaims all liability and responsibility arising from any reliance placed on the content. Where the content includes any translated material, BMJ does not warrant the accuracy and reliability of the translations (including but not limited to local regulations, clinical guidelines, terminology, drug names and drug dosages), and is not responsible for any error and/or omissions arising from translation and adaptation or otherwise.

**Open access** This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

#### ORCID iDs

Renaud Felten <http://orcid.org/0000-0002-4951-4032>

Jacques-Eric Gottenberg <http://orcid.org/0000-0002-9469-946X>

#### REFERENCES

- Mariette X, Criswell LA. Primary Sjögren's syndrome. *N Engl J Med* 2018;379:97:931–9.
- 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;103:2770–5.
- Tian Y, Yang H, Liu N, et al. Advances in pathogenesis of Sjögren's syndrome. *J Immunol Res* 2021;2021:5928232.
- Kramer JM. Early events in Sjögren's syndrome pathogenesis: The importance of innate immunity in disease initiation. *Cytokine* 2014;67:S1043–4666(14)00053–2:92–101.
- Ciccia F, Guggino G, Rizzo A, et al. Potential involvement of IL-22 and IL-22-producing cells in the inflamed salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2012;71:295–301.
- Rusakiewicz S, Nocturne G, Lazure T, et al. Ncr3/Nkp30 contributes to pathogenesis in primary Sjögren's syndrome. *Sci Transl Med* 2013;5:195ra96:195.
- Vivier E, Artis D, Colonna M, et al. Innate lymphoid cells: 10 years on. *Cell* 2018;174:1054–1066.
- Ebbo M, Crinier A, Vély F, et al. Innate Lymphoid cells: Major players in inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 2017;17:665–78.
- Meier D, Bornmann C, Chappaz S, et al. Ectopic Lymphoid-organ development occurs through interleukin 7-mediated enhanced survival of Lymphoid-tissue-inducer cells. *Immunity* 2007;26:643–54.
- Blokland SLM, van den Hoogen LL, Leijten EFA, 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. *Rheumatology (Oxford)* 2019;58:1740–5.
- Guggino G, Lin X, Rizzo A, et al. Interleukin-25 axis is involved in the pathogenesis of human primary and experimental murine Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol* 2018;70:1265–75.
- Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, et al. 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;76:9–16.
- Trabanelli S, Gomez-Cadena A, Salomé B. Human innate lymphoid cells (ILCs): toward a uniform Immune-Phenotyping. *Cytometry*.
- Bernink JH, Krabbendam L, Germar K, et al. Interleukin-12 and -23 control plasticity of Cd127(+) group 1 and group 3 innate Lymphoid cells in the intestinal Lamina Propria. *Immunity* 2015;43:S1074–7613(15)00263–0:146–60.
- Spits H, Artis D, Colonna M, et al. Innate Lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 2013;13:145–9.
- Bikker A, Kruize AA, Wenting M, et al. Increased interleukin (IL)-7R $\alpha$  expression in salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome is restricted to T cells and correlates with IL-7 expression, lymphocyte numbers and activity. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1027–33.
- Huang Y, Guo L, Qiu J, et al. IL-25-responsive, lineage-negative KLRG1hi cells are multipotential 'inflammatory' type 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 2015;16:161–9.
- Simoni Y, Fehlings M, Kloverpris HN. Human innate lymphoid cell subsets possess tissue-type based heterogeneity in phenotype and frequency. *Immunity*.
- Seror R, Nocturne G, Lazure T, et al. Low numbers of blood and salivary natural killer cells are associated with a better response to Belimumab in primary Sjögren's syndrome: Results of the BELISS study. *Arthritis Res Ther* 2015;17:241.
- von Burg N, Turchinovich G, Finke D. Maintenance of immune homeostasis through ILC/T cell interactions. *Front Immunol* 2015;6:416.
- Kruglov AA, Grivennikov SI, Kuprash DV, et al. Nonredundant function of soluble LT $\alpha$ 3 produced by innate Lymphoid cells in intestinal homeostasis. *Science* 2013;342:1243–6.
- Nandula S-R, Scindia YM, Dey P, et al. Activation of innate immunity accelerates sialoadenitis in a mouse model for Sjögren's syndrome-like disease. *Oral Dis* 2011;17:801–7.
- Deshmukh US, Ohyama Y, Bagavant H, et al. Inflammatory stimuli accelerate Sjögren's syndrome-like disease in (NZB X NZW)F1 mice. *Arthritis Rheum* 2008;58:1318–23.
- Papinska J, Bagavant H, Gmyrek GB, et al. Activation of Stimulator of interferon genes (STING) and Sjögren syndrome. *J Dent Res* 2018;97:893–900.
- Villanova F, Flutter B, Tosi I, et al. Characterization of innate Lymphoid cells (ILC) in human skin and blood demonstrates increase of Nkp44+ Ilc3 in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2014;134:984–91.
- Mohr A, Trésallet C, Monot N, et al. Tissue infiltrating Lti-like group 3 innate Lymphoid cells and T follicular helper cells in Graves' and Hashimoto's thyroiditis. *Front Immunol* 2020;11:601.
- Shikhagaie MM, Germar K, Bal SM, et al. Innate Lymphoid cells in Autoimmunity: Emerging regulators in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2017;13:164–73.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Table S1: Participant characteristics

	PERIPHERAL BLOOD ANALYSIS		MINOR SALIVARY GLAND ANALYSIS
	pSS patients (n=21)	Healthy controls (n=28)	pSS patients (n=16)
<b>Demographic</b>			
Sex (female), n (%)	20 (95.2)	23 (82.1)	13 (81.2)
Age (years), median (IQR)	56 (42.5-68)	55 (28.3-55)*	54 (39.8-58.8)
<b>Disease characteristics</b>			
Time from pSS diagnosis (years), median (IQR)	8.5 (3.3-13.3)		0 (0-6)
Positive anti-SSA antibodies, n (%)	15 (71.4)		9 (56.2)
Positive anti-SSB antibodies, n (%)	3 (14.3)		5 (31.2)
ClinESSDAI, median (IQR)	0 (0-8)		3 (2-8)
ClinESSDAI > 0, n (%)	9 (42.9)		12/15 (80)
ClinESSDAI > 4, n (%)	7 (33.3)		7/15 (46.7)
<b>Minor salivary gland histology</b>			
Focus score, median (IQR)	-		1.15 (1-2.75)
<b>Laboratory parameters</b>			
Positive rheumatoid factor, n (%)	9/17 (52.9)		7/11 (63.6)
Lymphopenia, n (%)	3 (14.3)		4 (25)
Hypergammaglobulinemia, n (%)	7/20 (35.0)		9 (56.2)
Cryoglobulinemia, n (%)	3/18 (16.7)		0/10 (0)
Hypocomplementemia, n (%)	3/17 (17.8)		2/9 (22.2)
<b>Treatment</b>			
Corticosteroids, n (%)	2 (9.5)		4 (25)
Hydroxychloroquine, n (%)	7 (33.3)		2 (15.4)
Methotrexate, n (%)	1 (4.8)		1 (7.7)

IQR: interquartile range, pSS: primary Sjögren's syndrome

\* Ages of 12 healthy controls who donated PB samples were 50 to 60 years old, but age was not precisely known, and age was considered 55 years old.

**Supplementary Table S2: Antibodies used for flow cytometry staining**

	Antibody	Labeling	Manufacturer	Clone
Lineage	CD1a	FITC	BD Pharmingen	HI149
	CD3	FITC	Miltenyi	BW264/56
	CD4	FITC	Miltenyi	VIT4
	CD14	FITC	BD Pharmingen	M5E2
	CD16	FITC	Miltenyi	REA423
	CD19	FITC	BD Pharmingen	HIB19
	CD34	FITC	Miltenyi	AC136
	CD303	FITC	Biologend	201A
	FcεRI	FITC	eBioscience	AER-37
	CD127	PE	BD Pharmingen	HIL-7R-M21
	CD45	PE-Cy7	BD Pharmingen	H130
	c-kit	APC	Miltenyi	REA787
	CRTH2	APC-Vio770	Miltenyi	REA598

FITC: fluorescein isothiocyanate; PE: phycoerythrin; Cy: cyanine; APC: allophycocyanine

**Supplementary Table S3: Antibodies used for immunofluorescence staining**

Primary antibodies				Secondary antibodies		
Antibody	Isotype	Clone	Manufacturer	Clone	Manufacturer	Labeling
CD127	Rabbit IgG	6H0T7	Clinisciences	polyclonal	Thermo Fisher	A488
Lineage	CD3	Rat IgG	KT3	polyclonal	Jackson	Cy3
	CD19	Rat Ig2a, κ	6OMP31			
	CD14	Sheep IgG	polyclonal	Biotechne	polyclonal	Jackson
CRTH2	Mouse IgG1, κ	G-12	SantaCruz Biotechnology	polyclonal	Thermo Fisher	A647
T-bet	Mouse IgG1, κ	eBio4B10	Thermo Fisher			

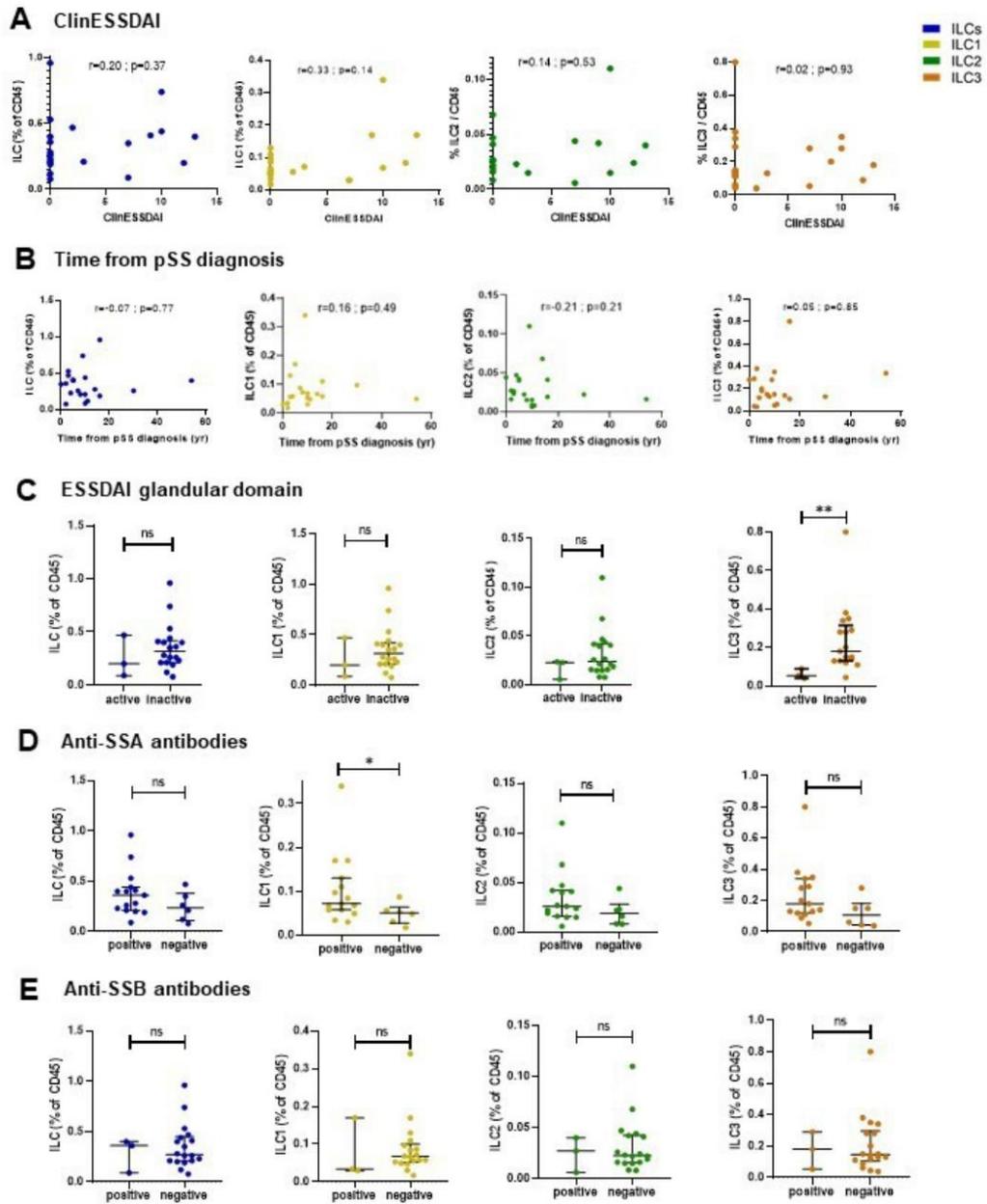
Cy: cyanine

## Supplementary Figures

### **Supplementary Figure 1: Peripheral blood analysis: frequency of total innate lymphoid cells (ILCs) and ILC1, 2 and 3 subsets and association with clinical and biological manifestations in primary Sjögren's syndrome (pSS).**

**(A)** Correlation between total ILC, ILC1, 2 and 3 subsets frequency and disease activity measured by ClinESSDAI in pSS patients (N=21). **(B)** Correlation between total ILC, ILC1, 2 and 3 subsets frequency and time from pSS diagnosis (N=21). **(C)** Total ILC, ILC1, 2 and 3 subsets frequency in pSS patients with or without glandular manifestations defined as active ESSDAI glandular domain (N=21). **(D)** Total ILC, ILC1, 2 and 3 subsets frequency in pSS patients with or without positive anti-SSA antibodies (N=21). **(E)** Total ILC, ILC1, 2 and 3 subsets frequency in pSS patients with or without positive anti-SSB antibodies (N=21).

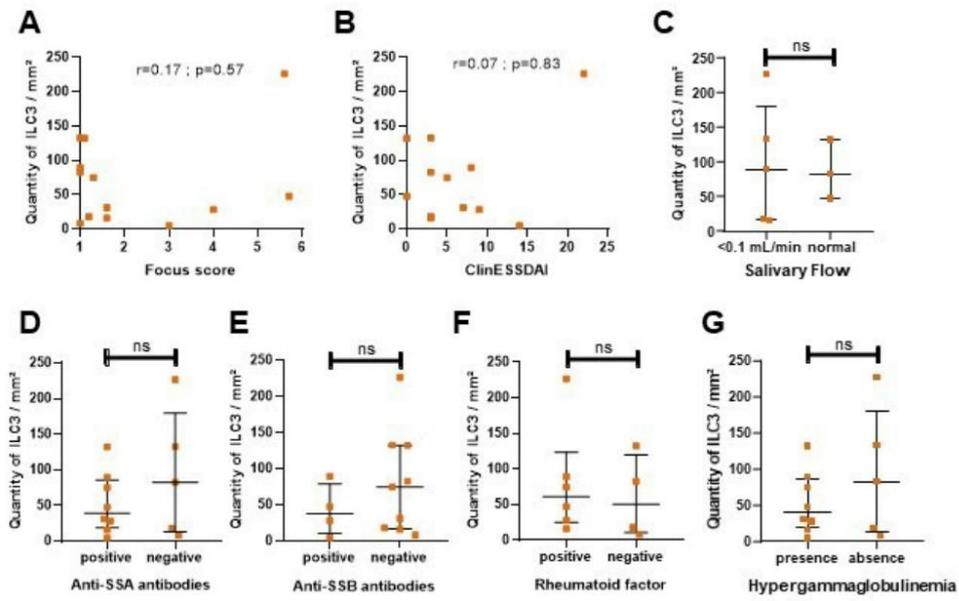
Data are median +/-IQR. \*:  $p<0.05$ ; \*\*:  $p<0.01$ ; yr: years.



**Supplementary Figure 2:****Supplementary Figure 2: Minor salivary gland (MSG) analysis: quantity of ILC3 subset and association with clinical and biological manifestations in primary Sjögren's syndrome (pSS).**

(A) Correlation between the quantity of ILC3 subset in inflammatory infiltrates of pSS patient MSGs and the focus score (N=13). (B) Correlation between the quantity of ILC3 subset in inflammatory infiltrates of pSS patient MSGs and disease activity measured by ClinESSDAI (N=12). (C) Quantity of ILC3 subset in inflammatory infiltrates of pSS patient MSGs with altered or normal salivary flow ( $p>0.99$ ) (N=8). (D) Quantity of ILC3 subset in inflammatory infiltrates of pSS patient MSGs with positive or negative anti-SSA antibodies ( $p=0.52$ ) (N=13). (E) Quantity of ILC3 subset in inflammatory infiltrates of pSS patient MSGs with positive or negative anti-SSB antibodies ( $p=0.50$ ) (N=13). (F) Quantity of ILC3 subset in inflammatory infiltrates of pSS patient MSGs with positive or negative rheumatoid factor ( $p=0.76$ ) (N=10). (G) Quantity of ILC3 subset in inflammatory infiltrates of pSS patient MSGs with or without hypogammaglobulinemia ( $p=0.52$ ) (N=13).

Data are median +/-IQR. ILC: innate lymphoid cells.



# **TROISIEME PARTIE**

**Repositionnement thérapeutique**

**par une méthode**

**transcriptomique dans le Sjp**

# A.Introduction

Actuellement aucun traitement n'a d'autorisation de mise sur le marché pour traiter les manifestations systémiques du SJP. Des études récentes ont amélioré notre compréhension des mécanismes de la maladie, néanmoins, la recherche thérapeutique est longue et coûteuse.

Le repurposing, ou repositionnement de médicaments, consiste à utiliser un médicament existant, initialement approuvé ou testé pour une maladie, dans une autre maladie. Cela présente un grand avantage par rapport au développement traditionnel de médicaments, car cela peut conduire à de nouveaux traitements pour les patients, à un rythme plus rapide que dans les programmes de développement de médicaments classiques. En effet, dans le cadre du repositionnement d'un médicament, tous les travaux précliniques ont déjà été effectués, et seule la démonstration de l'efficacité du médicament dans la nouvelle maladie est nécessaire.

Historiquement, l'utilisation de l'hydroxychloroquine dans le lupus ou du rituximab dans la PR sont des exemples de repositionnement thérapeutique. Récemment, cette stratégie de repurposing a conduit à l'évaluation de l'ustekinumab dans le lupus <sup>184</sup> et a suggéré que les inhibiteurs de la PI3K et de la cible mammalienne de la rapamycine (mTOR) pourraient être des options thérapeutiques potentielles dans le lupus <sup>185</sup>.

Les similitudes entre deux médicaments ou deux maladies peuvent également être déterminées par leurs profils transcriptomiques, sur la base de "signatures de médicaments" ou de "signatures de maladies" similaires <sup>184</sup>. De cette manière, de nombreuses approches actuelles visant à associer d'anciens médicaments à de nouvelles indications dépendent des signatures complémentaires d'un médicament et d'une maladie. Le Broad Institute a été le pionnier de l'idée de l'inversion de signature lorsqu'il a commencé à rassembler des signatures de

médicaments basées sur l'expression génétique en 2006 dans le cadre de la Connectivity Map (CMap) <sup>186</sup>. Au cours de la dernière décennie, CMap n'a cessé de s'étendre. Le repositionnement computationnel fournit des approches alternatives à la génération d'hypothèses et à la prédiction du repositionnement de médicaments.

Nous avons appliqué ce repositionnement thérapeutique par une approche transcriptomique, au SJP, dans le but de déterminer de nouveaux médicaments ou des cibles thérapeutiques potentielles.

Le résultat de cette étude a été publiée dans *Rheumatology* (Oxford) dans l'article « *Identification of new candidate drugs for primary Sjögren's syndrome using a drug repurposing transcriptomic approach* » ci-joint. Nous ne reviendrons donc ici pas sur les méthodes et les résultats.

B. Article : “Identification of new candidate drugs for primary Sjögren’s syndrome using a drug repurposing transcriptomic approach”



Basic science

# Identification of new candidate drugs for primary Sjögren's syndrome using a drug repurposing transcriptomic approach

Renaud Felten<sup>1,2,3</sup>, Tao Ye<sup>4</sup>, Cedric Schleiss<sup>2</sup>, Benno Schwikowski<sup>5</sup>, Jean Sibilia<sup>1,3,6</sup>, Fanny Monneaux<sup>2</sup>, Hélène Dumortier<sup>2</sup>, Roland Jonsson<sup>7</sup>, Christopher Lessard<sup>8</sup>, Fai Ng<sup>9</sup>, Tsutomu Takeuchi<sup>10</sup>, Xavier Mariette<sup>11</sup>, Jacques-Eric Gottenberg<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Service de Rhumatologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>2</sup>Laboratoire d'Immunologie, Immunopathologie et Chimie Thérapeutique, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC), CNRS UPR3572, Strasbourg, France

<sup>3</sup>RESO, Centre de Référence des Maladies Autoimmunes Systémiques Rares Est Sud-Ouest, Strasbourg, France

<sup>4</sup>IGBMC, CNRS UMR7104, Inserm U1258, Université de Strasbourg, Illkirch, France

<sup>5</sup>Computational Systems Biomedicine Lab, Institut Pasteur, Paris, France

<sup>6</sup>Laboratoire d'ImmunoRhumatologie Moléculaire, INSERM UMR\_S1109, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>7</sup>Broegelmann Research Laboratory, Department of Clinical Science, University of Bergen, Bergen, Norway

<sup>8</sup>Department of Pathology, Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, OK, USA

<sup>9</sup>Translational and Clinical Research Institute, Newcastle University, Newcastle, UK

<sup>10</sup>Division of Rheumatology and Clinical Immunology, Keio University, Tokyo, Japan

<sup>11</sup>Service de Rhumatologie, Hôpital Bicêtre, APHP, Université Paris-Saclay, Paris, France

\*Correspondence to: Jacques-Eric Gottenberg, Service de Rhumatologie, Centre National de Référence des Maladies Autoimmunes et Systémiques Rares, Hôpital de Haute-pierre, 1 Avenue Molière BP 83049, 67098 Strasbourg Cedex, France. E-mail: jacques-eric.gottenberg@chru-strasbourg.fr

## Abstract

**Objectives:** To date, no immunomodulatory drug has demonstrated its efficacy in primary SS (pSS). We sought to analyse potential commonalities between pSS transcriptomic signatures and signatures of various drugs or specific knock-in or knock-down genes.

**Methods:** Gene expression from peripheral blood samples of patients with pSS was compared with that of healthy controls in two cohorts and three public databases. In each of the five datasets, we analysed the 150 most up- and downregulated genes between pSS patients and controls with regard to the differentially expressed genes resulting from the biological action on nine cell lines of 2837 drugs, 2160 knock-in and 3799 knock-down genes in the Connectivity Map database.

**Results:** We analysed 1008 peripheral blood transcriptomes from five independent studies (868 patients with pSS and 140 healthy controls). Eleven drugs could represent potential candidate drugs, with histone deacetylases and PI3K inhibitors among the most significantly associated. Twelve knock-in genes were associated with a pSS-like profile and 23 knock-down genes were associated with a pSS-revert profile. Most of those genes (28/35, 80%) were interferon-regulated.

**Conclusion:** This first drug repositioning transcriptomic approach in SS confirms the interest of targeting interferons and identifies histone deacetylases and PI3K inhibitors as potential therapeutic targets.

**Keywords:** SS, drug repurposing, clue, therapeutics, transcriptomic signature, IFNs, histone deacetylase inhibitors

### Rheumatology key messages

- This is the first drug repurposing transcriptomic approach in primary Sjögren's syndrome.
- It confirms the interest of targeting interferons and co-stimulatory molecules.
- It identifies histone deacetylases and PI3K inhibitors as potential therapeutic targets.

## Introduction

Primary SS (pSS) is a complex systemic autoimmune disease characterized by a wide spectrum of clinical and laboratory

findings, with variable clinical course and outcomes. The pathogenesis of pSS is not fully understood, but the disease

Received: 3 October 2022. Accepted: 14 February 2023

  The Author(s) 2023. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Rheumatology. All rights reserved. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com

has been recognized as the result of a complex interplay between immunological, genetic and environmental factors, implying the involvement of both innate and adaptive immunity [1]. pSS follows a typical multistep model of human autoimmune disease, characterized by loss of immunologic tolerance to self-antigens, secretion of autoantibodies, and subsequent emergence of clinical symptoms [2, 3]. To date, no immunomodulatory drug has proved effective in pSS despite the ever-increasing number of therapeutic trials [4, 5]. Several unmet needs remain in the treatment of pSS, and patients lack specific treatments. New research has improved our understanding of disease mechanisms, with notable advances in our knowledge about the genetic susceptibility of disease [6], the complex role of IFN pathways [7] and the molecular processes of the chronic autoimmune response in exocrine glands [8]. Therapeutic research is nevertheless long and costly.

Drug repurposing, or drug repositioning, refers to the use of an existing drug, originally approved or tested for one condition, in a different disease. This offers a great advantage compared with traditional drug development in that it can lead to new treatments for patients, at a faster pace than in conventional drug development programs. Indeed, in drug repurposing, all pre-clinical work has already been carried out, and only the demonstration of drug effectiveness in the new disease is required. Indeed, all the work done in the early phases of drug development, consisting of toxicological analyses and dose testing in particular, does not need to be repeated. Recently, this repurposing strategy has led to the evaluation of ustekinumab in SLE [9] and has suggested that phosphoinositol 3 kinase (PI3K) and mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors could be potential therapeutic options in SLE [10].

Similarities between two drugs or two diseases can also be determined by their transcriptomic profiles, on the basis of similar 'drug signatures' or 'disease signatures' [9]. Likewise, many current approaches for matching old drugs with new indications depend on a drug and a disease having complementary signatures. The Broad Institute pioneered the idea of signature reversion when they began curating gene expression-based drug signatures in 2006 as part of the Connectivity Map (CMap) [11]. Throughout the past decade, CMap has been continuously expanded. Computational repurposing provides alternative approaches needed for hypothesis generation and prediction for drug repurposing.

Here we propose the application of a similar transcriptomic approach to pSS, with the objective of determining potential drugs or therapeutic targets.

## Methods

### Data generated from the ASSESS cohort and a Norwegian cohort

We analysed data from the ASSESS cohort, a multicentre prospective French clinical cohort (Assessment of Systemic Signs and Evolutions in SS [12, 13]). The objective of this prospective cohort is to identify biomarkers of systemic complications in pSS. Whole blood RNA for 376 patients, extracted at enrolment, and 49 healthy blood donors, all women between 50 and 60 years old, were analysed. Patient demographics, disease activity and treatment of the ASSESS cohort were previously reported [13].

The whole blood RNA for 141 pSS patients from a Norwegian cohort was analysed using the same methodology,

microarrays and transcriptomic platform, as used for the ASSESS cohort. The Norwegian cohort and the healthy controls were analysed at the same time, different from the time of analysis of the ASSESS patients. We checked for possible batch effect by fitting, for each gene, a linear model with a fixed effect for each centre and tested for any non-zero effects by ANOVA. After Bonferroni correction for multiple testing, we identified evidence for centre effects at the  $\alpha=0.01$  confidence level for only 1023 of 18 526 (i.e. 5.5%) genes. Therefore, we refrained from using any batch correction.

RNA quality was validated using the RNA 6000 Nano Kit and the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). An amount of 75 ng of total RNA was reverse transcribed using the GeneChip WT Plus Reagent kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, reference: 902281), without globin mRNA reduction. Briefly, the resulting double-stranded cDNA was used for *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase. After purification, 5.5  $\mu$ g of the resulting sense-strand cDNA was fragmented and labelled with biotin. These steps involved using the GeneChip WT Plus Reagent kit, according to the manufacturer's instructions. After size analysis of fragmented sense-strand cDNA with Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), cDNA was then hybridized to the GeneChip Clariom S Human (Affymetrix, Santa Clara, California, USA) at 45°C for 17 h. After hybridization, chips were washed on the GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix) according to the manufacturer's instructions and scanned using the GeneChip Scanner 3000 7G system. The scanned images were then analysed with Expression Console software (Affymetrix) to obtain raw data (.cel files) and quality control metrics. Data from the ASSESS cohort were deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) [GEO Series (GSE) 140161].

### Public datasets

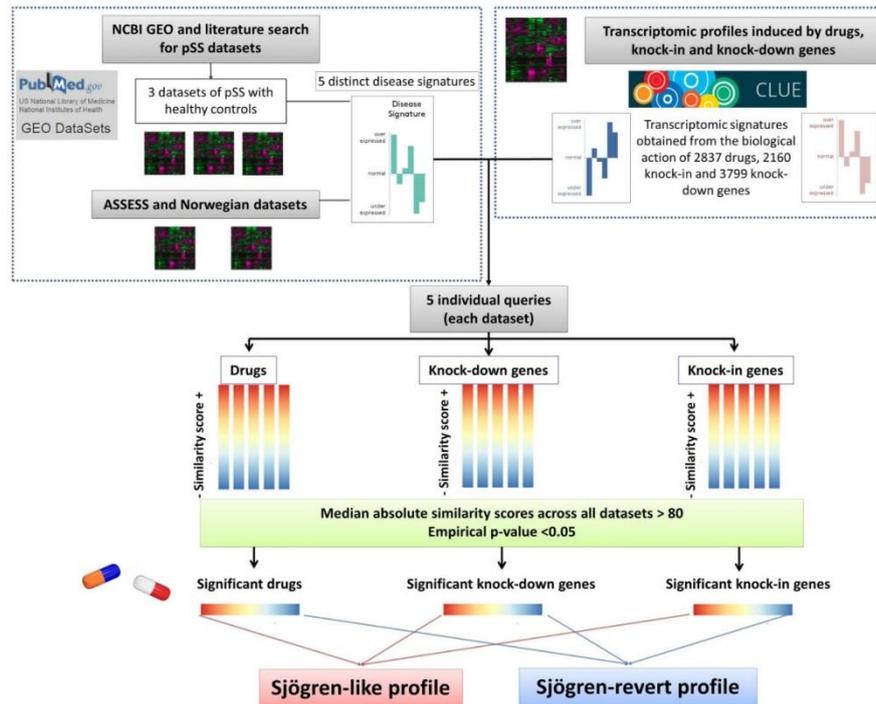
We searched the literature and the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GEO database for transcriptomic blood data from pSS patients compared with healthy controls. We selected all available datasets performed in blood, with concomitant analysis of pSS patients and healthy controls. For one dataset, information on the sex of controls was available [14]. For two datasets, information on patient characteristics and disease activity was reported in the corresponding publications [14, 15].

### Differentially expressed genes between patients with pSS and controls across the datasets

Significant differentially expressed genes (adjusted  $P < 0.01$ ) were sorted by the log-fold change. The 150 most upregulated and 150 most downregulated genes were selected (Supplementary Tables S1 and S2, available at *Rheumatology* online). Venn diagrams were generated by using the R package ggVennDiagram (1.2.2) (Supplementary Fig. S1, available at *Rheumatology* online).

### Drug repurposing strategy

In this study, we used the Connectivity Map approach (Fig. 1). First, we identified differentially expressed genes between pSS patients and healthy controls in five datasets: the ASSESS cohort, a Norwegian cohort and three public databases. The differential expression analysis of each dataset was performed independently by using the R language and



**Figure 1.** Methods of drug-repurposing transcriptomic analysis (adapted from Toro-Dominguez *et al.*). Figure adapted from Toro-Dominguez *et al.* under the Creative Commons Attribution 4.0 International licence (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) [10]. In each of the five distinct datasets, we analysed the 150 most up- and downregulated genes between pSS patients and controls with regard to the differentially expressed genes resulting from the biological action on nine cell lines of 2837 drugs and 2160 knock-in and 3799 knock-down genes in the Connectivity Map database. A connectivity score was computed for each candidate drug/gene using the 150 most upregulated and 150 most downregulated genes between pSS patients and controls in each of the five datasets. Then, we calculated a median connectivity score for each candidate drug/gene according to the median of the respective connectivity scores in the five datasets

Bioconductor-Limma package (3.42.2) [16]. For each dataset, significant differentially expressed genes (adjusted  $P < 0.01$ ) were sorted by the log-fold change. The 150 most upregulated and 150 most downregulated genes in each of the five datasets were independently submitted to the cloud-based software platform Clue: The Drug Repurposing Hub (collaborative project between the Broad Institute's Cancer Program, Center for Therapeutic Development and Connectivity Map group) [17]. The CMap database (L1000) contains the transcriptomic signatures corresponding to differentially expressed genes resulting from the biological action on nine cell lines (PC3, VCAP, A375, A549, HA1E, HCC515, HT29, MCF7, HEPG2) of (i) 2837 molecules; (ii) specific overexpression (knock-in) of 2160 genes; and (iii) specific knock-down of 3799 genes. A connectivity score was computed for each candidate drug/gene using the 150 most upregulated and 150 most downregulated genes between pSS patients and controls in each of the five datasets. Then, a median connectivity score for each candidate drug/gene was calculated according to the median of the respective connectivity scores in the five datasets. To assess the significance of the scores, the empirical score distribution over 10 000 perturbed data sets was used, in which rows and columns in the original dataset were

permutated using i.i.d. distributed permutations. The empirical  $P$ -value was then calculated as the fraction of permutations with a connectivity score equal to or greater than the actual median connectivity score. Drugs and genes were selected if  $P < 0.05$  and absolute connectivity score  $> 80$ . If this score is (individually) statistically significant and sufficiently positive ( $> 80$ ,  $P < 0.05$ ), the tested molecule, or altered gene expression, mimics the signature of the disease and represents a potential experimental model of the disease. Conversely, if this score is statistically significant and sufficiently negative ( $< -80$ ,  $P < 0.05$ ), the tested molecule or altered gene expression inverts the signature of the disease and might represent a potential treatment or therapeutic target of interest. The statistical significance threshold was set at 5%. No alpha risk correction was performed as this study is exploratory.

We considered that knock-out or knock-in genes showing high connectivity scores with regard to differentially expressed genes between pSS and patients were potentially involved in the pSS pathogenesis. Those with positive scores correspond to a Sjögren-like profile, and those with negative connectivity scores correspond to a Sjögren-revert profile. We analysed the main biological pathways associated with these genes using the Enrichr web tool [18] and BioPlanet database

[19]. Finally, we used the Interferome database (Monash University) of IFN-regulated genes to determine whether significant identified genes were enriched in various IFN-regulated pathways [20].

Drugs and genes that are significantly associated with the transcriptomic signature of pSS, positively or negatively, were further studied for their role in autoimmunity and pSS.

### Ethics

For the four public already published datasets, the patient data have been obtained from GEO database. GEO is a public repository that contains molecular data that could be considered sensible from certain ethical perspectives given that these data describe the molecular status of patients. However, this source of data doesn't contain personal details or any other way to allow for patient identification nor other clinical details of patients. The ASSESS cohort was approved by the Ethics Committee of Bichat Hospital. The Norway cohort was approved by Regional Ethics Committee West, NorwayID: REK 2010/1455. All participants gave informed consent to participate in the study before taking part.

### Results

We identified four datasets in NCBI GEO [21] and in the literature, concerning blood datasets comprising pSS patients and healthy control transcriptomes [6, 14, 15, 22]. After verification, given that the Emamian [22] and GSE 51092 [6] data were overlapping, including the same patients, we included only the GSE 51092 dataset, which was larger. All transcriptomic data from the three remaining datasets were included in our analysis (i.e. 131 pSS and 29 healthy controls from GSE 66795 [15], 190 pSS and 32 healthy controls from GSE 51092 [6] and 30 pSS and 30 healthy controls from GSE 84844 [14]) (Table 1). We added data from the ASSESS and Norwegian cohorts comprising 376 pSS patients and 141 pSS patients, respectively, compared with 49 healthy controls. In total, 1008 peripheral blood transcriptomes were analysed, including 868 pSS patients and 140 healthy controls (Table 1). In each of the five distinct datasets, the 150 most up- and downregulated genes between pSS patients and controls were analysed (Fig. 1, Supplementary Tables S3 and S4, available at *Rheumatology* online).

#### Differentially expressed genes between patients with pSS and controls across the five datasets

The expression of 20 common genes (IFI27, IFI44L, RSAD2, IFI44, IFIT1, ISG15, EPSTI1, CMPK2, IFI6, OAS1, IFIT3, USP18, RTP4, SPATS2L, MX1, ANKRD22, TNFAIP6,

XAF1, LAP3, IFIT2) was upregulated in patients compared with controls in all datasets; all genes were IFN-regulated (Supplementary Fig. S1, available at *Rheumatology* online). We did not find any common gene across all datasets with downregulated expression compared with controls.

#### Comparison between differentially expressed genes between patients and controls and drug-induced differentially expressed genes in cell lines

Eighteen drugs had a median positive connectivity score, generating a pSS-like profile, thus mimicking the disease signature (Supplementary Table S5, available at *Rheumatology* online). Eleven molecules (lasalocid, kU-0060648, butoconazole, NVP-BEZ235, cerivastatin, ampicillin, fluorometholone, droxinostat, ritanserin, amylocaine and tipifarnib) had a significant negative connectivity score, thus inverting the disease signature (Supplementary Table S5, available at *Rheumatology* online). Of note, none of these drugs had a significant negative connectivity score across all five dataset disease signatures (Table 2, Fig. 2, Supplementary Table S5, available at *Rheumatology* online).

#### Comparison between differentially expressed genes between patients and controls and differentially expressed genes in cell lines after specific gene knock-in or knock-down

Twelve knock-in genes were associated with a pSS-like profile and 23 knock-down genes were associated with a pSS-revert profile (Table 3). According to the Enrichr web tool and BioPlanet database analysis, among these 35 genes, eight are involved in 'immune system' pathways (*LYN*; *CD40*; *IFNG*; *IFNB1*; *TLR8*; *BCL10*; *CD44*, *UBE2J1*). Type I and II IFNs (*IFNB1* and *IFNG*) were highly ranked (connectivity score >99, Supplementary Table S3, available at *Rheumatology* online). According to Interferome analysis, among these same 35 genes, 28 (80%) were IFN-regulated genes, associated with various IFN-regulated pathways, 12 whose overexpression induced a pSS-like profile (100%) and 16 whose knock-down induced a pSS-revert profile (70%).

Four knock-in genes were associated with a pSS-revert profile and 49 knock-down genes were associated with a pSS-like profile (Table 3). According to the Enrichr web tool and BioPlanet database analysis, among these 53 genes, six (*PSMD5*; *CD14*; *TYK2*; *KIF2C*; *PPP2R1A*; *SOS1*) are involved in 'immune system' pathways. According to Interferome analysis, among these same 53 genes, 41 (77%) were associated with various IFN-regulated pathways, three whose overexpression induced a pSS-revert profile (75%) and 38 whose knock-down induced a pSS-like profile (78%).

### Discussion

The aim of our study was to identify new therapeutic targets in pSS using a transcriptomic approach. This type of global 'omic' analysis approach, without *a priori* hypotheses, allows for exploring unexpected therapeutic avenues and discovering potential interesting new and innovative pathophysiological pathways. To the best of our knowledge, this is the first time that such an approach has been used in the context of SS.

First, the present study confirms the variability of the pSS signature that we recently analysed specifically [13] and the consistency of the IFN signature because 100% of the few

**Table 1.** Dataset contributions

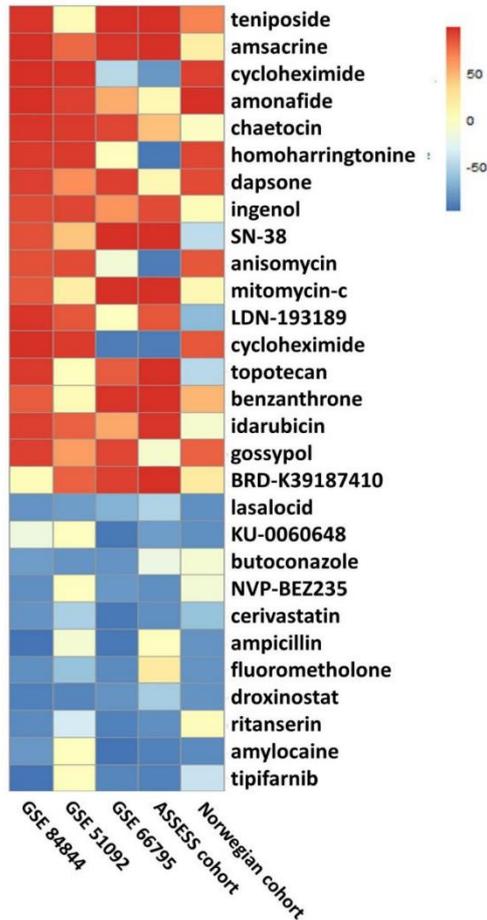
Dataset	Number of pSS patients	Number of healthy controls	Samples
GSE 66795 [15]	131	29	Whole blood
GSE 51092 [6]	190	32	Whole blood
GSE 84844 [14]	30	30	Whole blood
ASSESS cohort (GSE140161)	376	49	Whole blood
Norwegian cohort	141		Whole blood
Total	868	140	

pSS: primary SS.

**Table 2.** Drugs significantly associated with primary SS (pSS) transcriptomic signature and their biological targets and mode of action

Median connectivity score	Drug	Description, biological target	Corresponding targeted gene	P-value
96.51	teniposide	topoisomerase inhibitor, DNA inhibitor, DNA repair enzyme inhibitor, mitotic inhibitor	TOP2A, CYP3A5	0.00019998
96.42	amsacrine	topoisomerase inhibitor, DNA intercalating drug	TOP2A, KCNH2	0.0009999
92.71	cycloheximide	glycogen synthase kinase inhibitor, protein synthesis inhibitor	GSK3B, RPL3	0.00089991
92.03	amonafide	topoisomerase inhibitor, DNA intercalating drug	TOP2A, TOP2B	0.00139986
91.43	chaetocin	histone lysine methyltransferase inhibitor, histone lysine N methyltransferase inhibitor	EHMT2, SUV39H1	0.00179982
90.59	homoharringtonine	apoptosis stimulant, protein synthesis inhibitor	RPL3	0.00249975
89.02	dapsone	dihydrofolate reductase inhibitor, dihydropteroate synthase inhibitor, FOLP inhibitor	DHFR	0.0029997
87.90	ingenol	PKC activator	PRKCD, PRKCE	0.00289971
87.63	SN-38	topoisomerase inhibitor	TOP1	0.0039996
85.18	anisomycin	DNA synthesis inhibitor	NHP2L1, RPL10L, RPL11, RPL13A, RPL15, RPL19, RPL23, RPL23A, RPL26L1, RPL3, RPL37, RPL8, RSL24D1	0.00539946
85.06	mitomycin-c	DNA alkylating drug, DNA inhibitor, DNA synthesis inhibitor		0.00579942
84.46	LDN-193189	ALK inhibitor, serine/threonine protein kinase inhibitor	ACVR1, BMPR1A	0.00619938
83.94	cycloheximide	glycogen synthase kinase inhibitor, protein synthesis inhibitor	GSK3B, RPL3	0.00679932
82.71	topotecan	topoisomerase inhibitor	TOP1, TOP1MT	0.00679932
81.95	benzanthrone	aromatic hydrocarbon derivative with fluorescent and luminescent properties		0.00759924
81.59	idarubicin	topoisomerase inhibitor, radical formation stimulant, RNA synthesis inhibitor	TOP2A	0.01009899
80.96	gossypol	BCL inhibitor, MCL1 inhibitor, 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor, growth factor receptor modulator, lipid peroxidase inhibitor	BCL2, BCL2L1, MCL1, BCL2L2, CTGF, EGF	0.0089991
80.28	BRD-K39187410	antiamyloidogenic agent		0.0109989
-80.96	lasalocid	ionophore antibiotic		0.01069893
-81.51	kU-0060648	DNA dependent protein kinase, DNA dependent protein kinase inhibitor, PI3K inhibitor	PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PRKDC	0.0069993
-81.72	butoconazole	cell wall synthesis inhibitor, sterol demethylase inhibitor		0.00759924
-83.64	NVP-BEZ235	mTOR inhibitor, PI3K inhibitor, protein kinase inhibitor	MTOR, PIK3CA, PIK3CG, PIK3CD, ATR, PIK3CB	0.00639936
-84.15	cerivastatin	HMGCR inhibitor	HMGCR, CYP2C8, CYP3A5	0.00729927
-84.21	ampicillin	cell wall synthesis inhibitor	SLC15A1	0.00609939
-85.29	fluorometholone	corticosteroid agonist, glucocorticoid receptor agonist	NR3C1	0.00339966
-85.46	droxinostat	HDAC inhibitor	HDAC6, HDAC8	0.00479952
-86.76	ritanserin	serotonin receptor antagonist	HTR2A, HTR2C, HTR2B, ADRA1A, ADRA1B, ADRA1D, HTR1A, HTR1B, HTR1D, HTR5A, HTR6, HTR7	0.00389961
-88.45	amylocaine	local anesthetic		0.00379962
-90.45	tipifarnib	farnesyltransferase inhibitor, angiogenesis inhibitor, apoptosis stimulant, H-RAS inhibitor,	FNTA, FNTB	0.00259974

Cells are coded based on the median connectivity score of each drug, bold as a negative connectivity score and not-bold as a positive connectivity score.



**Figure 2.** Heatmap of significant drugs according to their median connectivity score. Heatmap of significant drugs according to their connectivity scores for each dataset. Columns: different datasets used for the analysis. Rows: different drugs, listed in order of decreasing median connectivity score. Cells are colour-coded based on the median connectivity score of each drug, from lowest (dark blue) to highest (red). Blue indicates a negative connectivity score, and red indicates a positive connectivity score

common genes across all datasets with an upregulated expression in patients with pSS compared with controls were IFN-regulated genes.

This work has identified several promising therapeutic targets. Type I and II IFNs were highly ranked, consistent with literature work showing that dysregulation of IFN pathways is an important immunopathogenic feature of pSS [7]. TLR8 is an endosomal receptor that recognizes single-stranded RNA, leading to activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B and an IFN-induced antiviral response. An increased expression of TLR8 has been shown in pSS patients [23]. Self-RNA bound to anti-SS type A (SSA) and B (SSB) autoantibodies

could lead to TLR8-driven stimulation of dendritic cells and self-reactive B cells [24, 25].

CD14 acts as a co-receptor (along with the TLR4) for the detection of bacterial lipopolysaccharide. CD14<sup>+</sup> monocytes are now known to play an important role, linking innate and adaptive immunity in pSS [26].

Overexpression of CD40 resulted in a signature mimicking the disease signature. Interaction between CD40 and its ligand CD40L results in B-cell activation (leading to immunoglobulin class switching, germinal centre formation, and cytokine production) and T-cell activation. Of note, iscalimab, a monoclonal antibody targeting CD40, reached its primary end point in a recent phase II placebo-controlled randomized trial for SS [27].

Four other genes were associated with a Sjögren profile, which suggests that they could represent potential therapeutic targets: LYN and BCL10 (positive connectivity scores when knocked-in) and CD44 and UBE2J1 (negative connectivity score when knocked-down). Lyn is a src-tyrosine kinase involved in B-cell activation. A single nucleotide polymorphism within this gene, namely rs6983130, was identified as protective against SLE [28]. Some inhibitors of these src tyrosine kinases, such as bosutinib and dasatinib, are already used in haematology, but they have never been studied in autoimmune diseases.

CD44 participates in a wide variety of cellular functions including lymphocyte activation, recirculation and homing, and its expression is a marker for effector-memory T cells. Serum levels of soluble CD44 have been shown to be higher in female patients with pSS compared with healthy women [29]. An anti-CD44 therapeutic antibody, bivatuzumab, chemically linked to various radioisotopes, is currently under evaluation for use in radiotherapy, e.g. inoperable recurrent or metastatic head and neck cancer [30].

Nuclear expression of BCL10 is observed in pSS in lymphocytes infiltrating minor salivary glands [31]. Bcl10 peptide inhibitors have been developed and evaluated in B-cell lymphomas [32].

UBE2J1 gene codes for ubiquitin-conjugating enzyme E2 J1 protein. This ubiquitin is involved in the endoplasmic reticulum-associated protein degradation. An increased expression of UBE2J1 has already been demonstrated in pSS patients and was significantly correlated with increased expression of pro-inflammatory cytokines in salivary glands [31]. Although these genes and their corresponding proteins have been identified as having an implication in pSS, no pSS treatment has focused on targeting them to date.

The present study also allowed for identifying potential new drug candidates, such as droxinostat, an inhibitor of histone deacetylase (HDACi). Droxinostat is an HDACi, with selectivity for HDACs 3, 6 and 8 [33]. It has recently been investigated as a potential new therapy for some cancers [34]. Class I HDACs (HDAC1, 2, 3 and 8) are important for STAT-1- and/or STAT-2-dependent IFN signalling [35], and HDAC activity has been found to be an essential element of the coactivation system for IFN-induced gene regulation and the IFN-induced innate immune response [36]. The action of histone deacetylases is necessary for the full transcriptional activation of IFN $\alpha$ -stimulated genes [37]. In the NOD mouse model, which recapitulates both type I diabetes and pSS [38], HDACi have been demonstrated to effectively suppress pancreatic islet inflammation and  $\beta$ -cell apoptosis, limiting the disease progression of type I diabetes [39]. In SLE, the use of

**Table 3.** Knock-down and knock-in genes significantly associated with pSS transcriptomic signatures

Type of experiment	Connectivity score	Genes	Number of genes
Knock-in	+	DUSP28, BCL2L2, IFNG, IFNB1, LYN, TNFRSF1A, CD40, NLK, BCL10, RALA, GK, UFM1	12
	–	TFF2, NDUFS6, BIK, AXIN2	4
Knock-down	+	SLC25A14, HIGD2A, TEAD4, DFFB, DTYMK, GOLIM4, RRM2, DCXR, SOS1, F12, MTX2, CLTB, ATP1A3, IMPA1, SORBS3, PRKCI, SOD2, CAB39, WNT10B, FAM114A2, UBAP1, UFD1L, BTG1, TYK2, FOSL1, NNT, PRKDC, ID1, NR2F6, ISOC1, GSTP1, HPR1, TM9SF2, CD14, NDUFS7, HOMER2, KIF2C, HIST2H2BE, DHX8, TIMM17B, PSMD5, PPP2R1A, HOXA6, PDXK, UBAP2L, C16ORF80, ZAK, GTF2B, BECN1	49
	–	GTF2I, TRAF7, SULT1A2, KIF14, GRN, LAP3, PPP2R3C, MYCBP2, PSMG1, CDK7, UBE2J1, PKN2, SP3, ATP5S, TRIP13, TLR8, RPS6KA4, SUCLA2, SPECC1L, CD44, E2F3, PRMT3, TM9SF3	23
			72

Cells are coded based on the median connectivity score of each drug, – as a negative connectivity score and + as a positive connectivity score.

HDAC6-selective inhibitors has been found to improve renal outcome and survival in the NZB/W F1 mouse model [40, 41].

Ampicillin, another potential drug candidate, is an antibiotic used to prevent and treat a number of bacterial infections. Its role in the treatment of pSS is not clear, but there have been other examples of treatments originally developed as anti-infectives that have been found useful in autoimmune diseases, such as hydroxychloroquine in lupus. The administration of ampicillin alters the oral and gut microbiota. Dysbiotic oral microbiota was recently shown to initiate the activation of salivary gland epithelial cells and contribute to the IFN signature via bacterial invasion of ductal cells [42].

We also identified amylocaine, the first synthetic local anaesthetic, as a potential drug candidate. Local anaesthetics, including amylocaine, are known to affect voltage-sensitive Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels, which could be involved in salivary secretion [43]. The potential for local anaesthetics or antibiotics to treat pSS is questionable, but these findings are hypothesis-generating.

Tipifarnib (R-115777), another drug candidate, is a non-commercialized substance that is being studied in the treatment of acute myeloid leukaemia and other types of cancer. It belongs to the family of drugs called farnesyltransferase inhibitors (FTi). FTi prevent proper membrane localization of Ras proteins, some Rho family GTPases, and signalling components of G protein-coupled receptors. Ras signalling is involved in the development of autoimmunity [44–46].

Ritanserin is a serotonin receptor antagonist that was never marketed for clinical use but has been used in scientific research. Ritanserin is a diacylglycerol kinase alpha inhibitor [47], which attenuates Ras activity [48].

Two other drug candidates were identified, NVP-BEZ235 and kU-0060648, which both belong to the family of PI3K inhibitors. PI3K enzymes are part of the PI3K/AKT/mTOR pathway, and PI3K is a promising drug target in autoimmunity [49]. Recently, pascalisib reduced autoantibody secretion and improved the disease course in preclinical models of SLE and Sjögren's syndrome [50]. Seletalisib, a potent and selective PI3K $\delta$  inhibitor, demonstrated a trend towards clinical improvement in patients with pSS in a phase II study [51].

Limitations of the current study include the heterogeneity of the analysed samples, the imbalance between the sample size of patients and controls, the limited information on the sex of controls, the very limited data on disease activity and

treatment, as well as the fact that we chose to focus on peripheral blood rather than on target organs (the few available transcriptomic analyses of salivary glands were not included in our analysis). In addition, the CMap database contains experiments performed in cancer cells and not in peripheral blood cells or epithelial cells, which would have been particularly relevant for pSS. Lastly, the most recent drugs to have been evaluated for therapeutic use in pSS [4], such as belimumab, ianalumab or iscalimab, are unfortunately not included in the CMap database. Indeed, one of the major limitations of this strategy is that we are limited in our evaluation to only those drugs and gene targets that are included within these databases. Therefore, progressive expansion of such databases should enable the more precise identification of promising pSS drug targets. This type of approach allows for rapid evaluation of a large number of drugs, providing a starting point for further investigation.

## Conclusion

This exploratory study provides the first drug repurposing transcriptomic approach in pSS, confirms the interest of targeting IFNs and identifies histone deacetylases and PI3K inhibitors as potential therapeutic targets. The relevance of potential candidates identified in the present study (i.e. selective HDACi and PI3Ki) needs to be evaluated *ex vivo*, in peripheral blood mononuclear cells, cultured epithelial cells or salivary gland explants and in preclinical models.

## Supplementary material

Supplementary material is available at *Rheumatology* online.

## Data availability

The data underlying this article will be shared on reasonable request to the corresponding author.

## Funding

This work was supported by the Innovative Medicines Initiative 2 Joint Undertaking (IMI 2 JU) (NECESSITY grant 806975). The Joint Undertaking received support from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program and from the European Federation of Pharmaceutical

Industries and Associations. This work was also supported by R01 AR065953 Beth, the NIH, USA. The contents are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the official views of the NIH.

J.-E.G. received an unrestricted grant from Bristol-Myers-Squibb to carry out the transcriptomic analysis of the ASSESS and Norwegian cohorts. J.-E.G. received a grant from Geneviève Garnier (Association Française du Syndrome de Gougerot-Sjögren et des syndromes secs). The ASSESS cohort is promoted by the French Society of Rheumatology and received two research grants from the French Society of Rheumatology. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

**Disclosure statement:** All authors have declared no conflicts of interest.

### Acknowledgements

Investigators of the ASSESS cohort: Emmanuelle Dernis, Valerie Devauchelle-Pensec, Philippe Dieude, Jean-Jacques Dubost, Anne-Laure Fauchais, Vincent Goeb, Eric Hachulla, Pierre Yves Hatron, Claire Larroche, Véronique Le Guern, Jacques Morel, Aleth Perdriger, Carinne Salliot, Stephanie Rist, Alain Saraux, Jean Sibilia, Olivier Vittecoq, Gaétane Nocturne, Philippe Ravaud, Raphaële Seror. Centre de Ressources Biologiques de l'Hôpital Bichat: Sarah Tubiana.

### References

- Nocturne G, Mariette X. Advances in understanding the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol* 2013;9: 544–56.
- Brennan MT, Sankar V, Leakan RA *et al.* Sex steroid hormones in primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 2003;30:1267–71.
- Kivity S, Arango MT, Ehrenfeld M *et al.* Infection and autoimmunity in Sjögren's syndrome: a clinical study and comprehensive review. *J Autoimmun* 2014;51:17–22.
- Felten R, Scher F, Sibilia J, Gottenberg JE, Arnaud L. The pipeline of targeted therapies under clinical development for primary Sjögren's syndrome: a systematic review of trials. *Autoimmun Rev* 2019;18:576–82.
- Seror R, Nocturne G, Mariette X. Current and future therapies for primary Sjögren syndrome. *Nat Rev Rheumatol* 2021;17:475–86.
- Lessard CJ, Li H, Adrianto I *et al.* Variants at multiple loci implicated in both innate and adaptive immune responses are associated with Sjögren's syndrome. *Nat Genet* 2013;45:1284–92.
- Yao Y, Liu Z, Jallal B, Shen N, Rönnblom L. Type I interferons in Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev* 2013;12:558–66.
- Navarro-Mendoza EP, Aguirre-Valencia D, Posso-Osorio I *et al.* Cytokine markers of B lymphocytes in minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev* 2018;17:709–14.
- Kingsmore KM, Grammer AC, Lipsky PE. Drug repurposing to improve treatment of rheumatic autoimmune inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2020;16:32–52.
- Toro-Domínguez D, Carmona-Sáez P, Alarcón-Riquelme ME. Support for phosphoinositid 3 kinase and mTOR inhibitors as treatment for lupus using in-silico drug-repurposing analysis. *Arthritis Res Ther* 2017;19:54.
- Lamb J, Crawford ED, Peck D *et al.* The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science* 2006;313:1929–35.
- Gottenberg JE, Seror R, Miceli-Richard C *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:e59868.
- Trutschel D, Bost P, Mariette X *et al.* Variability in primary Sjögren's syndrome is driven by interferon alpha, and genetically associated with the class II HLA DQ locus. *Arthritis Rheumatol* 2022;74:1991–2002.
- Tasaki S, Suzuki K, Nishikawa A *et al.* Multiomic disease signatures converge to cytotoxic CD8 T cells in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2017;76:1458–66.
- James K, Al-Ali S, Tarn J, *et al.* A transcriptional signature of fatigue derived from patients with primary Sjögren's syndrome. *PLoS One* 2015;10:e0143970.
- Ritchie ME, Phipson B, Wu D *et al.* *limma* powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015;43:e47–e47.
- Corsello SM, Bittker JA, Liu Z *et al.* The Drug Repurposing Hub: a next-generation drug library and information resource. *Nat Med* 2017;23:405–8.
- Chen EY, Tan CM, Kou Y *et al.* Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 2013;14:128.
- Huang R, Grishagin I, Wang Y *et al.* The NCATS bioplanet – an integrated platform for exploring the universe of cellular signaling pathways for toxicology, systems biology, and chemical genomics. *Front Pharmacol* 2019;10:445.
- Rusinova I, Forster S, Yu S *et al.* Interferome v2.0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. *Nucleic Acids Res* 2013;41:D1040–1046.
- Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene expression omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 2002;30:207–10.
- Emamian ES, Leon JM, Lessard CJ *et al.* Peripheral blood gene expression profiling in Sjögren's syndrome. *Genes Immun* 2009;10:285–96.
- Gottenberg JE, Cagnard N, Lucchesi C *et al.* Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:2770–5.
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H *et al.* Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303:1526–9.
- Lau CM, Broughton C, Tabor AS *et al.* RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J Exp Med* 2005;202:1171–7.
- Sequí-Sabater JM, Beretta L. Defining the role of monocytes in Sjögren's syndrome. *Int J Mol Sci* 2022;23:12765.
- Jobling K, Ng WF. CD40 as a therapeutic target in Sjögren's syndrome. *Expert Rev Clin Immunol* 2018;14:535–7.
- Lu R, Vidal GS, Kelly JA *et al.* Genetic associations of LYN with systemic lupus erythematosus. *Genes Immunity* 2009;10:397–403.
- Levesque MC, Mackin DA, Fleming JA, St Clair EW. Serum levels of soluble CD44 in primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 2000;27:1444–9.
- Postema EJ, Börjesson PKE, Buijs WCAM *et al.* Dosimetric analysis of radioimmunotherapy with 186Re-labeled bivatuzumab in patients with head and neck cancer. *J Nucl Med* 2003;44:1690–9.
- Gatumu MK, Jonsson MV, Øijordsbakken G, Skarstein K. Nuclear BCL10 in primary Sjögren's syndrome. *J Oral Pathol Med* 2009; 38:501–7.
- Bao W, Sun C, Sun X *et al.* Targeting BCL10 by small peptides for the treatment of B cell lymphoma. *Theranostics* 2020;10:11622–36.
- Wood TE, Dalili S, Simpson CD *et al.* Selective inhibition of histone deacetylases sensitizes malignant cells to death receptor ligands. *Mol Cancer Ther* 2010;9:246–56.
- Huang Y, Yang W, Zeng H *et al.* Droxinostat sensitizes human colon cancer cells to apoptotic cell death via induction of oxidative stress. *Cell Mol Biol Lett* 2018;23:34.
- Falkenberg KJ, Johnstone RW. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2014;13:673–91.

36. Nusinzon I, Horvath CM. Interferon-stimulated transcription and innate antiviral immunity require deacetylase activity and histone deacetylase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:14742–7.
37. Vlasáková J, Nováková Z, Rossmeislová L *et al*. Histone deacetylase inhibitors suppress IFN $\alpha$ -induced up-regulation of promyelocytic leukemia protein. *Blood* 2007;109:1373–80.
38. Maria NI, Vogelsang P, Versnel MA. The clinical relevance of animal models in Sjögren's syndrome: the interferon signature from mouse to man. *Arthritis Research Therapy* 2015;17:172.
39. Dirice E, Ng RWS, Martínez R *et al*. Isoform-selective inhibitor of histone deacetylase 3 (HDAC3) limits pancreatic islet infiltration and protects female nonobese diabetic mice from diabetes. *J Biol Chem* 2017;292:17598–608.
40. Choi EW, Song JW, Ha N, Choi YI, Kim S. CKD-506, a novel HDAC6-selective inhibitor, improves renal outcomes and survival in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *Sci Rep* 2018;8:17297.
41. Vieson MD, Gajmerac AM, Khan D *et al*. Treatment with a selective histone deacetylase 6 inhibitor decreases lupus nephritis in NZB/W mice. *Histol Histopathol* 2017;32:1317–32.
42. Alam J, Lee A, Lee J *et al*. Dysbiotic oral microbiota and infected salivary glands in Sjögren's syndrome. *PLoS One* 2020;15:e0230667.
43. Dawson LJ, Field EA, Harmer AR, Smith PM. Acetylcholine-evoked calcium mobilization and ion channel activation in human labial gland acinar cells from patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 2001;124:480–5.
44. Mor A, Philips MR, Pillinger MH. The role of Ras signaling in lupus T lymphocytes: biology and pathogenesis. *Clin Immunol* 2007;125:215–23.
45. Rapoport MJ, Bloch O, Amit-Vazina M. "Something is wrong in the ras kingdom" - evidence for the involvement of p21Ras/MAP kinase in autoimmune diseases. *Curr Rheumatol Rev* 7:301–5.
46. Reedquist KA, Tak PP. Signal transduction pathways in chronic inflammatory autoimmune disease: small GTPases. *Open Rheumatol J* 2012;6:259–72.
47. Velnati S, Ruffo E, Massarotti A *et al*. Identification of a novel DGK $\alpha$  inhibitor for XLP-1 therapy by virtual screening. *Eur J Med Chem* 2019;164:378–90.
48. Olenchock BA, Guo R, Carpenter JH *et al*. Disruption of diacylglycerol metabolism impairs the induction of T cell anergy. *Nat Immunol* 2006;7:1174–81.
49. Ball J, Archer S, Ward S. PI3K inhibitors as potential therapeutics for autoimmune disease. *Drug Discovery Today* 2014;19:1195–9.
50. Scurion MD, Fay BL, Connell AJ, Oliver J, Smith PA. The PI3K $\delta$  inhibitor piasclisib ameliorates pathology and reduces autoantibody formation in preclinical models of systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Int Immunopharmacol* 2021;98:107904.
51. Juarez M, Diaz N, Johnston GI *et al*. A phase 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study of oral seletalisib in primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology* 2021;60:1364–75.

# DISCUSSION

Ce travail de thèse, à travers ses 3 axes, a permis de confirmer l'intérêt de certaines cibles thérapeutiques potentielles et d'en identifier de nouvelles au cours du SJp ainsi que de mieux comprendre leur implication dans la physiopathologie de cette maladie.

Nous avons ainsi notamment pu identifier :

- le rôle de BAFF et son impact sur les LT et particulièrement sur les populations régulatrices mais également le rôle potentiel d'un ciblage direct du LT ou conjoint LT-LB ;
- l'implication des ILCs dans la physiopathologie du SJp ;
- l'IFN ainsi que de nouvelles cibles thérapeutiques grâce au repositionnement thérapeutique par une approche transcriptomique.

# 1. Intérêt thérapeutique des anticorps monoclonaux anti-CD3 et anti-BAFF dans le syndrome de Sjögren primitif chez la souris NOD

## 1.1. BAFF : peut-on parler d'une nouvelle cible thérapeutique dans le SJP ?

Notre étude est la première à démontrer de manière formelle l'efficacité d'un Ac anti-BAFF dans le modèle murin SJP de la souris NOD.

### 1.1.1. Ciblage de BAFF et déplétion B : un effet synergique ?

Tant le bélimumab que le rituximab ciblent les LB, mais ils le font par des voies différentes, ce qui pourrait conduire à des effets synergiques lorsqu'ils sont utilisés ensemble. En combinant bélimumab et rituximab, on cible les LB de différentes manières. Le bélimumab inhibe les LB et la sécrétion d'auto-Ac, tandis que le rituximab déplete directement les LB circulants. Cette combinaison de traitements pourrait entraîner une suppression plus complète de l'activation lymphocytaire B. De plus, la synergie entre ces médicaments pourrait potentiellement conduire à une meilleure efficacité clinique par rapport à l'utilisation de chaque médicament seul.

BAFF augmentant après déplétion B, il est particulièrement intéressant de bloquer BAFF après déplétion lymphocytaire B<sup>187</sup>. De petites séries de cas ont en effet rapporté un excellent contrôle de la maladie lupique chez les patients traités par rituximab suivi de bélimumab<sup>188,189</sup>, et des essais randomisés testant formellement une telle thérapie séquentielle sont en cours dans le lupus (NCT03312907, NCT02260934). Étant donné que les taux sériques de BAFF augmentent après traitement par rituximab, l'administration de bélimumab après le rituximab pourrait inhiber l'action de BAFF sur ses récepteurs et retarder la reconstitution des LB autoréactifs pathogènes, ce qui pourrait améliorer et prolonger la réponse clinique. Cela est soutenu par les conclusions de Ramsköld et al. selon lesquelles, les patients ayant les nombres de LB circulants

les plus faibles, au moment du début du traitement, répondent mieux au bélimumab que les patients ayant des taux de LB plus élevés, après 24 mois <sup>190</sup>.

D'autre part, l'administration de bélimumab avant le rituximab pourrait mobiliser les LB mémoire des tissus vers la circulation et faciliter une déplétion plus importante des LB pathogènes médiée par le rituximab. Cette approche a été évaluée récemment dans une étude randomisée en double aveugle, au cours du SJP <sup>125</sup>.

L'ianalumab, un anti-BAFF-Récepteur <sup>126</sup> combine l'inhibition de BAFF et la déplétion B médiée par cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), offrant ainsi ce double mode d'action. Deux essais cliniques de phase II ont montré des résultats encourageants <sup>126,191</sup>.

L'Ac utilisé dans notre étude (Sandy-2) cumule également ces deux mécanismes d'action probablement synergiques. En effet, cet Ac s'avère bloquant pour la cytokine BAFF mais déplete également les LB sanguins et tissulaires, notamment les LB salivaires. La déplétion des LB est ici indirecte, et non-dépendante de l'ADCC mais s'explique par la privation de BAFF nécessaire à la survie des LB, en particulier les LB auto-réactifs. Il a été démontré qu'une administration unique de Sandy-2 à des souris induit une déplétion des LB en 2 semaines, jusqu'à des niveaux proches de ceux observés chez les souris déficientes en BAFF <sup>192</sup>. L'Ac utilisé ne déplete ainsi pas tous les LB (les LB péritonéaux et mémoires parviennent à survivre en l'absence de BAFF), ni les plasmocytes (du fait de la présence d'APRIL). Dans notre étude, la déplétion des LB sous l'effet de Sandy-2 paraît plus importante au sein des glandes salivaires que dans le sang ou dans la rate. L'explication tient au fait qu'après avoir bloqué BAFF par Sandy-2, on élimine la plupart des LB matures mais pas les LB transitionnels qui n'expriment pas CD62L. CD62L permet aux LB d'aller dans les ganglions et les tissus. On ne trouve donc pas ou peu de LB transitionnels dans les ganglions ou les glandes salivaires. Par conséquent, la déplétion des LB est plus complète dans les tissus que dans la rate ou le sang.

## 1.1.2. Impact du blocage de BAFF sur les LT

### 1.1.2.1. Les LT doublement négatifs

Notre étude démontre également un impact intéressant et peu étudié de la thérapeutique anti-BAFF sur les LT. L'Ac anti-BAFF induit l'augmentation d'une population de LT CD3<sup>+</sup> doublement négatifs (DN) (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>). Il est envisageable que cette population soit un artéfact lié à une perte d'expression des marqueurs CD4 et CD8 par les LT CD3<sup>+</sup> dans les glandes salivaires sous l'action des enzymes de digestion utilisés pour la préparation de la suspension cellulaire. Une digestion enzymatique peut altérer certains épitopes et rendre leur reconnaissance en cytométrie en flux plus difficile. Toutefois, un travail <sup>193</sup> évaluant l'impact d'une digestion enzymatique sur la distinction des sous-populations de LT en cytométrie en flux, n'a pas montré de modifications des sous-populations CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Ainsi, il est difficile de croire qu'un tel artéfact puisse expliquer ce résultat. Cette population DN a déjà été observée au cours du SJP par d'autres équipes, avec un rôle différent chez l'Homme et la souris.

Chez l'Homme, les LT DN représente une sous-population de lymphocytes T matures, en faible proportion dans le sang périphérique et les tissus mais jouant un rôle important dans l'homéostasie immunitaire <sup>194</sup>. En outre, ces LT agissent en tant que Trég, LT cytotoxiques ou LT auxiliaires et influencent les systèmes immunitaires innés et adaptatifs dans des situations pathologiques distinctes, associées aux maladies inflammatoires, aux maladies auto-immunes et au cancer <sup>194</sup>. Dans le SJP, cette population pourrait correspondre à des lymphocytes pathogènes corrélés à l'activité de la maladie <sup>195</sup> et impliqués dans la destruction glandulaire salivaire <sup>196</sup>. Chez la souris, en revanche, il pourrait s'agir de Trég : le transfert de ces cellules issues de jeunes souris NOD protège du diabète de type 1 <sup>197</sup>. Ces cellules sont considérées comme des Trég distincts des Trég FoxP3<sup>+</sup>, leur phénotype étant CD3<sup>+</sup>(CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) CD28<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD25<sub>low</sub>Foxp3<sup>-</sup>iCTLA-4<sup>-</sup>TCR<sub>αβ</sub><sup>+</sup>. Dans notre étude, nous avons trouvé une corrélation inverse entre la proportion de ces cellules et l'infiltrat lymphocytaire global (focus

score). Ainsi, il s'agirait d'une population de Trég recrutés dans les glandes salivaires pour tenter de contrôler la maladie.

En ce qui concerne le diabète, l'efficacité d'un Ac anti-BAFF dans le diabète de la souris NOD avait déjà été démontrée par d'autres équipes <sup>165,166</sup>. Il avait alors été établi qu'un traitement initial associé à des doses de maintenance toutes les 2 semaines était nécessaire pour maintenir l'effet thérapeutique à long terme. Un de ces travaux avait également mis en évidence une augmentation des Trég ainsi que des LT doublement négatifs en suggérant un rôle protecteur de ces cellules sur la survenue d'un diabète.

#### 1.1.2.1.1. Perspectives

Afin de mieux comprendre le rôle de la population de LT doublement négatifs, des études de cytométrie en flux, pour caractériser et établir le phénotype de cette population, pourraient être effectuées. De plus, l'isolement de cette population et son transfert vers des souris NOD femelles de 10 semaines pourraient permettre de confirmer leur effet protecteur pour améliorer la sialadénite et augmenter le flux salivaire.

#### 1.1.2.2. Les LT régulateurs

Enfin, nous avons également noté une augmentation du nombre de Trég CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> au sein des glandes salivaires. Cependant, l'effet de BAFF ou de son blocage sur les Trég n'est pas, pour l'heure, clairement établi. Dans un modèle murin (souris transgéniques pour BAFF et dépourvues de LT), certains effets de BAFF semblent indépendants du LT <sup>198</sup>. De plus, les souris transgéniques surexprimant BAFF ont une augmentation de leur Trég <sup>199</sup> alors que chez les souris BAFF<sup>-/-</sup>, les Trég conservent un effet protecteur sur la survenue de diabète <sup>166</sup>. Chez l'Homme, les populations Trég et Th17 dans le sang périphérique avant et après l'administration de bélimumab ont été étudiées chez 20 patients atteints de lupus actif réfractaire au traitement standard <sup>200</sup>. Il a été observé une augmentation significative des pourcentages de Trég. Des études *in vitro* ont montré que les Trég purifiés à partir de patients traités par bélimumab étaient



En effet, un modèle murin transgénique surexprimant BAFF tout en étant également totalement dépourvu de LT développe la maladie <sup>198</sup>, malgré l'absence de LT. De plus dans notre étude, il existe une corrélation statistiquement significative entre le pourcentage de LT au sein des glandes salivaires et le focus score histologique. Ainsi, plus le nombre de LT est important et moins la sialadénite est importante, évoquant également le rôle moins pathologique que pressenti des LT dans ce modèle. Ceci va dans le même sens que le travail de Christodoulou et al. retrouvant une diminution des LT au profit des LB plus le focus score est élevé <sup>63</sup>. Deuxièmement, cette inefficacité pourrait être liée au calendrier thérapeutique utilisé. En effet, un traitement plus tardif (souris NOD femelles âgées de 13 à 21 semaines) a permis d'améliorer le flux salivaire des souris traitées. On peut ainsi spéculer qu'un traitement anti-CD3 pourrait être plus efficace à un stade où l'infiltrat lymphocytaire T est déjà constitué. Enfin, la troisième explication possible réside dans la dose de l'Ac anti-CD3 utilisée. En effet, dans notre étude, une dose de 50 µg/jour en intra-veineux (I.V) pendant cinq jours consécutifs a été utilisée. Une telle dose n'engendre qu'une diminution transitoire du nombre de LT et plutôt de la population de LT effecteurs CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> tout en augmentant la population de LT auxiliaires CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ou de Trég CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> <sup>171</sup>. Des doses plus importantes pourraient être évaluées ultérieurement, de manière à induire une diminution importante du nombre de LT, notamment effecteurs, et évaluer son impact sur le SJp. En effet, certains de nos résultats suggèrent l'intérêt thérapeutique des Ac anti-CD3. Le traitement par Ac anti-CD3 semble améliorer le flux salivaire 2 et 4 semaines après le début du traitement par rapport au contrôle isotypique mais cet effet disparaît par la suite. Les résultats de cytométrie en flux montrent l'induction d'une population de Trég FoxP3<sup>+</sup>. Le rôle des Trég est encore mal connu dans le SJp. Il a été montré que cette population était augmentée dans le sang périphérique des patients par rapport à des témoins sains <sup>201</sup>, ce qui a été confirmé par une autre équipe <sup>202</sup>, alors que des résultats discordants ont aussi été

rapportés <sup>203</sup>. Une sous-population de Trég, les lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD25<sub>low</sub>GITR<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> est augmentée dans le sang des patients présentant une faible activité de la maladie <sup>204</sup>.

### 1.2.1. Perspectives

En raison des résultats encourageants sur le flux salivaire des souris NOD femelles traitées plus tardivement par Ac anti-CD3, l'efficacité de ce dernier mérite d'être évaluée en traitant des souris NOD femelles plus âgées (autour de la 15<sup>ème</sup> semaine) par Ac anti-CD3. Un groupe traité selon les mêmes modalités que dans notre étude mais à une dose d'Ac anti-CD3 plus importante pourrait également être évalué. Obtenir une efficacité, au moins partielle, de l'Ac anti-CD3 sur le SJP de la souris NOD permettra également de mieux évaluer une éventuelle synergie entre les deux traitements : Ac anti-BAFF et Ac anti-CD3 (utilisant le schéma d'administration le plus efficace).

### 1.3. Intérêt d'un ciblage conjoint des LB et des LT dans le SJP

Le ciblage conjoint du LB et du LT pourrait passer par plusieurs stratégies thérapeutiques :

- Le ciblage de molécules de co-stimulation T et B (voie CD40-CD40L)

Parmi les traitements les plus prometteurs ciblant des molécules de co-stimulation, on peut citer l'iscalimab et le dazolibep. L'iscalimab est un anti-CD40 s'étant montré efficace dans un essai de phase II multicentrique<sup>133</sup>. Le dazodalibep, un antagoniste du CD40L a montré des résultats intéressants dans une étude de phase II à la fois sur les symptômes systémiques évalués par le ESSDAI <sup>134</sup> ainsi que sur les signes subjectifs (ESSPRI) <sup>135</sup>. Ces deux traitements vont être évalués dans des études de phase III tout prochainement.

- Le ciblage conjoint soit simultanément soit séquentiel par un traitement anti-LT et un anti-LB ou inversement.

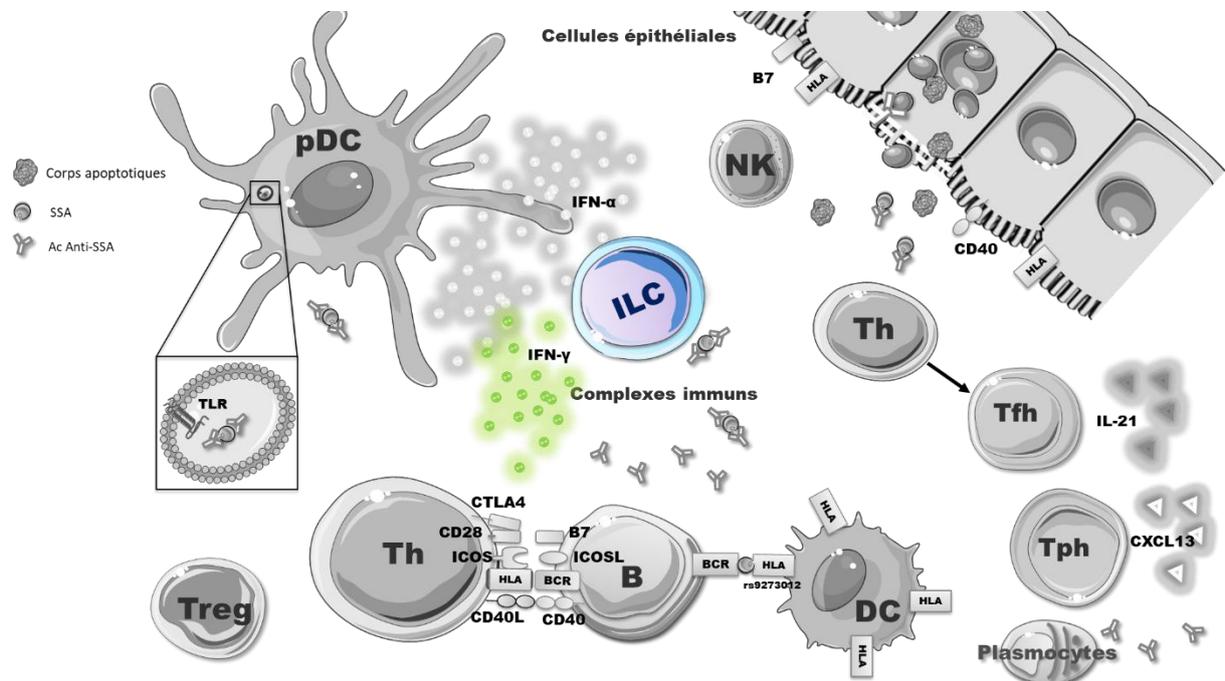
Il a été démontré chez les souris diabétiques NOD, qu'un traitement combiné par Ac anti-CD20 (ciblant les LB) + anti-CD3 (ciblant les LT) était plus efficace que chaque traitement pris

séparément <sup>170</sup> (taux de rémission de 66,6% pour la thérapie combinée versus 30 pour l'anti-CD20, 24,1% pour l'anti-CD3 et 0% pour les isotypes des 2 Ac). D'autre part, cette même étude avait permis de mettre en évidence une augmentation des Trég FoxP3<sup>+</sup>, aux fonctions suppressives, après traitement combiné.

- Le ciblage conjoint des LB et LT par des anticorps bispécifiques.

Des Ac bispécifiques et des « nanobodies » de différents types ont été évalués comme moyen de recruter des LT cytotoxiques pour tuer les LB tumoraux dans le cadre d'hémopathies malignes B. A l'instar des cellules CAR-T anti-CD19 actuellement repositionnées dans les maladies auto-immunes, des Ac bispécifiques sont en cours de développement. L'epcoritamab, est un Ac bispécifique anti-CD20/CD3, injecté par voie sous-cutanée, actuellement étudié pour le traitement du lymphome non hodgkinien à cellules B. Deux autres Ac bispécifiques CD20/CD3 sont en cours d'évaluation : le mosunetuzumab et le glofitamab.

## 2. Implication des ILC dans la physiopathologie du SjJ



*Figure 17. Les ILC, de nouveaux acteurs dans la physiopathologie du SjJ*

### 2.1. ILC circulantes

L'analyse des ILC dans le sang n'a pas mis en évidence de variation significative de la fréquence des ILC totales et des sous-types d'ILC parmi les cellules CD45<sup>+</sup> chez les patients atteints de SjJ par rapport aux témoins sains. Ces résultats sont similaires à ceux observés par Blokland et al., qui ne trouvaient pas de variations des taux sanguins d'ILC chez les patients atteints de SjJ<sup>177</sup>. Notre étude n'a pas non plus révélé de corrélation significative entre l'activité du SjJ, évaluée par le ClinESSDAI, et les proportions sanguines d'ILC et des sous-types d'ILC. Cependant, elle a mis en évidence une tendance non significative à une augmentation des fréquences des ILC totales parmi les cellules CD45<sup>+</sup>, liée à une augmentation non significative de chaque sous-type d'ILC, chez les patients ayant une maladie active par rapport aux patients n'ayant pas de maladie active, et d'autant plus que l'activité était importante.

Les quantités d'ILC sanguines pourraient être majorées secondairement à la stimulation des ILC par l'IL-7<sup>173,175,205</sup>, qui intervient dans leur développement et leur survie<sup>86,87</sup>.

De plus, l'étude de la corrélation entre la proportion d'ILC1 parmi les cellules CD45<sup>+</sup> et le clinESSDAI était proche du niveau de significativité ( $p=0.06$ ). Ces résultats sont renforcés par les observations de Blokland et al., qui décrivaient une corrélation entre les taux sanguins d'ILC1 et le score ESSDAI<sup>177</sup>. La contribution des ILC1 dans le SJp pourrait être en lien avec leur capacité à produire de l'IFN- $\gamma$ , qui joue un rôle pathogène important dans les GSA au cours du SJp<sup>206</sup>, et qu'il serait intéressant d'étudier plus en détails.

Au total, notre étude n'a pas montré de variation significative des ILC sanguines dans le SGS. Cependant, plusieurs limites de notre étude méritent d'être mentionnées. Notre cohorte ne comprenait qu'un faible effectif de patients présentant une maladie fortement active (1 seul patient avec un clinESSDAI>13). Ainsi, il serait intéressant d'étudier plus de patients avec une activité importante, afin de vérifier si la tendance à l'augmentation des ILC et à la corrélation du taux d'ILC avec le clinESSDAI se confirme. Par ailleurs, l'interprétation des résultats des proportions d'ILC parmi les cellules CD45<sup>+</sup> a pu être limitée par la fréquence de la lymphopénie chez les patients atteints de SJp, qui induit une diminution de la quantité de cellules CD45<sup>+</sup>, et donc une fluctuation du rapport ILC/CD45<sup>+</sup> indépendamment d'une modification du nombre d'ILC. D'autre part, les proportions des sous-types d'ILC dans le sang étaient très variables d'un sujet à l'autre, chez les patients atteints de SJp, comme chez les témoins sains. Ces variabilités importantes pourraient être expliquées par des facteurs environnementaux (infections<sup>207,208</sup>, allergies<sup>209</sup>), mais également les traitements immunosuppresseurs<sup>98</sup>. Aucun de nos patients inclus n'était traité par bélimumab, rituximab ou un immunosuppresseur puissant. Deux patients sur 21 et 4 sur 16, respectivement pour l'analyse du sang périphérique et pour l'analyse au sein des GSA, étaient traités par corticoïdes, 7/21 et 2/16 par hydroxychloroquine et 1/21 et 1/16 par méthotrexate.

## 2.2.Mise en évidence des ILC et leurs sous-types au sein des glandes salivaires

Les ILC résident principalement et effectuent leurs fonctions au sein des tissus et les taux sanguins d'ILC ne sont pas représentatifs des taux tissulaires, car les ILC ont des capacités importantes de plasticité selon le milieu <sup>85</sup>.

Afin d'étudier les ILC dans les tissus, leur détection dans les GSA a dû être mise au point. Une tentative de recherche des ILC par cytométrie en flux après digestion des GSA n'a pas été optimale, car très peu de cellules ont pu être analysées par cette méthode. En effet, les GSA sont des organes de petite taille, et les cellules immunitaires ne correspondent qu'à une faible proportion des cellules présentes dans ces glandes. De plus, la procédure de digestion a pu altérer les marqueurs de surfaces des cellules, limitant leur détection. Par ailleurs, les GSA ne sont pas toujours le siège d'un infiltrat immunitaire dans le SJP, et la confirmation de l'atteinte tissulaire se fait par analyse histologique. Ainsi, il était impossible de savoir si les GSA analysées en cytométrie en flux étaient infiltrées ou saines au moment du prélèvement. Pour toutes ces raisons, la recherche des ILC dans les GSA a été réalisée par une approche histologique en immunofluorescence, qui présente en plus l'avantage de pouvoir localiser les ILC au sein des GSA. Cette technique validée et reproductible de détection des ILC dans les tissus par immunofluorescence pourra être réutilisée pour d'autres études.

Même si quelques études avaient déjà décrit certains types d'ILC dans les GSA <sup>210,211</sup>, aucune étude publiée n'avait analysé l'ensemble des sous-types d'ILC dans les GSA humaines. Notre travail est donc le premier à analyser les ILC et leurs sous-types au sein des GSA. Les ILC au sein des GSA sont en grande majorité des ILC3, avec quelques ILC1 principalement intra-épithéliales et de rares ILC2. Cette répartition des sous-types d'ILC est comparable à celle retrouvée dans d'autres tissus épithéliaux, comme le colon <sup>179</sup>.

L'analyse des quantités d'ILC dans les GSA a permis de montrer que le nombre d'ILC et d'ILC3 rapportés à la surface tissulaire était significativement plus important dans les zones pathologiques (infiltrats cellulaires) que dans les zones saines des GSA. Ciccia et al. avaient décrit une augmentation d'un type cellulaire sécréteur d'IL-22, décrit initialement comme des cellules NK mais semblant être des ILC3 NKp44<sup>+</sup> d'après la dernière classification des ILC<sup>85</sup>, dans les GSA des patients atteints de SJP, ce qui renforce la validité de nos résultats. Le nombre de ces cellules était corrélé au taux d'IL-22 et à l'activité de la maladie<sup>210</sup>. Après avoir décrit la corrélation entre l'axe IL-25/IL-17RB/ « TNF receptor-associated factor 6 » (TRAF6) et le taux d'infiltration cellulaire des GSA, Guggino et al. ont recherché les cellules pouvant être impliquées dans cet axe et ont mis en évidence une augmentation d'ILC2 inflammatoires IL-17RB<sup>+</sup> Thy-1<sup>+</sup>, qui semblent être des précurseurs d'ILC2 ou d'ILC3, dans le sang et les GSA chez les patients atteints de SJP, par rapport aux témoins sains<sup>211</sup>. N'ayant pas trouvé de variation des taux d'ILC2 dans les GSA, ils émettaient l'hypothèse de leur différenciation en ILC3, sous-type majoritaire dans notre étude.

Les ILC étaient localisées principalement en périphérie des infiltrats, comme cela a déjà été décrit pour les cellules NK<sup>212</sup>, qui font partie de la même famille de cellules.

Le nombre d'ILC au sein des infiltrats n'était pas corrélé à des marqueurs de sévérité ou d'activité du SJP, comme le focus score ou le ClinESSDAI. Cette étude était toutefois limitée par le faible effectif de patients ayant une pathologie avec activité importante (1 seul patient avec ClinESSDAI>13). Une autre limite de ce travail était l'absence de comparaison avec un tissu contrôle. La comparaison des quantités d'ILC/ $\mu\text{m}^2$  de tissus de l'ensemble de sections de GSA entre des patients atteints de SJP et des témoins sicca serait donc très intéressante. Pour nous aider à cela, un outil informatique capable de détecter et de quantifier les ILC sur des images de microscopie, permettant de s'affranchir de la subjectivité et du risque d'erreur de l'œil humain serait utile. D'autre part, il serait intéressant de comparer les quantités d'ILC par

infiltrats cellulaires de GSA de patients atteints de SJp et de patients contrôles atteints par exemple de sarcoïdose, une autre maladie inflammatoire caractérisée par des infiltrats lymphocytaires mais avec une physiopathologie très différente.

## 2.1.Participation des ILC à l'initiation de la maladie

Nous avons montré que les ILC3 étaient augmentées en périphérie des infiltrats pathologiques au cours du SJp, par rapport au tissu salivaire dépourvu d'infiltrat lymphocytaire. Nous n'avons cependant pas trouvé de variation des taux sanguins d'ILC chez les patients atteints de SJp par rapport aux témoins sains, ou de corrélation entre les quantités sanguines ou glandulaires d'ILC et des critères d'activité ou de sévérité de la maladie. Les ILC3 étaient préférentiellement localisées à la périphérie des infiltrats et étaient plus abondantes dans les petits infiltrats, chez les patients avec un diagnostic récent de SJp.

D'après ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que les ILC3 sont impliquées dans la physiopathologie du SJp à l'initiation de la maladie en favorisant la formation d'infiltrats pathologiques dans les GSA, mais qu'elles n'interviennent pas ou peu dans l'activité de la maladie au cours de son évolution. Dans certains modèles animaux de la maladie, les premières cellules à infiltrer les glandes salivaires appartiennent à l'immunité innée <sup>213</sup>. Etant les premières cellules effectrices de l'immunité car déjà présentes et fonctionnelles dans les tissus, les ILC pourraient ainsi être les premières cellules activées lors de l'agression initiale de la GSA, et les premières cellules présentes dans les infiltrats cellulaires. Elles pourraient ensuite favoriser le recrutement et l'activation locale des lymphocytes, avant d'être refoulées à la périphérie des infiltrats. Cette hypothèse est renforcée par le fait que le nombre d'ILC était plus important dans les infiltrats de petite taille. De plus, d'autres études ont décrit l'implication des ILC3 dans la formation de structures lymphoïdes <sup>85</sup>, et dans le développement d'infiltrats lymphocytaires pathologiques des méninges dans la sclérose en plaque <sup>214,215</sup>.

Ainsi, nous pourrions soulever l'hypothèse de participation des ILC à la physiopathologie du SJP suivante. Après l'agression d'une glande salivaire, à l'origine de l'apoptose de cellules épithéliales des acini et de libération des auto-antigènes SSA/SSB, initiant le SJP, les ILC pourraient être rapidement activées localement par les cytokines (comme l'IL-7) et les cellules épithéliales avec lesquelles elles interagissent. En particulier, les cellules épithéliales produisent de l'interleukine (IL)-7 en grande quantité<sup>216,175</sup>, qui pourrait stimuler la survie et les fonctions des ILC, en se fixant au CD127, exprimé par les ILC.

La quantité d'ILC2 inflammatoires (iILC2), exprimant le récepteur B à l'IL-17 (IL-17RB) et Thy-1<sup>217</sup>, est augmentée dans les glandes salivaires de patients atteints de SJP<sup>211</sup>. Sous l'influence de l'IL-25, qui se fixe à l'IL-17RB, les iILC2 sont activées et peuvent se différencier en ILC2 ou ILC3, qui ont la particularité de pouvoir agir comme cellules présentatrices d'antigènes via le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II)<sup>211</sup>.

Les ILC3 représentent le sous-type d'ILC largement majoritaires dans les GSA, et sont localisées principalement en périphérie des infiltrats cellulaires pathologiques. Les ILC3 NKp44<sup>+</sup> sont augmentées dans les GSA de patients atteints de SGS, et leur quantité est corrélée au taux d'IL-22, qu'elles sécrètent. Elles pourraient participer à la formation des infiltrats cellulaires pathologiques, puis à leur organisation en centres germinatifs ectopiques<sup>218</sup>, en étant les premières cellules dans l'infiltrat, puis en recrutant et activant les LB et LT, avant d'être refoulées en périphérie des infiltrats. Elles pourraient également intervenir dans la physiopathologie du SJP en sécrétant de l'IL-17, de l'IL-22 et de l'IFN- $\gamma$ . L'IFN- $\gamma$  induit l'expression de BAFF, qui favorise la survie des LB. De plus, comme toutes les ILC, elles peuvent interagir avec les autres cellules immunitaires tissulaires, comme les macrophages ou encore les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC).

Les ILC1 des glandes salivaires sont principalement des ILC1 intra-épithéliales (ieILC1). Elles pourraient intervenir dans la physiopathologie du SJP en sécrétant précocement de l'IFN- $\gamma$ .

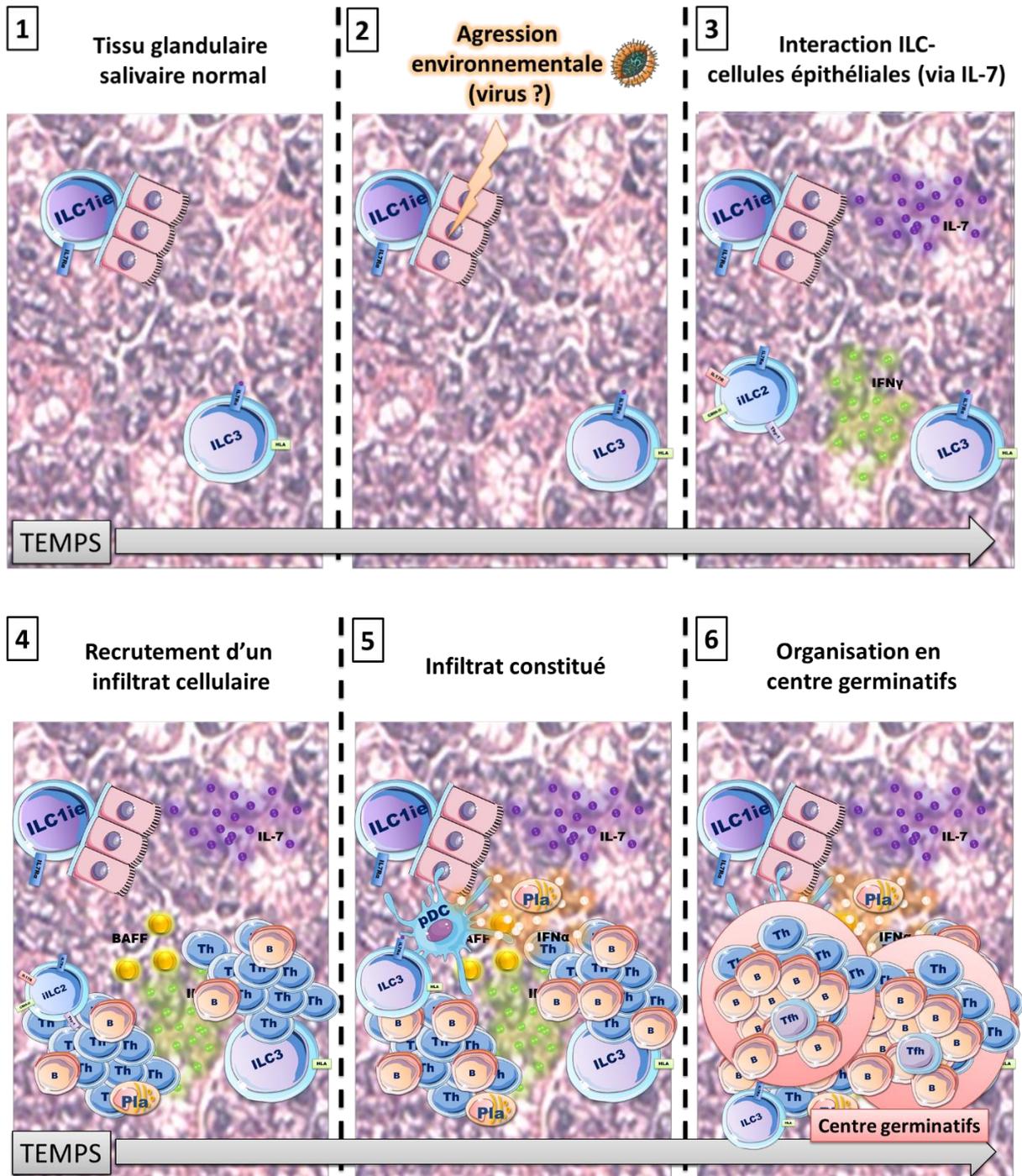


Figure 18. Schéma dynamique de l'implication des ILC dans l'infiltrat glandulaire

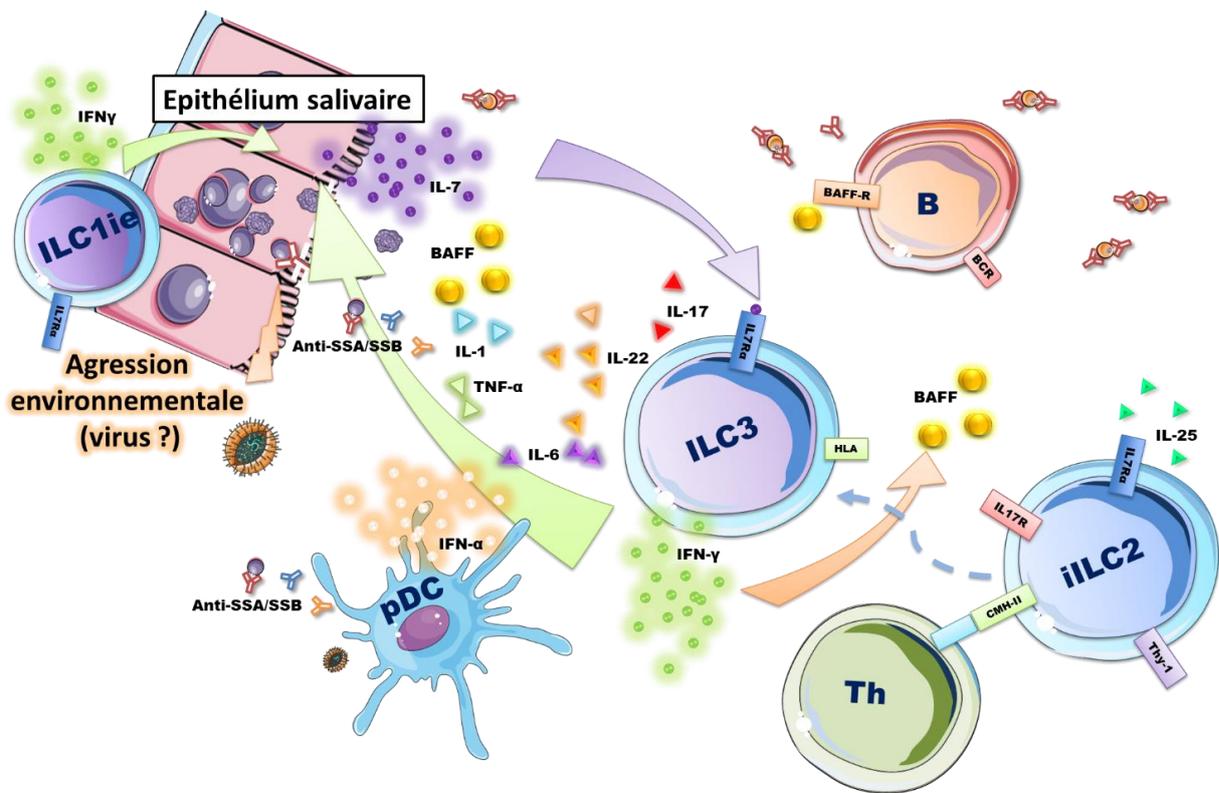
Néanmoins, cette étude était uniquement descriptive et ne s'est intéressée qu'aux quantités, sanguines et glandulaires, d'ILC, mais pas à leur phénotype. Il est possible que les taux d'ILC ne varient pas, mais que les proportions d'ILC activées parmi les ILC ou les proportions d'ILC présentant un profil de sécrétion cytokinique particulier (comme les iILC2, les nILC2 [natural ILC2] ou les ILC3 NCR<sup>+</sup> ou NCR<sup>-</sup> [natural cytotoxicity-triggering receptor] augmentent en fonction de l'activité ou de la sévérité du SjP. Il pourrait donc être intéressant d'étudier la fonctionnalité des ILC dans le SjP notamment leur implication dans la sécrétion de cytokines d'intérêt, comme l'IFN- $\gamma$ , l'IL-22 ou l'IL-17.

## 2.2. Implication des ILC dans l'axe IL-7 – IL-7R (CD127) – Interféron ?

L'une des cytokines majeures impliquées dans la régulation des LT est l'IL-7. Cette cytokine joue un rôle homéostatique de facteur de croissance en fournissant un signal de survie aux LT naïfs et mémoires qui expriment le récepteur de l'IL-7 (IL-7R ou CD127)<sup>219</sup>. Chez les patients atteints de SjP, Bikker et al. ont mis en évidence une augmentation de l'IL-7 et de CD127 dans les glandes salivaires accessoires en comparaison à des témoins sicca<sup>176</sup>. 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 IL-7/IL-7R était impliqué dans la formation de centres germinatifs ectopiques dans les glandes salivaires<sup>218</sup>.

Plus récemment, Rivière et al. ont confirmé que les taux d'IL-7 sont augmentés dans le sérum de patients SjP par rapport aux sujets contrôles. Les taux sériques d'IL-7 sont également associés à des marqueurs d'activation lymphocytaire B (présence d'anticorps anti-SSA, de FR et de chaînes légères libres) et des paramètres d'activité de la maladie (lymphopénie, baisse du complément C4). Plusieurs études ont montré que les taux d'IL-7 étaient augmentés dans le sang et dans les GSA de patients atteints de SGS et corrélés avec le focus score, marqueur de sévérité de l'infiltrat cellulaire<sup>174,175</sup>. L'ensemble de ces résultats suggère la possible existence

d'une boucle IL-7 – IFN- $\gamma$  à l'initiation du SJP passant au moins partiellement par les ILC. Ainsi, les ILC résidentes des glandes salivaires pourraient se voir stimulées via une agression épithéliale liée à un virus ou à un facteur environnemental. Ceci conduirait à l'augmentation de l'IL-7 notamment via l'induction d'une sécrétion d'IL-7 dans le micro-environnement tissulaire par les cellules épithéliales salivaires. Cette IL-7 produite localement pourrait alors à son tour participer à l'activation des ILC, notamment à la production d'IFN- $\gamma$  dans les glandes salivaires, ainsi qu'à l'activation lymphocytaire T.



**Figure 19. Hypothèse du rôle des ILC dans la physiopathologie du SJP**

Une perspective intéressante pourrait être d'analyser cette relation entre l'axe IL-7/CD127 et les ILC dans le SJP. En effet, l'IL-7, en se fixant sur le CD127 exprimé par les ILC, intervient dans leur survie et leurs fonctions<sup>86,87</sup>. En outre, l'administration d'un anticorps bloquant le CD127 dans un modèle murin de SJP a été associée à une diminution de cytokines salivaires, à une régression des infiltrats cellulaires des GSA, et à une amélioration de la sécrétion salivaire

<sup>220</sup>. Il serait donc intéressant d'étudier la corrélation entre le taux d'IL-7, le nombre et le phénotype activé des ILC, et l'importance des infiltrats pathologiques des GSA. Des expériences sur modèle murin permettraient de pouvoir traiter les souris par un Ac anti-IL-7 ou anti-IL-7R (CD127) et de suivre la cinétique des proportions d'ILC circulantes ou salivaires. Un tel traitement étant actuellement à l'étude chez l'Homme, il serait intéressant d'étudier l'impact sur les ILC circulantes et salivaires des patients traités en comparaison au groupe contrôle traité par placebo. On pourrait également étudier l'interaction IL-7/ILC grâce à des co-cultures de cellules épithéliales salivaires issues de BGSA en présence d'une lignée d'ILC afin d'étudier les interactions entre ces deux types cellulaires, notamment en matière de sécrétion cytokinique. La lignée MNK-3 est utilisée par certains auteurs comme une lignée d'ILC3 <sup>221,222</sup>. Enfin, des immuno-organoïdes pourraient être utilisées pour étudier ces interactions. Il s'agit de structures 3D formées à partir de cellules souches ou issues de BGSA, selon différents protocoles, au sein desquels les différents types cellulaires spécifiques s'organisent et constituent des versions miniatures de glandes salivaires. Ces organoïdes, en cours de développement par différentes équipes dont la nôtre, pourraient permettre une étude plus précise des mécanismes physiopathologiques du SJp. L'ajout d'ILC au sein de ces immuno-organoïdes puis leur stimulation par l'IL-7 permettrait ainsi d'en étudier le rôle.

Dans d'autres maladies faisant également intervenir une muqueuse, les MICI, l'analyse transcriptomique de 500 patients atteints de MICI comparée à 100 contrôles a montré que la voie de l'IL-7R était surreprésentée dans le tissu colique des patients les plus sévères. L'IL-7 peut être produite par les cellules épithéliales intestinales après notamment une stimulation par IFN- $\gamma$  <sup>216</sup>. Dans un modèle de souris humanisées, le blocage du récepteur de l'IL-7 a réduit le recrutement de LT vers l'intestin et l'inflammation colique *in vivo* <sup>223</sup>. L'impact sur les ILC n'a pas été étudié.

### 2.3. Les ILCs comme cible thérapeutique potentielle ?

Compte tenu de l'hétérogénéité clinique des patients atteints de SjP, l'identification de cibles thérapeutiques spécifiques au sein des glandes salivaires pourrait permettre d'épargner les processus immunologiques physiologiques ayant lieu en périphérie.

Plusieurs méthodes thérapeutiques pourraient être envisagées pour cibler les ILC. Une inhibition du développement et des fonctions de l'ensemble des ILC pourrait être réalisée en ciblant le CD127 ou l'IL-7. L'administration d'un Ac bloquant la chaîne  $\alpha$  de l'IL-7R à des souris NOD a permis d'améliorer la sécheresse et l'infiltration lymphocytaire des glandes salivaires en entraînant une diminution de la production d'IFN- $\gamma$  au sein des glandes salivaires<sup>220</sup>. Des traitements par Ac monoclonaux dirigés contre le récepteur à l'IL-7 ont déjà été évalués chez l'Homme. Chez des sujets sains, ce traitement a été bien toléré et a bloqué la signalisation du récepteur de l'IL-7 en atteignant une occupation complète de la cible. Plusieurs autres inhibiteurs de l'IL-7/IL-7R ont également été testés. RN168, un anticorps anti-IL-7R- $\alpha$  a été évalué chez des patients atteints de diabète de type 1. Trente-sept sujets atteints ont été traités. Il a été observé une diminution significative des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> effecteurs mémoire, ainsi que des CD4<sup>+</sup> naïfs, mais peu d'effets sur les LT CD8<sup>+</sup> naïfs. Les ratios Trég/CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> effecteurs et mémoire ont augmenté après traitement. La majorité des effets indésirables apparus au cours du traitement étaient sans gravité et non imputables au traitement. Cet essai montre qu'à des doses de 1 à 3 mg/kg, le RN168 a inhibé sélectivement la survie et l'activité des LT mémoires tout en préservant les LT naïfs et les Trég. Ces effets immunologiques pourraient donc servir à éliminer les LT pathologiques dans les maladies auto-immunes<sup>224</sup>. Plus récemment, un nouvel anti-IL-7R- $\alpha$ , l'OSE-127/ S95011 a été administré à 63 sujets en bonne santé, répartis aléatoirement en neuf groupes : six groupes à dose unique croissante avec administration intraveineuse (0,002 à 10 mg/kg), un groupe avec traitement sous-cutané à dose unique (1 mg/kg) et deux groupes avec double injection intraveineuse (6 ou 10 mg/kg)<sup>225</sup>. Il

s'agit à l'inverse des précédents Ac anti-IL-7R d'un anticorps non-cytotoxique. L'administration d'OSE-127/ S95011 a inhibé la consommation d'IL-7, avec une diminution de la signature génique de la voie de l'IL-7 dans les cellules sanguines périphériques. Le traitement a été bien toléré, sans syndrome de libération de cytokines et sans altération significative des numérations lymphocytaires sanguines ou des sous-populations. Ces résultats soutiennent la poursuite du développement clinique d'OSE-127/S95011, et deux essais cliniques de phase II sont en cours dans la maladie de Crohn (étude CoTikiS : NCT04882007) et dans le SJP (NCT04605978).

L'activation des ILC3 pourrait également être diminuée en bloquant certaines cytokines activatrices, par exemple avec des Ac anti-IL-1 ou anti-IL-23, déjà utilisés dans d'autres maladies rhumatismales. Des équipes ont également démontré l'intérêt de certains traitements pour moduler les fonctions des ILC, comme le thalidomide ou les inhibiteurs de JAK, ou pour inhiber la migration des ILC dans les tissus d'intérêt, comme le vedolizumab, qui bloque l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ , dans la maladie de Crohn <sup>98</sup>. Toutefois, aucun de ces traitements ne ciblerait spécifiquement les ILC.

### 3. Identification de nouvelles cibles thérapeutiques grâce à l'analyse transcriptomique de repositionnement thérapeutique

Notre travail exploratoire fournit la première approche transcriptomique de repositionnement thérapeutique dans le SJp et confirme l'intérêt de cibler les IFN tout en identifiant les inhibiteurs d'histones déacétylases (HDAC) et des PI3K comme de possibles candidats médicaments. La pertinence des candidats potentiels identifiés dans notre travail mérite d'être évaluée *ex vivo*, dans des cellules mononucléées sanguines, des cellules épithéliales cultivées ou des explants de glandes salivaires, ainsi que dans des modèles précliniques.

#### 3.1.Limites d'une telle étude

Malgré ses avantages, l'utilisation de l'analyse transcriptomique pour le repositionnement thérapeutique présente également certaines limites.

La variabilité naturelle de l'expression génique entre les individus peut rendre difficile l'identification de signatures moléculaires spécifiques à la maladie, en particulier dans le contexte hétérogène du SJp. Les échantillons provenant de patients atteints de SJp peuvent également présenter une grande variabilité en termes de durée, de sévérité de la maladie, de symptômes et de traitements. Cette hétérogénéité peut rendre difficile l'identification de signatures robustes. L'expression génique ne sera pas non plus la même entre les différents types cellulaires, ni entre les cellules sanguines et les tissulaires. L'origine des données transcriptomiques et la description du phénotype de la population étudiée sont donc très importantes. Néanmoins, l'inclusion d'études multicentriques, sur un grand nombre de patients et de témoins d'origines géographiques variées permet de lisser cette hétérogénéité et renforce la validité de nos résultats.

Les données transcriptomiques peuvent provenir de différentes plateformes expérimentales et de différentes sources, ce qui peut entraîner une variation dans les gènes différenciellement

exprimés. Nous avons donc fait le choix d'intégrer dans nos analyses uniquement les études pour lesquelles nous disposions à la fois de témoins et de contrôle.

Les résultats de ce type d'analyse transcriptomique nécessitent toujours une validation expérimentale ultérieure pour confirmer les découvertes et démontrer la pertinence fonctionnelle des cibles identifiées. Car, même si l'analyse transcriptomique permet d'identifier des gènes différentiellement exprimés, la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents nécessite des études complémentaires. L'identification de traitements candidats peut également questionner, car on ne sait pas toujours par quel mécanisme tel traitement influe sur la signature transcriptomique de la maladie.

Enfin, même si des progrès importants ont été réalisés ces dernières années nous permettant désormais ce type d'études, ce type d'analyses est toujours limité par les outils à notre disposition. Bien que CLUE (Connectivity Map Linked User Environment) soit une ressource précieuse pour l'analyse des données d'expression génique et la découverte de liens fonctionnels entre médicaments, maladies et gènes, elle présente également certaines limites à considérer :

- Les données de CLUE.io sont basées sur des expériences *in vitro* utilisant des lignées cellulaires. Cela peut ne pas refléter pleinement les réponses complexes et variées qui se produisent dans un environnement tissulaire *in vivo*.
- Les résultats obtenus à partir de modèles cellulaires *in vitro* peuvent varier en fonction de la lignée cellulaire utilisée, de l'état cellulaire et des conditions expérimentales. Il est donc important de prendre en compte la spécificité des modèles cellulaires lors de l'interprétation des résultats.
- CLUE fournit des informations sur les profils d'expression génique, mais ne fournit pas de données cliniques, telles que la réponse aux traitements.

- Les analyses dépendent de la qualité des données d'expression génique et des informations associées. Des erreurs ou des biais dans les données peuvent avoir un impact important sur les résultats.
- CLUE contient des données sur un vaste ensemble de médicaments et de composés chimiques. Cependant, il est important de noter que la base de données de CLUE n'inclut pas nécessairement toutes les substances médicamenteuses existantes. La disponibilité des données dépend de plusieurs facteurs, notamment des expériences *in vitro* qui ont été menées pour générer les profils d'expression génique des médicaments. La base de données CLUE est continuellement mise à jour et élargie pour inclure de nouvelles données et de nouveaux médicaments. Cependant, il peut y avoir des limitations en termes de variété de médicaments couverts et de la disponibilité de données pour certains composés plus récents ou moins étudiés. Ainsi, les principaux traitements innovants actuellement en cours d'évaluation dans le SJp ne sont pas contenus dans cette base de données (rituximab, bélimumab, ianalumab, iscalimab, dazolibep, ...)

Malgré ces limites, l'analyse transcriptomique reste une approche intéressante pour la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques et la compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans le SJp. Cela ouvre la voie à de futures expérimentations et permet de confirmer les voies physiopathologiques les plus intéressantes, comme par exemple les voies de l'IFN dans le SJp.

### 3.2.Ciblage des interférons dans le SJp

Cibler l'IFN paraît être une piste thérapeutique prometteuse dans diverses maladies auto-immunes, y compris le SJp<sup>226</sup>. Il peut être ciblé pharmacologiquement de plusieurs façons. Une première approche consiste à cibler les cellules qui produisent des IFN de type I, telles que les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), ou les récepteurs impliqués dans la reconnaissance des acides nucléiques viraux conduisant à la production d'IFN, tels que les récepteurs Toll-Like (TLR)-7 et 9. D'autres stratégies incluent l'utilisation d'anticorps monoclonaux contre l'IFN, ses

récepteurs (IFNARs), ou la vaccination thérapeutique avec l'IFN couplé à des protéines immunogènes (utilisées pour stimuler la production d'anticorps polyclonaux qui neutralisent l'IFN- $\alpha$ ). Enfin, la voie de signalisation en aval des IFN peut également être une cible intéressante. Bien que ces stratégies aient été principalement évaluées dans le lupus en raison de son association avec une signature IFN importante, elles ont également été étudiées dans d'autres maladies auto-immunes telles que les myopathies inflammatoires ou le SJp.

Bien que de nombreux essais cliniques ciblant la voie de l'IFN de type I aient été réalisés, peu de résultats positifs ont été publiés.

L'hydroxychloroquine est fréquemment utilisée pour traiter le SJp. Son mode d'action passe au moins en partie par l'inhibition de l'activation de TLR7 et TLR9 à l'origine de la synthèse d'IFN. Toutefois, comme déjà évoqué, son utilisation n'a pas permis d'améliorer les symptômes des patients dans un essai en double aveugle <sup>30</sup>.

L'ustekinumab, un anticorps monoclonal dirigé contre la sous-unité p40 commune à l'IL12 et à l'IL23, est en cours d'évaluation dans le SJp. L'IL12 et l'IL23 sont respectivement responsables de l'activation des voies Th1 et Th17, capables de sécréter l'IFN de type II. Dans cette étude de phase I-II, jusqu'à 15 sujets recevront une dose de charge de 6 mg/kg d'ustekinumab IV suivie de 90 mg d'ustekinumab par voie sous-cutanée aux semaines 4, 12 et 20. Les sujets seront suivis pendant 24 semaines.

MEDI7734, un anticorps anti-ILT7, cible les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) et a été testé dans une phase I. Malgré la fin de l'étude depuis plusieurs années, aucun résultat n'a été communiqué <sup>227</sup>.

Les IFN de type I émettant leur signal intra-cellulaire via l'IFNAR par l'intermédiaire des JAK <sup>145</sup>. Les inhibiteurs de JAK (JAKi), tels que le tofacitinib, le baricitinib, l'upadacitinib ou le filogtinib sont déjà utilisés dans le traitement de la PR. Il existe également des arguments expérimentaux en faveur de l'utilisation des JAKi dans le SJp. En effet, le ruxolitinib, inhibiteur

de JAK1/2, est 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) *in vitro* <sup>228</sup>. Le filgotinib (inhibiteur de JAK1) <sup>146</sup>, quant à lui, diminue la transcription de gènes IFN-induits et de BAFF dans des cellules épithéliales salivaires humaines <sup>229</sup>. La même équipe a également montré dans le modèle murin NOD/ShiLtJ, une augmentation du flux salivaire et une diminution de l'infiltrat lymphocytaire des glandes salivaires après traitement <sup>229</sup>. Le filgotinib a été testé dans un essai de phase II sans efficacité <sup>149</sup>.

Enfin, l'inhibition spécifique des voies IFN type I en utilisant, par exemple, le sifalimumab (Ac monoclonal anti-IFN $\alpha$ ) ou l'anifrolumab pourrait être une option intéressante. L'anifrolumab, un anticorps monoclonal anti-IFNAR, a été approuvé en tant que traitement pour les adultes atteints de lupus modéré à sévère. Actuellement, une étude de phase IIa, preuve de concept est en cours de recrutement pour évaluer l'anifrolumab dans le SJP <sup>230</sup>.

### 3.3. Les inhibiteurs d'histones désacétylases

Les histones désacétylases (HDAC) sont une famille de 18 membres qui participent à la régulation épigénétique de l'expression génique. En plus des histones, certaines HDAC désacétylent également des facteurs de transcription et des protéines cytoplasmiques spécifiques. Les HDAC sont impliquées dans de multiples processus, notamment la prolifération, la migration, la différenciation, la réponse inflammatoire, les infections et la tumorigenèse <sup>231</sup>.

Ainsi, les inhibiteurs de HDAC ont attiré beaucoup d'attention ces dernières années en raison de leur potentiel à influencer l'expression génique et à moduler divers processus cellulaires. Ils ont été étudiés dans différentes maladies, y compris certains types de cancers, où l'objectif était de réactiver la transcription de gènes suppresseurs de tumeurs, normalement réprimés.

Les inhibiteurs d'histone déacétylase (HDACi) sont classés en plusieurs sous-groupes en fonction de leur structure chimique et de leur mécanisme d'action. Voici quelques-uns des sous-groupes les plus courants d'HDACi <sup>232</sup> :

- HDACi à large spectre ou pan-HDACi : Ces inhibiteurs ciblent plusieurs classes d'enzymes HDAC. Ils peuvent avoir des effets plus variés sur la régulation génique et sont souvent utilisés à des fins de recherche pour étudier les mécanismes de désacétylation des histones.
- HDACi sélectifs de classe I : Ces inhibiteurs ciblent principalement les enzymes de classe I (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8). Les enzymes de classe I sont généralement localisées dans le noyau et ont des rôles importants dans la régulation de l'expression génique.
- HDACi sélectifs de classe II : Ces inhibiteurs ciblent principalement les enzymes de classe II (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9, HDAC10). Les enzymes de classe II ont des rôles variés, y compris dans la régulation de la structure du cytosquelette et de la réponse au stress.
- HDAC de classe III (SIRT 1-7). Les HDAC de classe III, structurellement distinctes, qui contiennent la famille des sirtuines, constituent une classe unique de désacétylases dépendantes du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>) dont l'activité désacétylase est contrôlée par le rapport [NAD<sup>+</sup>]/[NADH] cellulaire, qui sont impliquées dans diverses fonctions biologiques telles que le métabolisme, la division cellulaire et le vieillissement.
- HDACi sélectifs de classe IV : Ce sous-groupe cible spécifiquement HDAC11, l'unique membre de la classe IV. Les fonctions exactes de HDAC11 ne sont pas encore complètement élucidées.

Chacun de ces sous-groupes a des caractéristiques uniques en termes de mécanisme d'action, de spécificité enzymatique et de potentiel thérapeutique. Ils sont étudiés pour leurs applications potentielles dans le traitement du cancer, des maladies neurodégénératives et d'autres affections liées à la régulation de l'expression génique. Ils ont également montré des effets dans des domaines autres que le cancer, tels que les maladies neurodégénératives et les maladies inflammatoires.

Quelques HDACi sont déjà commercialisés dans diverses indications. Le vorinostat est un pan-HDACi non sélectif, indiqué dans le traitement du lymphome cutané à cellules T réfractaire ou en rechute, tout comme le romidepsine (Istodax). Le belinostat (Beleodaq) est un HDACi non sélectif, indiqué dans le traitement du lymphome périphérique à grandes cellules B en rechute. Le panobinostat (Farydak) est un HDACi non sélectif, utilisé en combinaison avec le bortézomib et la dexaméthasone pour le traitement du myélome multiple récurrent ou réfractaire. Quant au tucidinostat (ou chidamide), c'est un HDACi sélectif de classe I, approuvé pour le traitement du lymphome à cellules T en Chine.

Les HDACi sélectifs et donc l'inactivation ciblée des isoformes d'HDAC pourraient également permettre de contourner les effets indésirables des pan-HDACi actuellement approuvés en clinique <sup>233</sup>. En effet, les inhibiteurs d'histone déacétylase (HDACi) peuvent provoquer une gamme d'effets indésirables, certains étant communs à la classe des HDACi tels qu'une toxicité hématologique, des troubles gastro-intestinaux, une asthénie, une élévation des enzymes hépatiques, des troubles électrolytiques, des troubles du rythme cardiaque, une hypertension, des éruptions cutanées ou bien des maux de tête, étourdissements et troubles cognitifs.

Ainsi, ces toxicités dose-dépendant de la première génération d'HDACi, qui ciblent généralement plusieurs HDAC, ont limité leur application en clinique. Au cours de la dernière décennie, des efforts croissants ont été consacrés à la conception d'inhibiteurs d'HDAC spécifiques d'une classe, d'une isoforme ou d'un domaine, ainsi qu'à l'élaboration de stratégies

d'administration ciblée de médicaments spécifiques à un type cellulaire. L'inhibition sélective des modulateurs épigénétiques pourrait déboucher sur des stratégies thérapeutiques plus efficaces et plus sûres. Conformément à cette idée, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'efficacité d'HDACi plus sélectifs avec moins d'effets indésirables que les pan-inhibiteurs<sup>234</sup>.

Un grand nombre de modèles murins, de diverses maladies auto-immunes et auto-inflammatoires, soit déficientes en HDAC soit traitées par HDACi ont été évalués. Dans la plupart des cas, le traitement par HDACi entraîne une atténuation de la sévérité de la maladie clinique<sup>233</sup>. Une réduction de la gravité de la maladie a également été observée chez des souris dépourvues de certains membres d'HDAC. Cela indique un potentiel thérapeutique élevé des HDACi sélectifs pour les maladies à médiation immunitaire.

Les HDACi pourraient jouer un rôle dans la modulation de la fonction des Trég. Étant donné que le rôle suppressif des Trég a été principalement attribué à l'expression et à la fonction du facteur de transcription Foxp3, la modulation de son expression et de sa liaison aux régions promotrices des gènes cibles par la modification de l'état d'acétylation des histones de la chromatine pourrait s'avérer bénéfique<sup>235</sup>. Les HDACi pourraient être utilisés pour réduire ou augmenter le nombre et la fonction des Trég. La transcription de Foxp3 est inhibée par HDAC10<sup>236</sup>. Il a été démontré que la suppression d'HDAC10 chez la souris renforce la stabilité de Foxp3 et augmente l'activation de son promoteur<sup>236</sup>. En outre, SIRT2<sup>237</sup> et SIRT4<sup>238</sup> inhibent l'expression de la protéine Foxp3 par un mécanisme encore inconnu. Le blocage de ces trois HDAC pourrait augmenter l'expression de Foxp3 et renforcer la différenciation des Trég.

L'entinostat (MS-275)<sup>239</sup> et la tacedinaline (CI994)<sup>240</sup> sont les premiers inhibiteurs sélectifs puissants des HDAC de classe I ayant montré un potentiel thérapeutique en améliorant l'inflammation dans des modèles précliniques de diverses maladies inflammatoires et auto-immunes, dont la PR<sup>241</sup>. Cela a été confirmé par l'efficacité de l'entinostat dans un modèle

d'arthrite induite par un anticorps de collagène, où il a fortement réduit l'infiltration de cellules inflammatoires et amélioré le score de la maladie <sup>242</sup>, avec efficacité clinique supérieure à celle du vorinostat (pan-HDACi) dans ce modèle <sup>242</sup>. Ces résultats précliniques positifs ont été accompagnés d'une réduction marquée de plusieurs cytokines pro-inflammatoires et de l'infiltration de leucocytes <sup>242</sup>. Contrairement aux pan-HDACi, l'inhibiteur d'HDAC3 MI192 a été capable d'inhiber la réponse inflammatoire dans les PBMC de patients atteints de PR, mais pas dans ceux de témoins sains <sup>243</sup>. L'inhibition de HDAC6 s'est révélée efficace dans de nombreux modèles précliniques de maladies inflammatoires et auto-immunes, notamment les MICI, la PR, le lupus ou la sclérose en plaques <sup>234</sup>. Il a été rapporté que l'inhibition de HDAC6 contrôlait le recrutement des cellules immunitaires et modulait la différenciation des LT et LB <sup>244-246</sup>. Bien qu'il n'y ait pas encore d'études cliniques chez les patients atteints de maladies inflammatoires et auto-immunes, de la même manière que les HDACi de classe I chez les patients atteints de cancer, les inhibiteurs de HDAC6 présentent un profil de sécurité amélioré par rapport aux pan-HDACi <sup>247</sup>.

Notre étude a mis en évidence un score de similarité important pour le droxinostat, un HDACi, avec une sélectivité pour les HDAC 3, 6 et 8 <sup>248</sup>. Il a récemment été évalué en tant que nouvelle thérapie potentielle pour certains cancers <sup>249</sup>.

Pour faire le parallèle avec la confirmation de l'intérêt de cibler l'IFN dans le SJp, il est admis que les HDAC de classe I (HDAC1, 2, 3 et 8) sont importantes pour la signalisation IFN dépendante de STAT-1 et/ou STAT-2 <sup>250</sup>, et l'activité HDAC s'est avérée être un élément essentiel du système de coactivation pour la régulation des gènes induits par l'IFN et la réponse immunitaire innée induite par l'IFN <sup>251</sup>. L'action des histones désacétylases est nécessaire à l'activation transcriptionnelle complète des gènes stimulés par l'IFN $\alpha$  <sup>252</sup>. Enfin, dans le modèle de souris NOD, il a été démontré que les HDACi suppriment efficacement l'inflammation des îlots pancréatiques et l'apoptose des cellules  $\beta$ , limitant ainsi la progression du diabète de type

I<sup>253</sup>. Une étude innovante a permis de démontrer l'efficacité du vorinostat formulé pour être libéré de manière contrôlée dans la glande lacrymale après une injection locale pour lutter contre la sécheresse chez les souris<sup>254</sup>.

Ces données indiquent qu'il serait intéressant d'évaluer le droxinostat ou d'autres HDACi sélectifs dans le SJP dans les années à venir.

### 3.4. Les inhibiteurs de PI3K

Notre étude de repositionnement thérapeutique a mis en évidence parmi les nouveaux candidats médicaments, deux inhibiteurs de PI3K (kU-0060648 et NVP-BEZ235). La PI3K est une kinase régulatrice dont il existe 4 sous unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ). Les phosphoinositol 3-kinases (PI3K)  $\gamma$  et  $\delta$  sont des enzymes clés dans les cellules hématopoïétiques. Depuis leur découverte et l'identification de leurs rôles, elles sont considérées comme des cibles de grande valeur pour le traitement des maladies inflammatoires et autoimmunes<sup>255</sup>. Les enzymes PI3K jouent un rôle crucial dans la régulation de la croissance, de la survie et de la prolifération cellulaire, ainsi que dans la régulation du métabolisme et de la réponse immunitaire. Les voies PI3K sont impliquées dans la réponse inflammatoire et la régulation du système immunitaire. Les inhibiteurs de PI3K peuvent être utilisés pour moduler l'activité immunitaire excessive observée dans les maladies auto-immunes et inflammatoires<sup>255</sup>. Il est important de noter que les inhibiteurs de PI3K ne sont pas spécifiques à une seule enzyme PI3K. Par conséquent, le développement d'inhibiteurs sélectifs est important pour minimiser les effets secondaires non souhaités.

Plusieurs inhibiteurs de PI3K ont été évalués pour leur potentielle efficacité dans le traitement de maladies auto-immunes. Le duvelisib, inhibiteur de PI3K- $\delta$  et  $\gamma$ , approuvé en oncologie, a été évalué dans la PR sans succès<sup>256</sup>. 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<sup>152</sup>. Comme évoqué dans l'introduction, ce traitement a par la suite été évalué en terme d'efficacité chez les patients

atteints de SJp dans une étude de phase II <sup>257</sup>. Vingt-sept patients ont été randomisés (sélétalisib n = 13, placebo n = 14) ; 20 ont terminé l'étude. Des problèmes de recrutement ont conduit à l'arrêt prématuré de l'étude avec une perte de puissance statistique (36 % contre 80 % prévus). Néanmoins, une tendance à l'amélioration de l'ESSDAI et de l'ESSPRI [différence par rapport au placebo : -2,59 (IC 95 % : -7,30, 2,11 ; P=0,266) et -1,55 (IC 95 % : -3,39, 0,28), respectivement] a été observée à la semaine 12. Aucun changement significatif n'a été observé au niveau de l'évaluation objective du syndrome sec. Les concentrations sériques d'IgM et d'IgG ont diminué dans le groupe traité par le sélétalisib par rapport au placebo. Le seletalisib a démontré son efficacité dans la réduction de la taille et de l'organisation des foyers lymphocytaires des glandes salivaires <sup>257</sup>.

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 <sup>154</sup>. Enfin, récemment, le pascalisib a réduit la sécrétion d'autoanticorps et amélioré l'évolution de la maladie dans des modèles précliniques de lupus et de SJp <sup>258</sup>

### 3.5.Perspectives

Les récents progrès dans l'identification de ces nouvelles cibles potentielles dans les maladies auto-immunes associées à l'accumulation de données pré-cliniques, à partir de modèles murins et parfois de phases précoces chez l'Homme, permettent d'être optimiste sur la découverte de traitements efficaces dans le SJp. Notre étude de repositionnement thérapeutique ouvre la perspective d'évaluer l'intérêt de l'utilisation des HDACi et PI3Ki au cours du SJp.

# CONCLUSION

L'objectif de cette thèse était d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans le SjP. En effet, malgré les avancées dans nos connaissances physiopathologiques de cette maladie et thérapeutiques dans le domaine des traitements ciblés, les malades atteints de SjP se trouvent toujours dépourvus de traitements efficaces pour juguler les manifestations systémiques et les symptômes de la maladie. Par nos 3 approches variées mais complémentaires, nous avons été en mesure de confirmer l'intérêt de cibler BAFF, une molécule cruciale pour la survie et l'activation des LB, combiné à une déplétion B. Cette efficacité passe, au moins en partie, par l'accumulation de Trég. Le ciblage conjoint ou indépendant des LT pourrait également s'avérer intéressant pour contrôler les processus auto-immuns une fois installés.

Notre étude de repositionnement thérapeutique, basée sur une analyse transcriptomique, a permis de confirmer l'intérêt de cibler les IFN dans le SjP. Elle a également identifié de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques, les HDAC et les PI3K.

Enfin, notre recherche de nouveaux acteurs potentiellement impliqués dans la physiopathologie du SjP nous a mené vers les ILC. A l'instar des Trég, cette population cellulaire rare et longtemps méconnue pourrait jouer un rôle pathogène important. Nos résultats suggèrent que les ILC3 pourraient être à l'origine de la mise en place des infiltrats lymphocytaires au sein des glandes salivaires. Ces ILC synthétisent l'IFN- $\gamma$  lui-même à l'origine de la synthèse BAFF.

Ainsi, ce travail complète notre connaissance de la physiopathologie du SjP et ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques.

# Références bibliographiques

1. Tzioufas AG, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Pathogenesis of Sjögren's syndrome: What we know and what we should learn. *Journal of Autoimmunity*. 2012 Aug;39(1–2):4–8.
2. Mariette X, Criswell LA. Primary Sjögren's Syndrome. *N Engl J Med*. 2018 Mar 8;378(10):931–9.
3. Liang Y, Yang Z, Qin B, Zhong R. Primary Sjogren's syndrome and malignancy risk: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis*. 2014 Jun;73(6):1151–6.
4. Felten R, Meyer A, Gottenberg JE. Non-primary Sjogren's Syndrome: Secondary or associated? *Joint Bone Spine*. 2023 Mar;90(2):105502.
5. 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 Jan;76(1):9–16.
6. Carvajal Alegria G, Doare E, Devauchelle-Pensec V, Jousse-Joulin S. Biopsies des glandes salivaires en rhumatologie. *Revue du Rhumatisme Monographies*. 2020 Jun 1;87(3):184–8.
7. Chisholm DM, Mason DK. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's disease. *J Clin Pathol*. 1968 Sep;21(5):656–60.
8. Greenspan JS, Daniels TE, Talal N, Sylvester RA. The histopathology of Sjögren's syndrome in labial salivary gland biopsies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1974 Feb;37(2):217–29.
9. Nocturne G, Pontarini E, Bombardieri M, Mariette X. Lymphomas complicating primary Sjögren's syndrome: from autoimmunity to lymphoma. *Rheumatology (Oxford)*. 2019 Mar 5;60(8):3513–21.
10. Ekström Smedby K, Vajdic CM, Falster M, Engels EA, Martínez-Maza O, Turner J, et al. Autoimmune disorders and risk of non-Hodgkin lymphoma subtypes: a pooled analysis within the InterLymph Consortium. *Blood*. 2008 Apr 15;111(8):4029–38.
11. Chiu YH, Chung CH, Lin KT, Lin CS, Chen JH, Chen HC, et al. Predictable biomarkers of developing lymphoma in patients with Sjögren syndrome: a nationwide population-based cohort study. *Oncotarget*. 2017 Jul 25;8(30):50098–108.
12. Weng MY, Huang YT, Liu MF, Lu TH. Incidence of cancer in a nationwide population cohort of 7852 patients with primary Sjogren's syndrome in Taiwan. *Ann Rheum Dis*. 2012 Apr;71(4):524–7.
13. Theander E, Henriksson G, Ljungberg O, Mandl T, Manthorpe R, Jacobsson LTH. Lymphoma and other malignancies in primary Sjögren's syndrome: a cohort study on cancer incidence and lymphoma predictors. *Ann Rheum Dis*. 2006 Jun;65(6):796–803.

14. Johnsen SJ, Brun JG, Gøransson LG, Småstuen MC, Johannesen TB, Haldorsen K, et al. Risk of non-Hodgkin's lymphoma in primary Sjögren's syndrome: a population-based study. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2013 May;65(5):816–21.
15. Giannouli S, Voulgarelis M. Predicting progression to lymphoma in Sjögren's syndrome patients. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014 Apr;10(4):501–12.
16. Nocturne G, Mariette X. Sjögren Syndrome-associated lymphomas: an update on pathogenesis and management. *Br J Haematol*. 2015 Feb;168(3):317–27.
17. Nocturne G, Virone A, Ng WF, 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*. 2016 Apr;68(4):977–85.
18. 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. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2013 Feb;42(4):368–76.
19. Theander E, Vasaitis L, Baecklund E, Nordmark G, Warfvinge G, Liedholm R, et al. Lymphoid organisation in labial salivary gland biopsies is a possible predictor for the development of malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2011 Aug;70(8):1363–8.
20. Haacke EA, van der Vegt B, Vissink A, Spijkervet FKL, Bootsma H, Kroese FGM. Germinal centres in diagnostic labial gland biopsies of patients with primary Sjögren's syndrome are not predictive for parotid MALT lymphoma development. *Ann Rheum Dis*. 2017 Oct;76(10):1781–4.
21. Fox RI. The importance of minor salivary gland biopsy in prediction of lymphoma in Sjögren's syndrome: should we be obtaining more information about prognosis from minor salivary gland samples? *Ann Rheum Dis*. 2011 Aug;70(8):1351–3.
22. Stott DI, Hiepe F, Hummel M, Steinhauser G, Berek C. Antigen-driven clonal proliferation of B cells within the target tissue of an autoimmune disease. The salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *J Clin Invest*. 1998 Sep 1;102(5):938–46.
23. Song H, Tong D, Cha Z, Bai J. C-X-C chemokine receptor type 5 gene polymorphisms are associated with non-Hodgkin lymphoma. *Mol Biol Rep*. 2012 Sep;39(9):8629–35.
24. Nocturne G, Boudaoud S, Miceli-Richard C, Viengchareun S, Lazure T, Nititham J, et al. Germline and somatic genetic variations of TNFAIP3 in lymphoma complicating primary Sjögren's syndrome. *Blood*. 2013 Dec 12;122(25):4068–76.
25. Nocturne G, Tarn J, Boudaoud S, Locke J, Miceli-Richard C, Hachulla E, et al. Germline variation of TNFAIP3 in primary Sjögren's syndrome-associated lymphoma. *Ann Rheum Dis*. 2016 Apr;75(4):780–3.
26. Nocturne G, Mariette X. B cells in the pathogenesis of primary Sjögren syndrome. *Nat Rev Rheumatol*. 2018 Mar;14(3):133–45.

27. Gottenberg JE, 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.
28. Quartuccio L, Salvin S, Fabris M, Maset M, Pontarini E, Isola M, et al. BLYS upregulation in Sjögren's syndrome associated with lymphoproliferative disorders, higher ESSDAI score and B-cell clonal expansion in the salivary glands. *Rheumatology*. 2013 Feb 1;52(2):276–81.
29. Duret PM, Schleiss C, Kawka L, Meyer N, Ye T, Saraux A, et al. Bruton's tyrosine kinase (BTK) gene overexpression is associated with risk of lymphoma in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol*. 2023 Apr 28;
30. Gottenberg JE, Ravaud P, Puéchal X, Le Guern V, Sibilia J, Goeb V, et al. Effects of Hydroxychloroquine on Symptomatic Improvement in Primary Sjögren Syndrome: The JOQUER Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2014 Jul 16;312(3):249.
31. Nocturne G, Mariette X. Advances in understanding the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol*. 2013 Sep;9(9):544–56.
32. Gao Y, Chen Y, Zhang Z, Yu X, Zheng J. Recent Advances in Mouse Models of Sjögren's Syndrome. *Front Immunol*. 2020 Jun 30;11:1158.
33. Yamano S, Atkinson JC, Baum BJ, Fox PC. Salivary gland cytokine expression in NOD and normal BALB/c mice. *Clin Immunol*. 1999 Sep;92(3):265–75.
34. Hu Y, Nakagawa Y, Purushotham KR, Humphreys-Beher MG. Functional changes in salivary glands of autoimmune disease-prone NOD mice. *Am J Physiol*. 1992 Oct;263(4 Pt 1):E607-614.
35. Skarstein K, Wahren M, Zaura E, Hattori M, Jonsson R. Characterization of T cell receptor repertoire and anti-Ro/SSA autoantibodies in relation to sialadenitis of NOD mice. *Autoimmunity*. 1995;22(1):9–16.
36. Humphreys-Beher MG, Hu Y, Nakagawa Y, Wang PL, Purushotham KR. Utilization of the non-obese diabetic (NOD) mouse as an animal model for the study of secondary Sjögren's syndrome. *Adv Exp Med Biol*. 1994;350:631–6.
37. Bagavant H, Michrowska A, Deshmukh US. The NZB/W F1 mouse model for Sjögren's syndrome: A historical perspective and lessons learned. *Autoimmun Rev*. 2020 Dec;19(12):102686.
38. Haneji N, Hamano H, Yanagi K, Hayashi Y. A new animal model for primary Sjögren's syndrome in NFS/sld mutant mice. *J Immunol*. 1994 Sep 15;153(6):2769–77.
39. Saegusa J, Kubota H. Sialadenitis in IQI/Jic mice: a new animal model of Sjögren's syndrome. *J Vet Med Sci*. 1997 Oct;59(10):897–903.

40. Tsubata R, Tsubata T, Hiai H, Shinkura R, Matsumura R, Sumida T, et al. Autoimmune disease of exocrine organs in immunodeficient alymphoplasia mice: a spontaneous model for Sjögren's syndrome. *Eur J Immunol*. 1996 Nov;26(11):2742–8.
41. Shim GJ, Warner M, Kim HJ, Andersson S, Liu L, Ekman J, et al. Aromatase-deficient mice spontaneously develop a lymphoproliferative autoimmune disease resembling Sjogren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug 24;101(34):12628–33.
42. Leimola-Virtanen R, Salo T, Toikkanen S, Pulkkinen J, Syrjänen S. Expression of estrogen receptor (ER) in oral mucosa and salivary glands. *Maturitas*. 2000 Aug 31;36(2):131–7.
43. Kassi E, Moutsatsou P, Sekeris CE, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Oestrogen receptors in cultured epithelial cells from salivary glands of Sjogren's syndrome patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2003 Sep;42(9):1120–2.
44. Ishimaru N, Arakaki R, Yoshida S, Yamada A, Noji S, Hayashi Y. Expression of the retinoblastoma protein RbAp48 in exocrine glands leads to Sjögren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy. *J Exp Med*. 2008 Nov 24;205(12):2915–27.
45. Li H, Dai M, Zhuang Y. A T cell intrinsic role of Id3 in a mouse model for primary Sjogren's syndrome. *Immunity*. 2004 Oct;21(4):551–60.
46. Oak JS, Deane JA, Kharas MG, Luo J, Lane TE, Cantley LC, et al. Sjögren's syndrome-like disease in mice with T cells lacking class 1A phosphoinositide-3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Nov 7;103(45):16882–7.
47. Turpie B, Yoshimura T, Gulati A, Rios JD, Dartt DA, Masli S. Sjögren's syndrome-like ocular surface disease in thrombospondin-1 deficient mice. *Am J Pathol*. 2009 Sep;175(3):1136–47.
48. Apostolou E, Moustardas P, Iwawaki T, Tzioufas AG, Spyrou G. Ablation of the Chaperone Protein ERdj5 Results in a Sjögren's Syndrome-Like Phenotype in Mice, Consistent With an Upregulated Unfolded Protein Response in Human Patients. *Front Immunol*. 2019;10:506.
49. Qian Y, Giltiay N, Xiao J, Wang Y, Tian J, Han S, et al. Deficiency of Act1, a critical modulator of B cell function, leads to development of Sjögren's syndrome. *Eur J Immunol*. 2008 Aug;38(8):2219–28.
50. Groom J, Kalled SL, Cutler AH, Olson C, Woodcock SA, Schneider P, et al. Association of BAFF/BlyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. *J Clin Invest*. 2002 Jan;109(1):59–68.
51. Green JE, Hinrichs SH, Vogel J, Jay G. Exocrinopathy resembling Sjögren's syndrome in HTLV-1 tax transgenic mice. *Nature*. 1989 Sep 7;341(6237):72–4.
52. Okuma A, Hoshino K, Ohba T, Fukushi S, Aiba S, Akira S, et al. Enhanced apoptosis by disruption of the STAT3-IκB-ζ signaling pathway in epithelial cells induces Sjögren's syndrome-like autoimmune disease. *Immunity*. 2013 Mar 21;38(3):450–60.

53. 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.* 1998 Dec;41(12):2175–84.
54. Bombardieri M, Barone F, Lucchesi D, Nayar S, van den Berg WB, Proctor G, et al. Inducible tertiary lymphoid structures, autoimmunity, and exocrine dysfunction in a novel model of salivary gland inflammation in C57BL/6 mice. *J Immunol.* 2012 Oct 1;189(7):3767–76.
55. White SC, Casarett GW. Induction of experimental autoallergic sialadenitis. *J Immunol.* 1974 Jan;112(1):178–85.
56. Nishimori I, Bratanova T, Toshkov I, Caffrey T, Mogaki M, Shibata Y, et al. Induction of experimental autoimmune sialoadenitis by immunization of PL/J mice with carbonic anhydrase II. *J Immunol.* 1995 May 1;154(9):4865–73.
57. Iizuka M, Wakamatsu E, Tsuboi H, Nakamura Y, Hayashi T, Matsui M, et al. Pathogenic role of immune response to M3 muscarinic acetylcholine receptor in Sjögren's syndrome-like sialoadenitis. *J Autoimmun.* 2010 Dec;35(4):383–9.
58. Scofield RH, Asfa S, Obeso D, Jonsson R, Kurien BT. Immunization with short peptides from the 60-kDa Ro antigen recapitulates the serological and pathological findings as well as the salivary gland dysfunction of Sjogren's syndrome. *J Immunol.* 2005 Dec 15;175(12):8409–14.
59. Fox RI, Maruyama T. Pathogenesis and treatment of Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 1997 Sep;9(5):393–9.
60. Hayashi T. Dysfunction of lacrimal and salivary glands in Sjögren's syndrome: nonimmunologic injury in preinflammatory phase and mouse model. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:407031.
61. Dawson LJ, Fox PC, Smith PM. Sjogrens syndrome--the non-apoptotic model of glandular hypofunction. *Rheumatology (Oxford).* 2006 Jul;45(7):792–8.
62. Kroese FGM, Haacke EA, Bombardieri M. The role of salivary gland histopathology in primary Sjögren's syndrome: promises and pitfalls. *Clin Exp Rheumatol.* 2018;36 Suppl 112(3):222–33.
63. Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome. *J Autoimmun.* 2010 Jun;34(4):400–7.
64. Jonsson R, Gordon TP, Konttinen YT. Recent advances in understanding molecular mechanisms in the pathogenesis and antibody profile of Sjögren's syndrome. *Curr Rheumatol Rep.* 2003 Aug;5(4):311–6.
65. Manoussakis MN, Kapsogeorgou EK. The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *J Autoimmun.* 2010 Nov;35(3):219–24.
66. Ittah M, Miceli-Richard C, Gottenberg JE, 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.* 2008 Apr;38(4):1058–64.

67. 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.
68. Sandhya P, Kurien BT, Danda D, Scofield RH. Update on Pathogenesis of Sjögren's Syndrome. *Curr Rheumatol Rev*. 2017;13(1):5–22.
69. 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*. 2001 Nov;44(11):2633–41.
70. McArthur C, Wang Y, Veno P, Zhang J, Fiorella R. Intracellular trafficking and surface expression of SS-A (Ro), SS-B (La), poly(ADP-ribose) polymerase and alpha-fodrin autoantigens during apoptosis in human salivary gland cells induced by tumour necrosis factor-alpha. *Arch Oral Biol*. 2002 Jun;47(6):443–8.
71. Hjelmervik TOR, Petersen K, Jonassen I, Jonsson R, Bolstad AI. Gene expression profiling of minor salivary glands clearly distinguishes primary Sjögren's syndrome patients from healthy control subjects. *Arthritis Rheum*. 2005 May;52(5):1534–44.
72. Emamian ES, Leon JM, Lessard CJ, Grandits M, Baechler EC, Gaffney PM, et al. Peripheral blood gene expression profiling in Sjögren's syndrome. *Genes Immun*. 2009 Jun;10(4):285–96.
73. Ohlsson M, Jonsson R, Brokstad KA. Subcellular redistribution and surface exposure of the Ro52, Ro60 and La48 autoantigens during apoptosis in human ductal epithelial cells: a possible mechanism in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol*. 2002 Nov;56(5):456–69.
74. Bolstad AI, Jonsson R. The role of apoptosis in Sjögren's syndrome. *Ann Med Interne (Paris)*. 1998 Feb;149(1):25–9.
75. Jonsson R, Vogelsang P, Volchenkov R, Espinosa A, Wahren-Herlenius M, Appel S. The complexity of Sjögren's syndrome: novel aspects on pathogenesis. *Immunol Lett*. 2011 Dec 30;141(1):1–9.
76. Båve U, Nordmark G, Lövgren T, Rönnelid J, Cajander S, Eloranta ML, et al. Activation of the type I interferon system in primary Sjögren's syndrome: a possible etiopathogenic mechanism. *Arthritis Rheum*. 2005 Apr;52(4):1185–95.
77. Trutschel D, Bost P, Mariette X, Bondet V, Llibre A, Posseme C, et al. Variability of Primary Sjögren's Syndrome Is Driven by Interferon- $\alpha$  and Interferon- $\alpha$  Blood Levels Are Associated With the Class II HLA-DQ Locus. *Arthritis Rheumatol*. 2022 Dec;74(12):1991–2002.
78. Rusakiewicz S, Nocturne G, Lazure T, Semeraro M, Flament C, Caillat-Zucman S, et al. NCR3/NKp30 contributes to pathogenesis in primary Sjögren's syndrome. *Sci Transl Med*. 2013 Jul 24;5(195):195ra96.

79. Davies R, Hammenfors D, Bergum B, Jakobsen K, Solheim M, Vogelsang P, et al. Patients with Primary Sjögren's Syndrome Have Alterations in Absolute Quantities of Specific Peripheral Leucocyte Populations. *Scand J Immunol*. 2017 Dec;86(6):491–502.
80. Ming B, Wu T, Cai S, Hu P, Tang J, Zheng F, et al. The Increased Ratio of Blood CD56bright NK to CD56dim NK Is a Distinguishing Feature of Primary Sjögren's Syndrome. *J Immunol Res*. 2020;2020:7523914.
81. Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*. 2018 Aug 23;174(5):1054–66.
82. Krabbendam L, Nagasawa M, Spits H, Bal SM. Isolation of Human Innate Lymphoid Cells. *Current Protocols in Immunology*. 2018 Aug 1;122(1):e55.
83. Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature*. 2015 Jan 15;517(7534):293–301.
84. Domingues RG, Hepworth MR. Immunoregulatory Sensory Circuits in Group 3 Innate Lymphoid Cell (ILC3) Function and Tissue Homeostasis. *Front Immunol*. 2020;11:116.
85. Mjösberg J, Spits H. Human innate lymphoid cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016 Nov 1;138(5):1265–76.
86. Sheikh A, Abraham N. Interleukin-7 Receptor Alpha in Innate Lymphoid Cells: More Than a Marker. *Front Immunol*. 2019;10:2897.
87. Vonarbourg C, Diefenbach A. Multifaceted roles of interleukin-7 signaling for the development and function of innate lymphoid cells. *Semin Immunol*. 2012 Jun;24(3):165–74.
88. Gasteiger G, Fan X, Dikiy S, Lee SY, Rudensky AY. Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs. *Science*. 2015 Nov 20;350(6263):981–5.
89. Colonna M. Innate Lymphoid Cells: Diversity, Plasticity, and Unique Functions in Immunity. *Immunity*. 2018 Jun 19;48(6):1104–17.
90. Nagasawa M, Spits H, Ros XR. Innate Lymphoid Cells (ILCs): Cytokine Hubs Regulating Immunity and Tissue Homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018 Dec 3;10(12):a030304.
91. Branzk N, Gronke K, Diefenbach A. Innate lymphoid cells, mediators of tissue homeostasis, adaptation and disease tolerance. *Immunol Rev*. 2018 Nov;286(1):86–101.
92. Sonnenberg GF, Hepworth MR. Functional interactions between innate lymphoid cells and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2019 Oct;19(10):599–613.
93. Warner K, Ohashi PS. ILC regulation of T cell responses in inflammatory diseases and cancer. *Semin Immunol*. 2019 Feb;41:101284.

94. Mohammadi H, Sharafkandi N, Hemmatzadeh M, Azizi G, Karimi M, Jadidi-Niaragh F, et al. The role of innate lymphoid cells in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018 Jun;233(6):4512–29.
95. Ebbo M, Crinier A, Vély F, Vivier E. Innate lymphoid cells: major players in inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*. 2017 Nov;17(11):665–78.
96. Wenink MH, Leijten EFA, Cupedo T, Radstake TRDJ. Review: Innate Lymphoid Cells: Sparking Inflammatory Rheumatic Disease? *Arthritis Rheumatol*. 2017 May;69(5):885–97.
97. Fang W, Zhang Y, Chen Z. Innate lymphoid cells in inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2020 Feb 12;22(1):25.
98. Cobb LM, Verneris MR. Therapeutic manipulation of innate lymphoid cells. *JCI Insight*. 2021 Mar 22;6(6):e146006, 146006.
99. Fox RI, Kang HI, Ando D, Abrams J, Pisa E. Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjögren's syndrome. *J Immunol*. 1994 Jun 1;152(11):5532–9.
100. Bumba D, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Cytokine mRNA expression in the labial salivary gland tissues from patients with primary Sjögren's syndrome. *Br J Rheumatol*. 1995 Apr;34(4):326–33.
101. Karabiyik A, Peck AB, Nguyen CQ. The important role of T cells and receptor expression in Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol*. 2013 Aug;78(2):157–66.
102. Chen W, Yang F, Xu G, Ma J, Lin J. Follicular helper T cells and follicular regulatory T cells in the immunopathology of primary Sjögren's syndrome. *J Leukoc Biol*. 2021 Feb;109(2):437–47.
103. Vinuesa CG, Linterman MA, Yu D, MacLennan ICM. Follicular Helper T Cells. *Annu Rev Immunol*. 2016 May 20;34:335–68.
104. Wacleche VS, Wang R, Rao DA. Identification of T Peripheral Helper (Tph) Cells. *Methods Mol Biol*. 2022;2380:59–76.
105. Marks KE, Rao DA. T peripheral helper cells in autoimmune diseases. *Immunol Rev*. 2022 May;307(1):191–202.
106. Pitzalis C, Jones GW, Bombardieri M, Jones SA. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2014 Jul;14(7):447–62.
107. Chen W, Yang F, Lin J. Tph Cells Expanded in Primary Sjögren's Syndrome. *Front Med (Lausanne)*. 2022 Jun 9;9:900349.
108. Bombardieri M, Lewis M, Pitzalis C. Ectopic lymphoid neogenesis in rheumatic autoimmune diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2017 Mar;13(3):141–54.
109. Pontarini E, Lucchesi D, Bombardieri M. Current views on the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol*. 2018 Mar;30(2):215–21.

110. Salomonsson S, Jonsson MV, Skarstein K, Brokstad KA, Hjelmström P, Wahren-Herlenius M, et al. Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2003 Nov;48(11):3187–201.
111. F B, M B, A M, Mc B, Pr M, Sj C, et al. Association of CXCL13 and CCL21 expression with the progressive organization of lymphoid-like structures in Sjögren's syndrome. *Arthritis and rheumatism* [Internet]. 2005 Jun [cited 2023 Jul 7];52(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15934082/>
112. Gong YZ, 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.
113. Felten R, Scher F, Sibilia J, Gottenberg JE, Arnaud L. The pipeline of targeted therapies under clinical development for primary Sjögren's syndrome: A systematic review of trials. *Autoimmun Rev.* 2019 Jun;18(6):576–82.
114. Dass S, Bowman SJ, Vital EM, Ikeda K, Pease CT, Hamburger J, et al. Reduction of fatigue in Sjögren syndrome with rituximab: results of a randomised, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Ann Rheum Dis.* 2008 Nov;67(11):1541–4.
115. Meijer JM, Meiners PM, Vissink A, Spijkervet FKL, Abdulhad W, Kamminga N, et al. Effectiveness of rituximab treatment in primary Sjögren's syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2010 Apr;62(4):960–8.
116. Devauchelle-Pensec V, Morvan J, Rat AC, Jousse-Joulin S, Pennec Y, Pers JO, et al. Effects of rituximab therapy on quality of life in patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* 2011 Feb;29(1):6–12.
117. Bowman SJ, Everett CC, O'Dwyer JL, Emery P, Pitzalis C, Ng WF, et al. Randomized Controlled Trial of Rituximab and Cost-Effectiveness Analysis in Treating Fatigue and Oral Dryness in Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2017 Jul;69(7):1440–50.
118. Gottenberg JE, Cinquetti G, Larroche C, Combe B, Hachulla E, Meyer O, et al. Efficacy of rituximab in systemic manifestations of primary Sjogren's syndrome: results in 78 patients of the AutoImmune and Rituximab registry. *Ann Rheum Dis.* 2013 Jun;72(6):1026–31.
119. Giacomelli R, Afeltra A, Alunno A, Baldini C, Bartoloni-Bocci E, Berardicurti O, et al. International consensus: What else can we do to improve diagnosis and therapeutic strategies in patients affected by autoimmune rheumatic diseases (rheumatoid arthritis, spondyloarthritis, systemic sclerosis, systemic lupus erythematosus, antiphospholipid syndrome and Sjogren's syndrome)? The unmet needs and the clinical grey zone in autoimmune disease management. *Autoimmun Rev.* 2017 Sep;16(9):911–24.
120. 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.* 1999 Dec 6;190(11):1697–710.

121. Gottenberg JE, Cagnard N, Lucchesi C, Letourneur F, Mistou S, Lazure T, et al. Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 21;103(8):2770–5.
122. Mariette X, Seror R, Quartuccio L, Baron G, Salvin S, Fabris M, et al. Efficacy and safety of belimumab in primary Sjögren's syndrome: results of the BELISS open-label phase II study. *Ann Rheum Dis*. 2015 Mar;74(3):526–31.
123. 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 Sjögren's syndrome: data from a placebo-controlled clinical trial. *Ann Rheum Dis*. 2013 Jan;72(1):146–8.
124. De Vita S, Quartuccio L, Salvin S, Picco L, Scott CA, Rupolo M, et al. Sequential therapy with belimumab followed by rituximab in Sjögren's syndrome associated with B-cell lymphoproliferation and overexpression of BAFF: evidence for long-term efficacy. *Clin Exp Rheumatol*. 2014;32(4):490–4.
125. Mariette X, Barone F, Baldini C, Bootsma H, Clark KL, De Vita S, et al. A randomized, phase II study of sequential belimumab and rituximab in primary Sjögren's syndrome. *JCI Insight*. 2022 Dec 8;7(23):e163030.
126. Bowman SJ, Fox R, Dörner T, Mariette X, Papas A, Grader-Beck T, et al. Safety and efficacy of subcutaneous ianalumab (VAY736) in patients with primary Sjögren's syndrome: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b dose-finding trial. *Lancet*. 2022 Jan 8;399(10320):161–71.
127. 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*. 2014 Jul;73(7):1393–6.
128. Tsuboi H, Matsumoto I, Hagiwara S, Hirota T, Takahashi H, Ebe H, et al. Efficacy and safety of abatacept for patients with Sjögren's syndrome associated with rheumatoid arthritis: rheumatoid arthritis with orencia trial toward Sjögren's syndrome Endocrinopathy (ROSE) trial-an open-label, one-year, prospective study-Interim analysis of 32 patients for 24 weeks. *Mod Rheumatol*. 2015 Mar;25(2):187–93.
129. 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*. 2015 May;74(5):859–66.
130. de Wolff L, van Nimwegen JF, Mossel E, van Zuiden GS, Stel AJ, Majoor KI, et al. Long-term abatacept treatment for 48 weeks in patients with primary Sjögren's syndrome: The open-label extension phase of the ASAP-III trial. *Semin Arthritis Rheum*. 2022 Apr;53:151955.
131. Arends S, Wolff L de, Nimwegen JF van, Verstappen GMPJ, Vehof J, Bombardieri M, et al. Composite of Relevant Endpoints for Sjögren's Syndrome (CRESS): development and validation of a novel outcome measure. *The Lancet Rheumatology [Internet]*. 2021 May 26 [cited 2021 Jun

1];0(0). Available from: [https://www.thelancet.com/journals/lanrhe/article/PIIS2665-9913\(21\)00122-3/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lanrhe/article/PIIS2665-9913(21)00122-3/abstract)

132. Baer AN, Gottenberg JE, Clair EWS, Sumida T, Takeuchi T, Seror R, et al. Efficacy and safety of abatacept in active primary Sjögren's syndrome: results of a phase III, randomised, placebo-controlled trial. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2021 Mar 1;80(3):339–48.
133. Fisher BA, Szanto A, Ng WF, 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. *The Lancet Rheumatology*. 2020 Mar 1;2(3):e142–52.
134. St Clair EW, Clair, Wang L, Alevizos I, Rees W, Baer A, et al. Op0143 Efficacy and Safety of Dazodalibep (vib4920/Hzn4920) in Subjects with Sjögren's Syndrome: A Phase 2, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Proof of Concept Study. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2023 Jun 1;82(Suppl 1):95–95.
135. Clair EWS, Alevizos I, Rees W, Wang L, Baer A, Ng WF, et al. LB0003 Dazodalibep (VIB4920/HZN4920) in Sjögren's Subjects with an Unacceptable Symptom Burden: Safety and Efficacy from a Phase 2, Randomized, Double-Blind Study. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2023 Jun 1;82(Suppl 1):201–201.
136. St Clair EW, Baer AN, Wei C, Noaiseh G, Parke A, Coca A, et al. Clinical Efficacy and Safety of Baminercept, a Lymphotoxin  $\beta$  Receptor Fusion Protein, in Primary Sjögren's Syndrome: Results From a Phase II Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Arthritis Rheumatol*. 2018 Sep;70(9):1470–80.
137. Koski H, Janin A, Humphreys-Beher MG, Sorsa T, Malmström M, Konttinen YT. Tumor necrosis factor-alpha and receptors for it in labial salivary glands in Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 2001;19(2):131–7.
138. 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*. 2004 Apr;50(4):1270–6.
139. 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*. 2004 Jul;50(7):2240–5.
140. Norheim KB, Harboe E, Gøransson LG, Omdal R. Interleukin-1 inhibition and fatigue in primary Sjögren's syndrome--a double blind, randomised clinical trial. *PLoS One*. 2012;7(1):e30123.
141. Grisius MM, Bermudez DK, Fox PC. Salivary and serum interleukin 6 in primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol*. 1997 Jun;24(6):1089–91.
142. Tishler M, Yaron I, Geyer O, Shirazi I, Naftaliev E, Yaron M. Elevated tear interleukin-6 levels in patients with Sjögren syndrome. *Ophthalmology*. 1998 Dec;105(12):2327–9.

143. Felten R, Devauchelle-Pensec V, Seror R, Duffau P, Saadoun D, Hachulla E, et al. Interleukin 6 receptor inhibition in primary Sjögren syndrome: a multicentre double-blind randomised placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis*. 2021 Mar;80(3):329–38.
144. Yu A, Zhu L, Altman NH, Malek TR. A low interleukin-2 receptor signaling threshold supports the development and homeostasis of T regulatory cells. *Immunity*. 2009 Feb 20;30(2):204–17.
145. Horvath CM. The Jak-STAT pathway stimulated by interferon alpha or interferon beta. *Sci STKE*. 2004 Nov 23;2004(260):tr10.
146. Namour F, Diderichsen PM, Cox E, Vayssière B, Van der Aa A, Tasset C, et al. Pharmacokinetics and Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling of Filgotinib (GLPG0634), a Selective JAK1 Inhibitor, in Support of Phase IIB Dose Selection. *Clin Pharmacokinet*. 2015 Aug;54(8):859–74.
147. Aouar B, Kovarova D, Letard S, Font-Haro A, Florentin J, Weber J, et al. Dual Role of the Tyrosine Kinase Syk in Regulation of Toll-Like Receptor Signaling in Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLoS One*. 2016;11(6):e0156063.
148. Vargas L, Hamasy A, Nore BF, Smith CIE. Inhibitors of BTK and ITK: state of the new drugs for cancer, autoimmunity and inflammatory diseases. *Scand J Immunol*. 2013 Aug;78(2):130–9.
149. Price E, Bombardieri M, Kivitz A, Matzkies F, Gurtovaya O, Pechonkina A, et al. Safety and efficacy of filgotinib, lanraplenib and tirabrutinib in Sjögren’s syndrome: a randomized, phase 2, double-blind, placebo-controlled study. *Rheumatology (Oxford)*. 2022 Nov 28;61(12):4797–808.
150. Remibrutinib (LOU064) in Sjögren’s Syndrome: Safety and Efficacy Results from a 24-Week Placebo-controlled Proof-of-Concept Study [Internet]. *ACR Meeting Abstracts*. [cited 2023 Jul 17]. Available from: <https://acrabstracts.org/abstract/remibrutinib-lou064-in-sjogrens-syndrome-safety-and-efficacy-results-from-a-24-week-placebo-controlled-proof-of-concept-study/>
151. Cao W, Bover L. Signaling and ligand interaction of ILT7: receptor-mediated regulatory mechanisms for plasmacytoid dendritic cells. *Immunol Rev*. 2010 Mar;234(1):163–76.
152. 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 Feb;78(2):249–60.
153. Helmer E, Watling M, Jones E, Tytgat D, Jones M, Allen R, et al. First-in-human studies of seletalisib, an orally bioavailable small-molecule PI3K $\delta$  inhibitor for the treatment of immune and inflammatory diseases. *Eur J Clin Pharmacol*. 2017 May;73(5):581–91.
154. 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. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2018 Jun 1;77(Suppl 2):174–174.

155. Bloom J, Metz C, Nalawade S, Casabar J, Cheng KF, He M, et al. Identification of Igaratimod as an Inhibitor of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) with Steroid-sparing Potential. *J Biol Chem*. 2016 Dec 16;291(51):26502–14.
156. Li G, Yamasaki R, Fang M, Masaki K, Ochi H, Matsushita T, et al. Novel disease-modifying anti-rheumatic drug igaratimod suppresses chronic experimental autoimmune encephalomyelitis by down-regulating activation of macrophages/microglia through an NF- $\kappa$ B pathway. *Sci Rep*. 2018 Jan 31;8(1):1933.
157. Pu J, Wang X, Riaz F, Zhang T, Gao R, Pan S, et al. Effectiveness and Safety of Igaratimod in Treating Primary Sjögren's Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Pharmacol*. 2021;12:621208.
158. Posada J, Valadkhan S, Burge D, Davies K, Tarn J, Casement J, et al. Improvement of Severe Fatigue Following Nuclease Therapy in Patients With Primary Sjögren's Syndrome: A Randomized Clinical Trial. *Arthritis & Rheumatology*. 2021;73(1):143–50.
159. Burge DJ, Eisenman J, Byrnes-Blake K, Smolak P, Lau K, Cohen SB, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of RSLV-132, an RNase-Fc fusion protein in systemic lupus erythematosus: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Lupus*. 2017 Jul;26(8):825–34.
160. Saegusa K, Ishimaru N, Yanagi K, Arakaki R, Ogawa K, Saito I, et al. Cathepsin S inhibitor prevents autoantigen presentation and autoimmunity. *J Clin Invest*. 2002 Aug;110(3):361–9.
161. Theron M, Bentley D, Nagel S, Manchester M, Gerg M, Schindler T, et al. Pharmacodynamic Monitoring of RO5459072, a Small Molecule Inhibitor of Cathepsin S. *Front Immunol*. 2017;8:806.
162. Bentley D, Fisher BA, Barone F, Kolb FA, Attley G. A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel group study on the effects of a cathepsin S inhibitor in primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2023 Mar 2;kead092.
163. 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. *The Lancet Rheumatology*. 2020 May 1;2(5):e260–9.
164. Roescher N, Vosters JL, Alsaleh G, Dreyfus P, Jacques S, Chiocchia G, et al. Targeting the splicing of mRNA in autoimmune diseases: BAFF inhibition in Sjögren's syndrome as a proof of concept. *Mol Ther*. 2014 Apr;22(4):821–7.
165. Zekavat G, Rostami SY, Badkerhanian A, Parsons RF, Koeberlein B, Yu M, et al. In vivo BLYS/BAFF neutralization ameliorates islet-directed autoimmunity in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 2008 Dec 1;181(11):8133–44.
166. Mariño E, Villanueva J, Walters S, Liuwantara D, Mackay F, Grey ST. CD4(+)CD25(+) T-cells control autoimmunity in the absence of B-cells. *Diabetes*. 2009 Jul;58(7):1568–77.

167. Chatenoud L, Thervet E, Primo J, Bach JF. Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994 Jan 4;91(1):123–7.
168. Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG, Mathieu C, Kaufman L, Hale G, et al. Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2005 Jun 23;352(25):2598–608.
169. Waldron-Lynch F, Herold KC. Immunomodulatory therapy to preserve pancreatic  $\beta$ -cell function in type 1 diabetes. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2011 Jun;10(6):439–52.
170. Hu C, Ding H, Zhang X, Wong FS, Wen L. Combination treatment with anti-CD20 and oral anti-CD3 prevents and reverses autoimmune diabetes. *Diabetes*. 2013 Aug;62(8):2849–58.
171. Chatenoud L, Primo J, Bach JF. CD3 antibody-induced dominant self tolerance in overtly diabetic NOD mice. *The Journal of Immunology*. 1997;158(6):2947–54.
172. Roescher N, Lodde BM, Vosters JL, Tak PP, Catalan MA, Illei GG, et al. Temporal changes in salivary glands of non-obese diabetic mice as a model for Sjögren's syndrome. *Oral Dis*. 2012 Jan;18(1):96–106.
173. Jin JO, Shinohara Y, Yu Q. Innate immune signaling induces interleukin-7 production from salivary gland cells and accelerates the development of primary Sjögren's syndrome in a mouse model. *PLoS One*. 2013;8(10):e77605.
174. Liang Y, Zhang Z, Li J, Luo W, Jiang T, Yang Z. Association between IL-7 and primary Sjögren's syndrome: A single-center study and a systematic scoping review. *Int Immunopharmacol*. 2022 Jul;108:108758.
175. Rivière E, Pascaud J, Virone A, Dupré A, Ly B, Paoletti A, et al. Interleukin-7/Interferon Axis Drives T Cell and Salivary Gland Epithelial Cell Interactions in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol*. 2021 Apr;73(4):631–40.
176. 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 Jun;71(6):1027–33.
177. 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. *Rheumatology (Oxford)*. 2019 Oct 1;58(10):1740–5.
178. Trabanelli S, Gomez-Cadena A, Salomé B, Michaud K, Mavilio D, Landis BN, et al. Human innate lymphoid cells (ILCs): Toward a uniform immune-phenotyping. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018 May;94(3):392–9.

179. Simoni Y, Fehlings M, Kløverpris HN, McGovern N, Koo SL, Loh CY, et al. Human Innate Lymphoid Cell Subsets Possess Tissue-Type Based Heterogeneity in Phenotype and Frequency. *Immunity*. 2017 Jan 17;46(1):148–61.
180. Bernink JH, Mjösberg J, Spits H. Human ILC1: To Be or Not to Be. *Immunity*. 2017 May 16;46(5):756–7.
181. Roan F, Ziegler SF. Human group 1 innate lymphocytes (ILC1) are negative for surface CD3ε but express CD5. *Immunity*. 2017 May 16;46(5):758–9.
182. 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. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2017 Jan 1;76(1):9–16.
183. 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*. 2015 May;74(5):859–66.
184. Kingsmore KM, Grammer AC, Lipsky PE. Drug repurposing to improve treatment of rheumatic autoimmune inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2020 Jan;16(1):32–52.
185. Toro-Domínguez D, Carmona-Sáez P, Alarcón-Riquelme ME. Support for phosphoinositol 3 kinase and mTOR inhibitors as treatment for lupus using in-silico drug-repurposing analysis. *Arthritis Res Ther*. 2017 Mar 11;19(1):54.
186. Lamb J, Crawford ED, Peck D, Modell JW, Blat IC, Wrobel MJ, et al. The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1929–35.
187. Lavie F, Miceli-Richard C, Ittah M, Sellam J, Gottenberg JE, Mariette X. Increase of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) after rituximab treatment: insights into a new regulating system of BAFF production. *Ann Rheum Dis*. 2007 May;66(5):700–3.
188. Kraaij T, Kamerling SWA, de Rooij ENM, van Daele PLA, Bredewold OW, Bakker JA, et al. The NET-effect of combining rituximab with belimumab in severe systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun*. 2018 Jul;91:45–54.
189. Gualtierotti R, Borghi MO, Gerosa M, Schioppo T, Larghi P, Geginat J, et al. Successful sequential therapy with rituximab and belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a case series. *Clin Exp Rheumatol*. 2018;36(4):643–7.
190. Ramsköld D, Parodis I, Lakshmikanth T, Sippl N, Khademi M, Chen Y, et al. B cell alterations during BAFF inhibition with belimumab in SLE. *EBioMedicine*. 2019 Feb;40:517–27.
191. Dörner T, Posch MG, Li Y, Petricoul O, Cabanski M, Milojevic JM, et al. Treatment of primary Sjögren’s syndrome with ianalumab (VAY736) targeting B cells by BAFF receptor blockade coupled with enhanced, antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Ann Rheum Dis*. 2019 May;78(5):641–7.

192. Kowalczyk-Quintas C, Schuepbach-Mallepell S, Vigolo M, Willen L, Tardivel A, Smulski CR, et al. Antibodies That Block or Activate Mouse B Cell Activating Factor of the Tumor Necrosis Factor (TNF) Family (BAFF), Respectively, Induce B Cell Depletion or B Cell Hyperplasia. *J Biol Chem*. 2016 Sep 16;291(38):19826–34.
193. Abuzakouk M, Feighery C, O'Farrelly C. Collagenase and Dispace enzymes disrupt lymphocyte surface molecules. *J Immunol Methods*. 1996 Aug 14;194(2):211–6.
194. Wu Z, Zheng Y, Sheng J, Han Y, Yang Y, Pan H, et al. CD3+CD4-CD8- (Double-Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer. *Front Immunol*. 2022 Feb 10;13:816005.
195. Alunno A, Bistoni O, Bartoloni E, Caterbi S, Bigerna B, Tabarrini A, et al. IL-17-producing CD4-CD8- T cells are expanded in the peripheral blood, infiltrate salivary glands and are resistant to corticosteroids in patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2013 Feb;72(2):286–92.
196. Alunno A, Carubbi F, Bistoni O, Caterbi S, Bartoloni E, Bigerna B, et al. CD4(-)CD8(-) T-cells in primary Sjögren's syndrome: association with the extent of glandular involvement. *J Autoimmun*. 2014 Jun;51:38–43.
197. Duncan B, Nazarov-Stoica C, Surls J, Kehl M, Bona C, Casares S, et al. Double negative (CD3+ 4- 8- ) TCR alpha beta splenic cells from young NOD mice provide long-lasting protection against type 1 diabetes. *PLoS One*. 2010 Jul 2;5(7):e11427.
198. Groom JR, Fletcher CA, Walters SN, Grey ST, Watt SV, Sweet MJ, et al. BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *J Exp Med*. 2007 Aug 6;204(8):1959–71.
199. Walters S, Webster KE, Sutherland A, Gardam S, Groom J, Liuwantara D, et al. Increased CD4+Foxp3+ T cells in BAFF-transgenic mice suppress T cell effector responses. *J Immunol*. 2009 Jan 15;182(2):793–801.
200. Prete M, Leone P, Frassanito MA, Desantis V, Marasco C, Cicco S, et al. Belimumab restores Treg/Th17 balance in patients with refractory systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2018 Oct;27(12):1926–35.
201. Gottenberg JE, Lavie F, Abbed K, Gasnault J, Le Nevot E, Delfraissy JF, et al. CD4 CD25high regulatory T cells are not impaired in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Autoimmun*. 2005 May;24(3):235–42.
202. Sarigul M, Yazisiz V, Bassorgun CI, Ulker M, Avci AB, Erbasan F, et al. The numbers of Foxp3 + Treg cells are positively correlated with higher grade of infiltration at the salivary glands in primary Sjogren's syndrome. *Lupus*. 2010 Feb;19(2):138–45.
203. Alunno A, Nocentini G, Bistoni O, Petrillo MG, Bartoloni Bocci E, Ronchetti S, et al. Expansion of CD4+CD25-GITR+ regulatory T-cell subset in the peripheral blood of patients with primary Sjögren's syndrome: correlation with disease activity. *Reumatismo*. 2012;64(5):293–8.

204. Alunno A, Petrillo MG, Nocentini G, Bistoni O, Bartoloni E, Caterbi S, et al. Characterization of a new regulatory CD4+ T cell subset in primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2013 Aug;52(8):1387–96.
205. Jin JO, 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 Aug;65(8):2132–42.
206. Bodewes ILA, Björk A, Versnel MA, Wahren-Herlenius M. Innate immunity and interferons in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2021 Jun 18;60(6):2561–73.
207. Elemam NM, Ramakrishnan RK, Hundt JE, Halwani R, Maghazachi AA, Hamid Q. Innate Lymphoid Cells and Natural Killer Cells in Bacterial Infections: Function, Dysregulation, and Therapeutic Targets. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:733564.
208. Silverstein NJ, Wang Y, Manickas-Hill Z, Carbone C, Dauphin A, Boribong BP, et al. Innate lymphoid cells and COVID-19 severity in SARS-CoV-2 infection. *Elife*. 2022 Mar 11;11:e74681.
209. Fan D, Wang X, Wang M, Wang Y, Zhang L, Li Y, et al. Allergen-Dependent Differences in ILC2s Frequencies in Patients With Allergic Rhinitis. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2016 May;8(3):216–22.
210. Ciccia F, Guggino G, Rizzo A, Ferrante A, Raimondo S, Giardina A, et al. Potential involvement of IL-22 and IL-22-producing cells in the inflamed salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2012 Feb;71(2):295–301.
211. Guggino G, Lin X, Rizzo A, Xiao F, Saieva L, Raimondo S, et al. Interleukin-25 Axis Is Involved in the Pathogenesis of Human Primary and Experimental Murine Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol*. 2018 Aug;70(8):1265–75.
212. Seror R, Nocturne G, Lazure T, Hendel-Chavez H, Desmoulins F, Belkhir R, et al. Low numbers of blood and salivary natural killer cells are associated with a better response to belimumab in primary Sjögren's syndrome: results of the BELISS study. *Arthritis Res Ther*. 2015 Sep 4;17(1):241.
213. Nandula SR, Scindia YM, Dey P, Bagavant H, Deshmukh US. Activation of innate immunity accelerates sialoadenitis in a mouse model for Sjögren's syndrome-like disease. *Oral Dis*. 2011 Nov;17(8):801–7.
214. Perry JSA, Han S, Xu Q, Herman ML, Kennedy LB, Csako G, et al. Inhibition of LT $\alpha$  cell development by CD25 blockade is associated with decreased intrathecal inflammation in multiple sclerosis. *Sci Transl Med*. 2012 Aug 1;4(145):145ra106.
215. Lin YC, Winokur P, Blake A, Wu T, Romm E, Bielekova B. Daclizumab reverses intrathecal immune cell abnormalities in multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015 May;2(5):445–55.
216. 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*. 2004 Jul;24(14):6298–310.

217. Huang Y, Paul WE. Inflammatory group 2 innate lymphoid cells. *Int Immunol*. 2016 Jan;28(1):23–8.
218. 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 Aug;56(8):2492–502.
219. 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*. 2003 Dec 15;198(12):1797–806.
220. 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 Jul;1864(7):2438–47.
221. Allan DS, Kirkham CL, Aguilar OA, Qu LC, Chen P, Fine JH, et al. An in vitro model of innate lymphoid cell function and differentiation. *Mucosal Immunology*. 2015 Mar 1;8(2):340–51.
222. Sah P, Derouen JT, Alexander JL, Zenewicz LA. Group 3 innate lymphocytes (ILC3s) upregulate IL-22 in response to elevated intracellular cAMP levels. *Cytokine*. 2022 May 1;153:155862.
223. 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 Apr 2;129(5):1910–25.
224. Herold KC, Bucktrout SL, Wang X, Bode BW, Gitelman SE, Gottlieb PA, et al. Immunomodulatory activity of humanized anti-IL-7R monoclonal antibody RN168 in subjects with type 1 diabetes. *JCI Insight*. 2019 Dec 19;4(24):e126054.
225. Poirier N, Baccelli I, Belarif L, Abès R, Teppaz G, Mary C, et al. First-in-Human Study in Healthy Subjects with the Noncytotoxic Monoclonal Antibody OSE-127, a Strict Antagonist of IL-7R $\alpha$ . *J Immunol*. 2023 Mar 15;210(6):753–63.
226. Yiduo Sun JL, Chen W. Type I Interferons in the Pathogenesis and Treatment of Sjögren's Syndrome: An Update. *EMJ*. 2022 Jul 14;9(1):59–69.
227. Viela Bio. A Phase 1, Randomized, Blinded, Single-Dose, Dose Escalation Study to Evaluate the Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of MEDI7734 in Type I Interferon-Mediated Autoimmune Diseases [Internet]. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov); 2018 Dec [cited 2023 Aug 27]. Report No.: NCT02780674. Available from: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02780674>
228. 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.
229. Lee J, Lee J, Kwok SK, Baek S, Jang SG, Hong SM, et al. JAK-1 Inhibition Suppresses Interferon-Induced BAFF Production in Human Salivary Gland: Potential Therapeutic Strategy for Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol*. 2018 Dec;70(12):2057–66.

230. University Medical Center Groningen. ANifrolumab Treatment for 24 Weeks in Patients With Primary Sjögren's Syndrome - Efficacy and Safety Assessment in a Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Phase-IIa Proof-of-concept Trial (ANISE-II) [Internet]. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov/study/NCT05383677); 2022 Dec [cited 2023 Aug 27]. Report No.: NCT05383677. Available from: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05383677>
231. Tordera RM, Cortés-Erice M. Role of Histone Deacetylases in Monocyte Function in Health and Chronic Inflammatory Diseases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2021;180:1–47.
232. Blackwell L, Norris J, Suto CM, Janzen WP. The use of diversity profiling to characterize chemical modulators of the histone deacetylases. *Life Sci.* 2008 May 23;82(21–22):1050–8.
233. Hamminger P, Rica R, Ellmeier W. Histone deacetylases as targets in autoimmune and autoinflammatory diseases. *Adv Immunol.* 2020;147:1–59.
234. Ghiboub M, Elfiky AMI, de Winther MPJ, Harker NR, Tough DF, de Jonge WJ. Selective Targeting of Epigenetic Readers and Histone Deacetylases in Autoimmune and Inflammatory Diseases: Recent Advances and Future Perspectives. *J Pers Med.* 2021 Apr 23;11(5):336.
235. von Knethen A, Heinicke U, Weigert A, Zacharowski K, Brüne B. Histone Deacetylation Inhibitors as Modulators of Regulatory T Cells. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 29;21(7):2356.
236. Dahiya S, Beier UH, Wang L, Han R, Jiao J, Akimova T, et al. HDAC10 deletion promotes Foxp3+ T-regulatory cell function. *Sci Rep.* 2020 Jan 16;10(1):424.
237. Shu L, Xu CQ, Yan ZY, Yan Y, Jiang SZ, Wang YR. Post-Stroke Microglia Induce Sirtuin2 Expression to Suppress the Anti-inflammatory Function of Infiltrating Regulatory T Cells. *Inflammation.* 2019 Dec;42(6):1968–79.
238. Lin W, Chen W, Liu W, Xu Z, Zhang L. Sirtuin4 suppresses the anti-neuroinflammatory activity of infiltrating regulatory T cells in the traumatically injured spinal cord. *Immunology.* 2019 Dec;158(4):362–74.
239. Saito A, Yamashita T, Mariko Y, Nosaka Y, Tsuchiya K, Ando T, et al. A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Apr 13;96(8):4592–7.
240. Moradei OM, Mallais TC, Frechette S, Paquin I, Tessier PE, Leit SM, et al. Novel aminophenyl benzamide-type histone deacetylase inhibitors with enhanced potency and selectivity. *J Med Chem.* 2007 Nov 15;50(23):5543–6.
241. Cantley MD, Fairlie DP, Bartold PM, Marino V, Gupta PK, Haynes DR. Inhibiting histone deacetylase 1 suppresses both inflammation and bone loss in arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2015 Sep;54(9):1713–23.
242. Lin HS, Hu CY, Chan HY, Liew YY, Huang HP, Lepescheux L, et al. Anti-rheumatic activities of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in vivo in collagen-induced arthritis in rodents. *Br J Pharmacol.* 2007 Apr;150(7):862–72.

243. Gillespie J, Savic S, Wong C, Hempshall A, Inman M, Emery P, et al. Histone deacetylases are dysregulated in rheumatoid arthritis and a novel histone deacetylase 3-selective inhibitor reduces interleukin-6 production by peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2012 Feb;64(2):418–22.
244. Choi EW, Song JW, Ha N, Choi YI, Kim S. CKD-506, a novel HDAC6-selective inhibitor, improves renal outcomes and survival in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *Sci Rep.* 2018 Nov 23;8(1):17297.
245. Do A, Reid RC, Lohman RJ, Sweet MJ, Fairlie DP, Iyer A. An HDAC6 Inhibitor Confers Protection and Selectively Inhibits B-Cell Infiltration in DSS-Induced Colitis in Mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2017 Jan;360(1):140–51.
246. Regna NL, Vieson MD, Luo XM, Chafin CB, Puthiyaveetil AG, Hammond SE, et al. Specific HDAC6 inhibition by ACY-738 reduces SLE pathogenesis in NZB/W mice. *Clin Immunol.* 2016 Jan;162:58–73.
247. Boumber Y, Younes A, Garcia-Manero G. Mocetinostat (MGCD0103): a review of an isotype-specific histone deacetylase inhibitor. *Expert Opin Investig Drugs.* 2011 Jun;20(6):823–9.
248. Wood TE, Dalili S, Simpson CD, Sukhai MA, Hurren R, Anyiwe K, et al. Selective inhibition of histone deacetylases sensitizes malignant cells to death receptor ligands. *Mol Cancer Ther.* 2010 Jan;9(1):246–56.
249. Huang Y, Yang W, Zeng H, Hu C, Zhang Y, Ding N, et al. Droxinostat sensitizes human colon cancer cells to apoptotic cell death via induction of oxidative stress. *Cell Mol Biol Lett.* 2018;23:34.
250. Falkenberg KJ, Johnstone RW. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2014 Sep;13(9):673–91.
251. Nusinzon I, Horvath CM. Interferon-stimulated transcription and innate antiviral immunity require deacetylase activity and histone deacetylase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Dec 9;100(25):14742–7.
252. Vlasáková J, Nováková Z, Rossmeislová L, Kahle M, Hozák P, Hodny Z. Histone deacetylase inhibitors suppress IFN $\alpha$ -induced up-regulation of promyelocytic leukemia protein. *Blood.* 2007 Feb 15;109(4):1373–80.
253. Dirice E, Ng RWS, Martinez R, Hu J, Wagner FF, Holson EB, et al. Isoform-selective inhibitor of histone deacetylase 3 (HDAC3) limits pancreatic islet infiltration and protects female nonobese diabetic mice from diabetes. *J Biol Chem.* 2017 Oct 27;292(43):17598–608.
254. Ratay ML, Balmert SC, Bassin EJ, Little SR. Controlled release of an HDAC inhibitor for reduction of inflammation in dry eye disease. *Acta Biomater.* 2018 Apr 15;71:261–70.
255. Perry MWD, Abdulai R, Mogemark M, Petersen J, Thomas MJ, Valastro B, et al. Evolution of PI3K $\gamma$  and  $\delta$  Inhibitors for Inflammatory and Autoimmune Diseases. *J Med Chem.* 2019 May 23;62(10):4783–814.

256. Safety and Efficacy Results of a Phase 2, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Study of Duvelisib with Background Methotrexate (MTX) in Adults with Moderate-to-Severe Rheumatoid Arthritis (RA) [Internet]. ACR Meeting Abstracts. [cited 2023 Sep 7]. Available from: <https://acrabstracts.org/abstract/safety-and-efficacy-results-of-a-phase-2-double-blind-placebo-controlled-clinical-study-of-duvelisib-with-background-methotrexate-mtx-in-adults-with-moderate-to-severe-rheumatoid-arthritis-ra/>
257. Juarez M, Diaz N, Johnston GI, Nayar S, Payne A, Helmer E, et al. A Phase II Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Proof of Concept Study of Oral Seletalisib in Patients with Primary Sjögren's Syndrome (pss). *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2019 Jun 1;78(Suppl 2):1692–3.
258. Scuron MD, Fay BL, Connell AJ, Oliver J, Smith PA. The PI3K $\delta$  inhibitor piasalisib ameliorates pathology and reduces autoantibody formation in preclinical models of systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Int Immunopharmacol*. 2021 Sep;98:107904.

# Annexes

*Annexe 1. Article The pipeline of targeted therapies under clinical development for primary Sjögren's syndrome: A systematic review of trials*



## The pipeline of targeted therapies under clinical development for primary Sjögren's syndrome: A systematic review of trials



Renaud Felten<sup>a,b,c</sup>, Florence Scher<sup>d</sup>, Jean Sibilia<sup>a,b,c,e</sup>, Jacques-Eric Gottenberg<sup>a,b,c</sup>, Laurent Arnaud<sup>a,c,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Service de rhumatologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France.

<sup>b</sup> Laboratoire d'immunologie, Immunopathologie et Chimie Thérapeutique, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC), CNRS UPR3572, France

<sup>c</sup> RESO : Centre de Référence des Maladies Autoimmunes Systémiques Rares Est Sud-Ouest, France

<sup>d</sup> Service de Pharmacie-Stérilisation, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France

<sup>e</sup> INSERM UMR\_S1109, Université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Sjögren's syndrome  
Therapeutics  
Treatments  
Targeted therapies  
Clinical trials  
Immunosuppressive agents

### ABSTRACT

To date, no immunomodulatory drug has proved efficacious in primary Sjögren's syndrome (pSS). In pSS, difficulties in drug efficacy assessment is related to the large spectrum of clinical involvements (glandular/extraglandular involvement), to the lack of correlation between symptoms of dryness and glandular function assessed by objective measurements, as well as between symptoms and systemic complications of the disease. Severe organ manifestations are generally treated by off-label therapies in accordance with current practice and guidelines for Systemic Lupus Erythematosus or other connective-tissue diseases. Despite a much greater understanding of the pathogenesis of pSS, modern drug development has resulted in no approval of therapy so far. In this study, we performed a systematic review of all targeted therapies under clinical development in pSS, in 17 main online registries of clinical trials. Our search identified 264 trials, from which 25 targeted therapies for pSS were included. The molecules under current clinical development for pSS target B cells ( $n = 4$ ), T cells or T/B cells costimulation ( $n = 5$ ), inflammatory cytokines or chemokines and their receptors ( $n = 5$ ), intracellular signalling pathways ( $n = 7$ ) and various other targets identified in pSS ( $n = 4$ ). The current drug development pipeline in pSS may lead to valuable strategies for the treatment of this currently difficult-to-treat disease.

### 1. Introduction

Primary Sjögren's syndrome (pSS) is a complex systemic autoimmune disease characterized by a wide spectrum of clinical and laboratory findings and variable course and outcomes. On the basis of formal criteria for the diagnosis [1], which require the presence of immunologic abnormalities (the presence of serum anti-SSA antibodies or focal lymphocytic sialadenitis on biopsy of labial salivary glands), the estimated prevalence is 0.3 to 1 per 1000 persons with a female-to-male predominance of 9:1 and a peak incidence at approximately 50 years of age [2]. The pathogenesis of pSS is not fully elucidated (Fig. 1), but the disease has been recognized as the result of a complex interplay between immunological, genetic and environmental factors implying both innate and adaptive immunity. Despite autoimmune conditions are principally due to T and B lymphocytes, NK cells also appear to play a role in the promotion and/or maintenance of altered

adaptive immune responses or in peripheral tolerance mechanisms [3]. pSS follows a typical multistep model of human autoimmune diseases characterized by loss of immunologic tolerance to self-antigens, permissive production of autoantibodies, and subsequent emergence of clinical symptoms [4,5]. To date, no immunomodulatory drug has proved efficacious in pSS. Severe organ manifestations are generally treated in accordance with current practice and guidelines for SLE or other connective-tissue diseases. Thus, several unmet needs remain for the treatment of pSS, and the medical community is avid for treatments. New research has improved our understanding of disease mechanisms, with notable advances in our knowledge about the genetic susceptibility of disease [6], the complex role of interferon pathways [7] and the molecular process of the chronic autoimmune response in exocrine glands [8]. The pipeline of drugs under development for the treatment of pSS is enriched with novel biologics and small molecular entities targeting these pathogenic processes such as in Systemic Lupus

\* Corresponding author at: Service de rhumatologie, Centre National de Référence des Maladies Autoimmunes et Systémiques Rares, Hôpital de Hautepierre, 1 Avenue Molière BP 83049, 67098 Strasbourg, Cedex, France.

E-mail address: [Laurent.arnaud@chru-strasbourg.fr](mailto:Laurent.arnaud@chru-strasbourg.fr) (L. Arnaud).

<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.12.008>

Received 30 November 2018; Accepted 6 December 2018

Available online 06 April 2019

1568-9972/ © 2019 Published by Elsevier B.V.

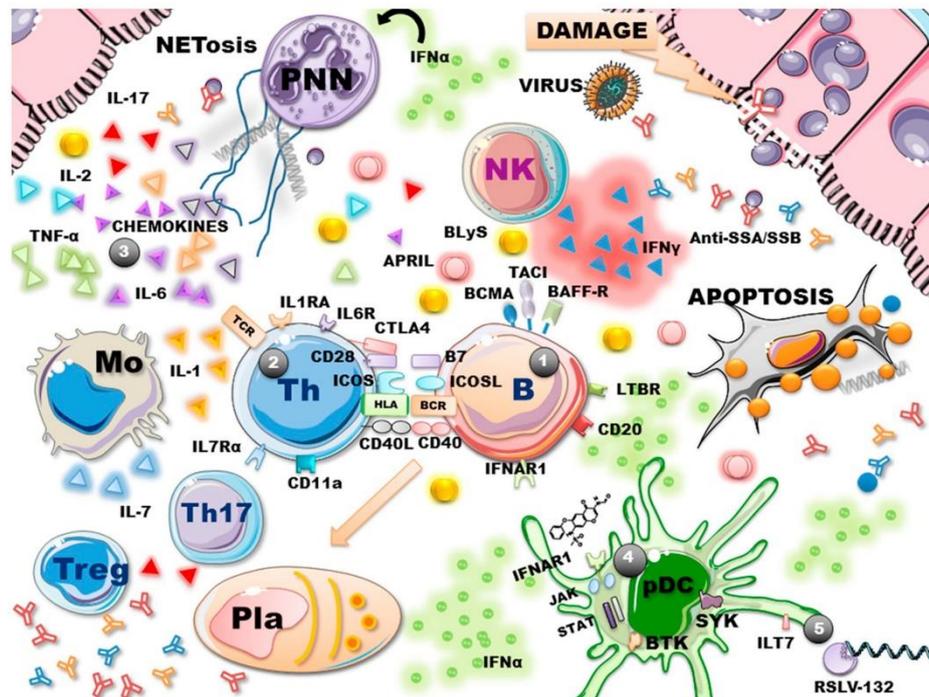


Fig. 1. The complex pathogenesis of pSS and targets of pSS treatments

1. Targeting B cells
2. Targeting T cells or B/T cells co-stimulation
3. Targeting cyto/chemokines and their receptors
4. Small molecules targeting intracellular signalling pathways
5. Other mechanisms of action

Erythematosus (SLE) [9,10]. The purpose of this systematic review is to provide the reader with an updated view of targeted therapies currently under clinical development in pSS.

## 2. Methods

We performed a systematic review of all targeted therapies under clinical development in pSS, in the main online registries of clinical trials. Targeted therapies were defined as drugs specifically designed to block certain molecules, receptors, or pathways involved in the development of autoimmune diseases. Clinical development stages were defined as phases I, II & III. Were excluded from this systematic review all pharmacological agents leading to a non-specific blockade of the immune system, such as classical immunosuppressive agents. Two authors (R.F. & F.S.) searched 17 national and international databases of clinical trials (Table 1) using the keywords “Sjögren's syndrome”, “Sjögren” and “Sjogren” (date of search: the 13th of May 2018). Expert feedback was used to identify additional trials. Duplicates were excluded and each study was subsequently classified in consensus as whether it involved or not a targeted therapy for pSS, based on the descriptions provided in the registries or additional evidence gathered through the main internet search engines. Finally, targeted therapies for pSS were classified according to their mechanisms of action, and the current stage of drug development was extracted from the registries.

## 3. Results

Our search identified 264 trials, from which 25 targeted therapies for pSS were included in this review. The study selection process and reasons for exclusion are shown in Fig. 2. For each therapy, we considered only the study at the most advanced stage of clinical development.

The candidate drugs reached phase I ( $n = 2$ ), I/II ( $n = 1$ ), Phase II ( $n = 19$ ), phase II/III ( $n = 2$ ) and phase III ( $n = 1$ ). The 23 corresponding trials were completed ( $n = 8$ ), recruiting ( $n = 6$ ), terminated ( $n = 4$ ), active but not recruiting ( $n = 4$ ) and withdrawn ( $n = 1$ ).

Molecules under current clinical development for pSS target B cells ( $n = 4$ ), T cells or T/B cells costimulation ( $n = 5$ ), inflammatory cytokines or chemokines and their receptors ( $n = 5$ ), intracellular signalling pathways ( $n = 7$ ) and various other targets identified in pSS ( $n = 4$ ) (Fig. 1).

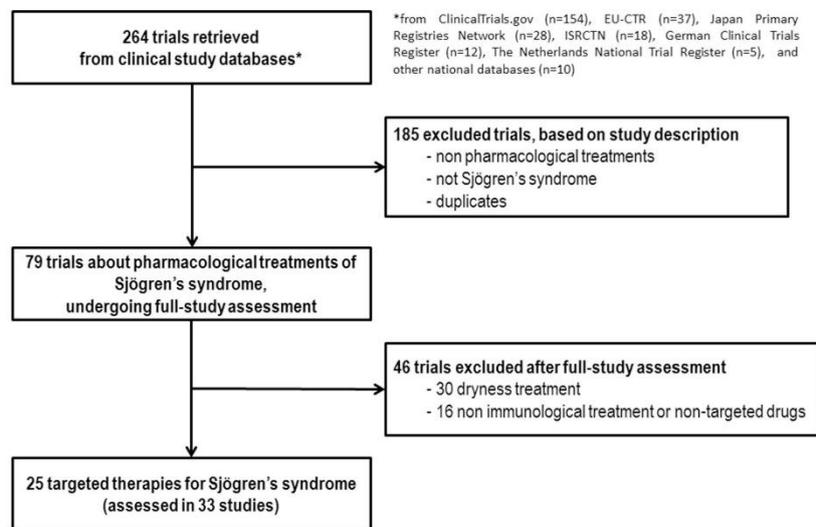
### 3.1. B cell therapies

B cells can be selectively targeted either via direct B cell molecules such as CD20 or by inhibition of B cell survival factors such as B lymphocyte stimulator (BlyS/BAFF).

Four molecules target B cells (Fig. 3 and Table 2), assessed in 5 trials: phase II ( $n = 4$ , 2 recruiting, 1 completed and 1 terminated) or

**Table 1**  
List of international and national databases of clinical trials used for this systematic review.

Name of the database	Number of pSS trials identified	Website URL
<a href="https://clinicaltrials.gov">ClinicalTrials.gov</a>	154	<a href="https://clinicaltrials.gov">https://clinicaltrials.gov</a>
EU Clinical Trials Register (EU-CTR)	37	<a href="https://www.clinicaltrialsregister.eu">https://www.clinicaltrialsregister.eu</a>
Japan Primary Registries Network	28	<a href="http://www.umin.ac.jp/ctr/">http://www.umin.ac.jp/ctr/</a>
ISRCTN (International Standard Randomised Controlled Trial Number)	18	<a href="https://www.isrctn.com">https://www.isrctn.com</a>
German Clinical Trials Register	12	<a href="https://www.drks.de">https://www.drks.de</a>
The Netherlands National Trial Register	5	<a href="http://www.trialregister.nl">http://www.trialregister.nl</a>
Australian New Zealand Clinical Trials Registry	2	<a href="https://www.australianclinicaltrials.gov.au">https://www.australianclinicaltrials.gov.au</a>
Chinese Clinical Trial Registry	2	<a href="http://www.chictr.org.cn">http://www.chictr.org.cn</a>
Cuban Public Registry of Clinical Trials	2	<a href="http://registroclinico.sld.cu">http://registroclinico.sld.cu</a>
Brazilian Clinical Trials Registry (ReBec)	1	<a href="http://www.ensaiosclinicos.gov.br">http://www.ensaiosclinicos.gov.br</a>
Clinical Research Information Service - Republic of Korea	1	<a href="https://cris.nih.go.kr">https://cris.nih.go.kr</a>
Clinical Trials Registry - India	1	<a href="http://ctri.nic.in">http://ctri.nic.in</a>
Iranian Registry of Clinical Trials	1	<a href="http://www.irct.ir">www.irct.ir</a>
Pan african Clinical Trial Registry	0	<a href="http://www.pactr.org">http://www.pactr.org</a>
Peruvian Clinical Trials Registry	0	<a href="http://www.ensayosclinicos-repec.ins.gob.pe">http://www.ensayosclinicos-repec.ins.gob.pe</a>
Sri Lanka Clinical Trials Registry	0	<a href="http://slictr.lk">http://slictr.lk</a>
Thai Clinical Trials Register	0	<a href="http://www.clinicaltrials.in.th">http://www.clinicaltrials.in.th</a>



**Fig. 2.** Flow-chart of study selection.

phase II/III ( $n = 1$  completed).

The use of rituximab, a chimeric anti-CD20 antibody, in patients with pSS has been investigated in four completed randomised controlled trials [11–14] showing no significant improvement in a composite primary end-point or for fatigue or oral dryness in the larger studies [13,14]. However, most experts agree that rituximab may be useful for the treatment of some systemic manifestations of pSS, especially cryoglobulinemia-induced vasculitis [15,16].

An open-label phase II study suggested the efficacy of belimumab, an inhibitor of BAFF, in 60% of patients, as assessed by an improvement in at least two of five disease indicators, including dryness, pain, fatigue, systemic activity, and B-cell biomarkers [17]. However, there was no significant improvement in salivary flow or tear production as assessed by Schirmer's test.

After rituximab treatments, serum BAFF levels increased when B cells were depleted from the circulation in pSS patients. When B cells reappeared, BAFF levels declined [18]. Given the role of BAFF in pSS, combination of anti-BAFF treatment with rituximab may lead to a

prolonged reduction of (autoreactive) B cells. Sequential therapy with belimumab followed by rituximab or their co-administration may also be effective for pSS-related B-cell lymphoproliferation [19]. The safety and the efficacy of subcutaneous belimumab and intravenous rituximab co-administration are currently under evaluation in a phase II (recruiting) study.

Another treatment targeting BAFF is under evaluation: VAY736 an anti-BAFF-Receptor (recruiting phase II). Of note, tibulizumab, an anti-BAFF and anti-IL17A bispecific antibody is also being evaluated (phase I, active, not recruiting, cf. Other mechanisms of action).

Baminercept a Lymphotoxin-Beta receptor fusion protein has been tested in a phase II study, which is terminated. Despite an ESSDAI improvement significantly higher in the baminercept group than with placebo, baminercept therapy was no more effective than placebo for increasing salivary flow or reducing ocular dryness, and was accompanied by an imbalance in transaminase elevations and 2 cases of reversible grade 3 hepatic injury [20].

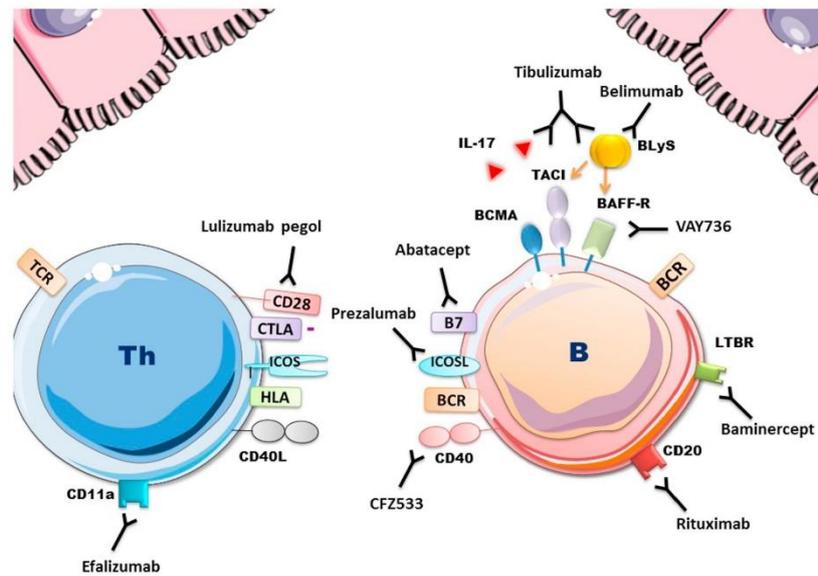


Fig. 3. B cells, T cells and B/T cells co-stimulation targeting therapies.

3.2. Inhibition of T cells or B/T cell co-stimulation

Two distinct signals are necessary for the activation of T cells. The first signal involves the binding of antigen to the T-cell receptor. The second signal occurs with the interaction between receptor–ligand pairs on the T cells and antigen presenting cells that include the B cells.

Five molecules targeting T cells or the B/T cell co-stimulation have been evaluated in pSS (Fig. 3 and Table 2): in phase II (n = 4, 2 terminated, 1 active, but not recruiting and 1 recruiting) or phase III (n = 1, active but not recruiting).

The interaction of CD80 or CD86 molecule on B cells and CD28 on T cells provides an important second co-stimulatory signal for T-cell activation, which is important for the subsequent production of antibodies by the B cells. A fusion protein consisting of CTLA4 and an immunoglobulin chain (CTLA4-Ig or abatacept) binds CD80 or CD86 with a higher affinity than CD28 and inhibits this co-stimulatory pathway. Abatacept is being assessed in pSS in a phase III study (active but not recruiting) after two phase II open-label trials [21,22].

Another receptor–ligand pair, CD40 (on B cells) and CD40L or CD154 (on T cells), also provides an important co-stimulatory signal for T- and B-cell activation. CFZ533, an anti-CD40 antibody is currently being tested in a recruiting phase II trial with preliminary results presented at the 2017 ACR congress [23].

ICOS and its ligand (ICOSL) have been shown to play diverse roles in T-cell responses such as mediating autoimmunity as well as enhancing the development/activity of regulatory T cells (Tregs). Prezalumab, an anti-ICOS antibody and AMG 557, an anti-B7RP-1 (ICOSL) antibody is being evaluated in phase II (active but not recruiting).

Lulizumab pegol is an anti-CD28 monoclonal antibody. CD28 is the co-receptor for the T cell receptor. Lulizumab pegol has been assessed in a phase II trial which was prematurely terminated.

Efalizumab is a recombinant humanized monoclonal antibody which binds to CD11a. Efalizumab has been evaluated in autoimmune diseases, including pSS, but was associated with fatal brain infections and was withdrawn from the market in 2009.

Table 2  
Molecules targeting B cells, T cells or B/T cell co-stimulation.

Molecules	Mechanisms of action	Current development Phase	Current development Stage
<b>B cells</b>			
Rituximab	anti-CD20	Phase 2 Phase 3	Completed
Belimumab	anti-BAFF	Phase 2	Completed
Belimumab/Rituximab	anti-BAFF/anti-CD20	Phase 2	Recruiting
VAY736	anti-BAFF-R	Phase 2	Recruiting
Baminercept	Lymphotoxin-Beta Receptor Fusion Protein	Phase 2	Terminated
<b>T cells or B/T cell co-stimulation</b>			
Abatacept	CTLA-Ig	Phase 3	Active, not recruiting
CFZ533	anti-CD40	Phase 2	Recruiting
Lulizumab pegol	anti-CD28	Phase 2	Terminated
Prezalumab	anti-B7RP-1 (ICOSL)	Phase 2	Active, not recruiting
Efalizumab	anti-CD11a	Phase 2	Terminated

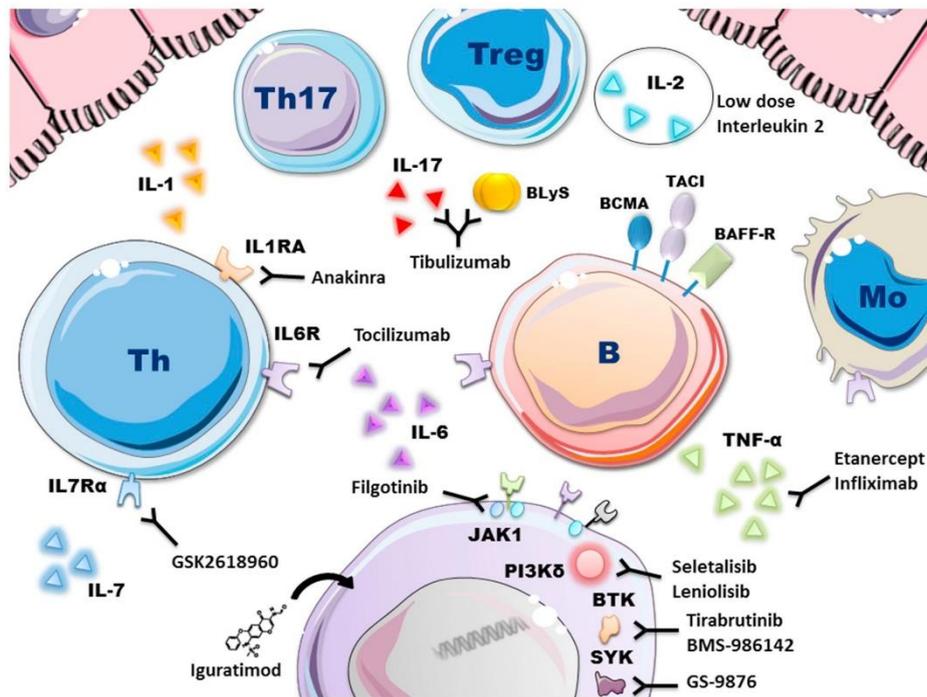


Fig. 4. Cytokines and chemokines (or their receptors) targeting therapies and small molecules targeting intracellular signalling pathways.

### 3.3. Targeting cytokines and their receptors

Five treatments targeting inflammatory cytokines/chemokines or their receptors have been tested in pSS (Fig. 4 and Table 3), in phase II ( $n = 4$ , 3 completed, 1 withdrawn) or phase II/III ( $n = 1$ , active but not recruiting).

TNF- $\alpha$  is a pleiotropic pro-inflammatory cytokine. The over-expression of TNF $\alpha$  has been detected in glandular lesions both in animal models of primary SS and in humans [24,25]. A randomised phase II controlled trials of infliximab [26] (which has not been identified by our registry search) and etanercept [27] showed no significant improvement in a composite primary outcome on a visual-analogue scale

Table 3

Molecules targeting cytokines, chemokines or their receptors, small molecules targeting intracellular signalling pathways and molecules with other mechanisms of action.

Molecules	Mechanisms of action	Current development Phase	Current development Stage
Cytokines, chemokines or their receptors			
Etanercept	anti-TNF	Phase 2	Completed
Tocilizumab	anti-IL-6R	Phase 2 Phase 3	Active, not recruiting
hrIL-2	Low dose of IL-2	Phase 2	Completed
Anakinra	anti-IL-1RA	Phase 2	Completed
GSK2618960	anti-IL-7R $\alpha$	Phase 2	Withdrawn
Small molecules targeting intracellular signalling pathways			
Filgotinib	selective JAK1 inhibitor	Phase 2	Recruiting
GS-9876	Syk inhibitor		
Tirabrutinib	BTK inhibitor		
BMS-986142	BTK inhibitor	Phase 2	Terminated
Seletalisib	selective PI3K $\delta$ inhibitor	Phase 2	Terminated
Leniolisib	selective PI3K $\delta$ inhibitor	Phase 2	Completed
Igaratimod	suppression of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) activation	Phase 1 Phase 2	Recruiting
Other mechanisms of action			
Tibulizumab	anti-BAFF and anti-IL17A	Phase 1	Active, not recruiting
MEDI7734	anti-IL17 (pDCs)	Phase 1	Completed
RSLV-132	RNase-Fc fusion protein	Phase 2	Recruiting
RO5459072	Cathepsine-S inhibitor	Phase 2	Completed

of joint pain, fatigue, and dryness.

Anakinra, an anti-IL1RA antibody, has been tested in a phase II trial in which did not reach its primary endpoint [28].

IL-6 is mainly secreted by activated macrophages and T cells and is induced by other cytokines such as TNF and IFN. Serum IL-6 is increased in serum, saliva, and tears of patients with pSS [29,30]. IL-6 plays a pivotal role in B-cell activation, a hallmark of the pathogenesis of pSS, as well as in T-cell differentiation. Tocilizumab, a recombinant humanized anti-IL-6R monoclonal antibody is being tested in a phase II/III placebo-controlled study (active but not recruiting).

Treatment with low-dose IL-2 selectively enhances Tregs functions [31] while avoiding the activation of effector T cells and may therefore improve immune inflammation. Administration of low doses of IL-2 to pSS patients has been tested in a completed phase II trial (pending results).

GSK2618960 is a humanized Immunoglobulin G1 monoclonal antibody that binds to the alpha component (CD127) of the heterodimeric Interleukin-7 receptor (IL-7R). The molecule has been evaluated in a phase II study (stopped for portfolio prioritization).

Tibulizumab is an anti-BAFF and anti-IL17A bispecific antibody, being evaluated in an active phase I study (cf. Other mechanisms of action).

### 3.4. Small molecules targeting intracellular signalling pathways

Seven small molecules targeting intracellular signalling pathways are in the pSS pipeline (Fig. 4 and Table 3), in five trials of phase II ( $n = 4$ , 2 terminated and 1 completed, 1 recruiting) or phase I/II ( $n = 1$ , recruiting).

PI3k $\delta$  is a signalling molecule crucial for BAFF receptor 3 function [32], two studies are now underway in pSS to investigate the potential benefits of a small molecule selective PI3k $\delta$  inhibitor: Leniolisib (completed phase II, pending results) and seletalisib [33](terminated phase II, study stopped prematurely due to enrolment challenges).

Because type I interferons signal through JAKs to induce IFN-stimulated gene expression [34], therapeutic inhibitors of JAKs have appeared as potentially valuable drugs in pSS. Filgotinib an highly selective JAK1 inhibitor [35] is being evaluated in a recruiting phase II trial. In the same trial, two others arms are evaluating GS-9876, a Spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor and tirabrutinib a Bruton's Tyrosine Kinase inhibitor (BTKi). Syk is involved in the regulation of the TLR7/9 pathway in human pDCs [36]. BTK is a cytoplasmic, non-receptor tyrosine kinase that transmits signals from a variety of cell-surface molecules, including the B-cell receptor (BCR) [37]. Another BTKi, BMS-986142, a, has been tested in a phase II study which was prematurely terminated because of an inability to meet protocol objectives and the withdrawal of lizumab tested in an other arm of the same trial.

Iguratimod, a small molecule used as a novel disease-modifying antirheumatic drug for treatment of rheumatoid arthritis in Japan and China displayed significantly inhibition of immunoglobulin production and suppression of IL-1, IL-6 and TNF [38] through NF $\kappa$ B pathway [39]. Iguratimod is being assessed in a currently recruiting phase I/II trial.

### 3.5. Other mechanisms of action

Four molecules with other mechanisms of action are in the pSS pipeline (Table 3): two in phase II (1 completed, 1 recruiting) and two in phase I (1 completed, 1 active, not recruiting).

Tibulizumab, an anti-BAFF and anti-IL17A bispecific antibody is being evaluated in an active phase I study. The expression of IL-17 is increased in patients with pSS and IL-17 level correlates with the disease severity of pSS [40].

MEDI7734 an anti-ILT7 antibody targets plasmacytoid dendritic cells (pDCs) and has been tested in a completed phase I. pDCs produce type I interferon (IFN) after Toll-like receptor (TLR) activation. Human

pDCs preferentially express immunoglobulin-like transcript 7 (ILT7), which couples with a signalling adapter to activate a prominent immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-mediated signalling pathway [41].

RSLV-132, a fully human biologic Fc fusion protein of human RNase and Fc domain of human IgG1, is assessed in a recruiting phase II study. The drug is designed to remain in circulation and digest extracellular RNA with the aim of preventing activation of the immune system via Toll-like receptors and the interferon pathway [42].

Inhibition of cathepsin-S in vivo alters autoantigen presentation and development of organ-specific autoimmunity [43]. RO5459072, a cathepsin-S inhibitor [44] has been evaluated in a completed phase II trial (pending results).

### 4. Conclusion

Primary Sjögren's syndrome (pSS) definitely lacks any specific immunosuppressive treatment. In pSS, the mainstay of therapeutic options is delivered mostly by off-label therapies. Modern drug development has resulted in no approval of therapy so far. One could speculate whether some previous controlled trials revealed negative in pSS because of the inefficacy of the evaluated drug or because of the adopted clinical trial design. Therefore, the proper definition of optimal outcome measures is crucial to set up new clinical trials in pSS. The currently ongoing trials all included only patients with systemic complications and based the definition of their primary outcome criteria on the change in the internationally validated ESSDAI score [45]. Along with improvements in the understanding of the pathogenesis of pSS, this allows to be reasonably optimistic on the future development of effective targeted therapies in pSS.

### References

- [1] Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, et al. 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* 2016;76(9–16). <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210571>. 2017.
- [2] Qin B, Wang J, Yang Z, Yang M, Ma N, Huang F, et al. Epidemiology of primary Sjögren's syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis* 2015;74:1983–9. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-205375>.
- [3] NK cells in autoimmune diseases: linking innate and adaptive immune responses. *Autoimmun Rev* 2018;17(142–54). <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.11.018>.
- [4] Brennan MT, Sankar V, Leakan RA, Grisius MM, Collins MT, Fox PC, et al. Sex steroid hormones in primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 2003;30:1267–71.
- [5] Kivity S, Arango MT, Ehrenfeld M, Tehori O, Shoenfeld Y, Anaya J-M, et al. Infection and autoimmunity in Sjögren's syndrome: a clinical study and comprehensive review. *J Autoimmun* 2014;51:17–22. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.02.008>.
- [6] 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* 2013;45:1284–92. <https://doi.org/10.1038/ng.2792>.
- [7] Yao Y, Liu Z, Jallal B, Shen N, Rönnblom L. Type I interferons in Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev* 2013;12:558–66. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.10.006>.
- [8] Navarro-Mendoza EP, Aguirre-Valencia D, Posso-Osorio I, Correa-Forero SV, Torres-Cativa D-F, Loaiza D, et al. Cytokine markers of B lymphocytes in minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.02.003>.
- [9] Chasset F, Arnaud L. Targeting interferons and their pathways in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2018;17:44–52. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.11.009>.
- [10] Felten R, Dervovic E, Chasset F, Gottenberg J-E, Sibilia J, Scher F, et al. The 2018 pipeline of targeted therapies under clinical development for systemic lupus erythematosus: a systematic review of trials. *Autoimmun Rev* 2018;17(8):781–90. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.02.011>. Epub 2018 Jun 6.
- [11] Dass S, Bowman SJ, Vital EM, Ikeda K, Pease CT, Hamburger J, et al. Reduction of fatigue in Sjögren syndrome with rituximab: results of a randomised, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1541–4. <https://doi.org/10.1136/ard.2007.083865>.
- [12] Meijer JM, Meiners PM, Vissink A, Spijkervet FKL, Abdulahad W, Kamminga N, et al. Effectiveness of rituximab treatment in primary Sjögren's syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2010;62:960–8. <https://doi.org/10.1002/art.27314>.
- [13] Devauchelle-Pensec V, Mariette X, Jousse-Joulin S, Berthelot J-M, Prédiger A,

- Pučhal X, et al. Treatment of primary Sjögren syndrome with rituximab: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2014;160(233–42). <https://doi.org/10.7326/M13-1085>.
- [14] 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 Rheum Hoboken NJ* 2017;69:1440–50. <https://doi.org/10.1002/art.40093>.
- [15] Gottenberg J-E, Cinquetti G, Larroche C, Combe B, Hachulla E, Meyer O, et al. Efficacy of rituximab in systemic manifestations of primary Sjögren's syndrome: results in 78 patients of the AutoImmune and rituximab registry. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1026–31. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202293>.
- [16] Giacomelli R, Afeltra A, Alunno A, Baldini C, Bartoloni-Bocci E, Berardicurti O, et al. International consensus: what else can we do to improve diagnosis and therapeutic strategies in patients affected by autoimmune rheumatic diseases (rheumatoid arthritis, spondyloarthritis, systemic sclerosis, systemic lupus erythematosus, antiphospholipid syndrome and Sjögren's syndrome)? the unmet needs and the clinical grey zone in autoimmune disease management. *Autoimmun Rev* 2017;16:911–24. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.07.012>.
- [17] Mariette X, Seror R, Quartuccio L, Baron G, Salvin S, Fabris M, et al. Efficacy and safety of belimumab in primary Sjögren's syndrome: results of the BELISS open-label phase II study. *Ann Rheum Dis* 2013. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203991>.
- [18] 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 Sjögren's syndrome: data from a placebo-controlled clinical trial. *Ann Rheum Dis* 2013;72:146–8. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202071>.
- [19] De Vita S, Quartuccio L, Salvin S, Picco L, Scott CA, Rupolo M, et al. Sequential therapy with belimumab followed by rituximab in Sjögren's syndrome associated with B-cell lymphoproliferation and overexpression of BAFF: evidence for long-term efficacy. *Clin Exp Rheumatol* 2014;32:490–4.
- [20] St. Clair E, Baer A, Noaieh G, Parke A, Coca A, Utset T, et al. The Clinical Efficacy and Safety of Baminercept, a Lymphotoxin-Beta Receptor Fusion Protein, in Primary Sjögren's Syndrome: Results from a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase II Trial. *ACR Meet Abstr n.d.* <http://acrabstracts.org/abstract/the-clinical-efficacy-and-safety-of-baminercept-a-lymphotoxin-beta-receptor-fusion-protein-in-primary-sjogrens-syndrome-results-from-a-randomized-double-blind-placebo-controlled-phase-ii-trial/>; 2019 (accessed May 21, 2018).
- [21] Meiners PM, Vissink A, Kroese FGM, Spijkervet FKL, Smitt-Kammings 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* 2014;73:1393–6. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204653>.
- [22] Tsuboi H, Matsumoto I, Hagiwara S, Hirota T, Takahashi H, Ebe H, et al. Efficacy and safety of abatacept for patients with Sjögren's syndrome associated with rheumatoid arthritis: rheumatoid arthritis with orencia trial toward Sjögren's syndrome Endocrinopathy (ROSE) trial-an open-label, one-year, prospective study-in-termin analysis of 32 patients for 24 weeks. *Mod Rheumatol* 2015;25:187–93. <https://doi.org/10.3109/14397595.2014.951144>.
- [23] Fischer B, et al. 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. *ACR Meet Abstr n.d.* <http://acrabstracts.org/abstract/the-novel-anti-cd40-mono-clonal-antibody-cfz533-shows-beneficial-effects-in-patients-with-primary-sjogrens-syndrome-a-phase-ii-a-double-blind-placebo-controlled-randomized-trial/>; 2019 (accessed June 22, 2018).
- [24] Fox RI, Kang HI, Ando D, Abrams J, Piza E. Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjögren's syndrome. *J Immunol Baltim Md* 1994;152:5532–9. 1950.
- [25] Koski H, Janin A, Humphreys-Beher MG, Sorsa T, Malmström M, Kontinen YT. Tumor necrosis factor-alpha and receptors for it in labial salivary glands in Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 2001;19:131–7.
- [26] 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* 2004;50:1270–6. <https://doi.org/10.1002/art.20146>.
- [27] 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* 2004;50:2240–5. <https://doi.org/10.1002/art.20299>.
- [28] Norheim KB, Harboe E, Goransson LG, Omdal R. Interleukin-1 inhibition and fatigue in primary Sjögren's syndrome—a double blind, randomised clinical trial. *PLoS One* 2012;7:e30123. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030123>.
- [29] Grisius MM, Bermudez DK, Fox PC. Salivary and serum interleukin 6 in primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 1997;24:1089–91.
- [30] Tishler M, Yaron I, Geyer O, Shirazi I, Nafatlev E, Yaron M. Elevated tear interleukin-6 levels in patients with Sjögren syndrome. *Ophthalmology* 1998;105:2327–9. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(98\)91236-2](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(98)91236-2).
- [31] Yu A, Zhu L, Altman NH, Malek TR. A low interleukin-2 receptor signaling threshold supports the development and homeostasis of T regulatory cells. *Immunity* 2009;30:204–17. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.11.014>.
- [32] Nayar S, Campos J, Buckley C, Allen R, Fahy W, Payne A. Phosphatidylinositol-3-Kinase Delta pathway a novel therapeutic target for Sjögren's syndrome. *ACR Meet Abstr* 2019. <http://acrabstracts.org/abstract/phosphatidylinositol-3-kinase-delta-pathway-a-novel-therapeutic-target-for-sjogrens-syndrome/> (accessed May 22, 2018).
- [33] Helmer E, Watling M, Jones E, Tytgat D, Jones M, Allen R, et al. First-in-human studies of seletalisib, an orally bioavailable small-molecule PI3K $\delta$  inhibitor for the treatment of immune and inflammatory diseases. *Eur J Clin Pharmacol* 2017;73:581–91. <https://doi.org/10.1007/s00228-017-2205-7>.
- [34] Horvath CM. The Jak-STAT pathway stimulated by interferon alpha or interferon beta. *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ* 2004;2004. <https://doi.org/10.1126/stke.2602004tr10.tr10>.
- [35] Namour F, Diderichsen PM, Cox E, Vayssière B, Van der Aa A, Tasset C, et al. Pharmacokinetics and pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of filgotinib (GLPG0634), a selective JAK1 inhibitor, in support of phase IIB dose selection. *Clin Pharmacokinet* 2015;54:859–74. <https://doi.org/10.1007/s40262-015-0240-z>.
- [36] Aouar B, Kovarova D, Letard S, Font-Haro A, Florentin J, Weber J, et al. Dual role of the tyrosine kinase syk in regulation of toll-like receptor signaling in Plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* 2016;11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156063>.
- [37] Vargas L, Hamasy A, Nore BF, Smith CIE. Inhibitors of BTK and ITK: state of the new drugs for Cancer, autoimmunity and inflammatory diseases. *Scand J Immunol* 2013;78:130–9. <https://doi.org/10.1111/sji.12069>.
- [38] Bloom J, Metz C, Nalawade S, Casabar J, Cheng KF, He M, et al. Identification of Igaratimod as an inhibitor of macrophage migration inhibitory factor (MIF) with steroid-sparing potential. *J Biol Chem* 2016;291:26502–14. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.743328>.
- [39] Li G, Yamasaki R, Fang M, Masaki K, Ochi H, Matsushita T, et al. Novel disease-modifying anti-rheumatic drug igratimod suppresses chronic experimental autoimmune encephalomyelitis by down-regulating activation of macrophages/microglia through an NF- $\kappa$ B pathway. *Sci Rep* 2018;8:1933. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20390-5>.
- [40] Zhang L-W, Zhou P-R, Wei P, Cong X, Wu L-L, Hua H. Expression of interleukin-17 in primary Sjögren's syndrome and the correlation with disease severity: a systematic review and meta-analysis. *Scand J Immunol* 2018;87:e12649. <https://doi.org/10.1111/sji.12649>.
- [41] Cao W, Bover L. Signaling and ligand interaction of IL17: receptor-mediated regulatory mechanisms for plasmacytoid dendritic cells. *Immunol Rev* 2010;234:163–76. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00867.x>.
- [42] Burge DJ, Eisenman J, Byrnes-Blake K, Smolak P, Lau K, Cohen SB, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of RSLV-132, an RNase-fc fusion protein in systemic lupus erythematosus: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Lupus* 2017;26:825–34. <https://doi.org/10.1177/0961203316678675>.
- [43] Saegusa K, Ishimaru N, Yanagi K, Arakaki R, Ogawa K, Saito I, et al. Cathepsin S inhibitor prevents autoantigen presentation and autoimmunity. *J Clin Invest* 2002;110:361–9. <https://doi.org/10.1172/JCI4682>.
- [44] Theron M, Bentley D, Nagel S, Manchester M, Gerg M, Schindler T, et al. Pharmacodynamic monitoring of RO5459072, a small molecule inhibitor of Cathepsin S. *Front Immunol* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00806>.
- [45] Seror R, Ravaud P, Bowman SJ, Baron G, Tzioufas A, Theander E, et al. EULAR Sjögren's syndrome disease activity index: development of a consensus systemic disease activity index for primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1103–9. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.110619>.

## Annexe 2. Score ESSDAI

### ESSDAI (Eular Sjögren Syndrome Disease Activity index)

Merci de COCHER la case correspondant au niveau d'activité de la maladie atteinte par atteinte.

Le score de chaque domaine se calcule en multipliant le poids du domaine par le niveau d'activité. Le score total est la somme de tous les domaines.

<b>SIGNES GENERAUX 3</b>		
<i>Attention : coter « absence d'activité » les signes généraux non liés à la maladie (fièvre d'origine infectieuse, perte de poids volontaire).</i>		
Absence d'activité [0]	Absence de signes généraux	<input type="checkbox"/>
Activité faible [1]	Fièvre (37.5° à 38.5°C) / sueurs nocturnes modérées ou intermittentes Amaigrissement involontaire (5 à 10%)	<input type="checkbox"/>
Activité modérée [2]	Fièvre importante (>38.5°C) / sueurs nocturnes abondantes Amaigrissement involontaire (>10%)	<input type="checkbox"/>

<b>LYMPHADENOPATHIES 4</b>		
Absence d'activité [0]	Absence d'adénopathie ou de splénomégalie	<input type="checkbox"/>
Activité faible [1]	- Adénopathies ≥1cm (ou ≥2cm dans la région inguinale)	<input type="checkbox"/>
Activité modérée [2]	- Adénopathies ≥2cm (ou ≥3cm dans la région inguinale) - Splénomégalie (cliniquement palpable ou à l'imagerie)	<input type="checkbox"/>
Activité élevée [3]	- Prolifération B maligne actuelle (lymphome, myélome, Waldenström.)	<input type="checkbox"/>

<b>ATTEINTE GLANDULAIRE 2</b>		
<i>Attention : ne pas coter les manifestations glandulaires non liées à la maladie (ex : lithiase, infection...)</i>		
Absence d'activité [0]	Absence d'hypertrophie glandulaire	<input type="checkbox"/>
Activité faible [1]	Hypertrophie glandulaire modérée, avec: - Parotidomégalie (≤ 3cm), - Ou hypertrophie modérée des glandes sous-mandibulaire et lacrymales	<input type="checkbox"/>
Activité modérée [2]	Hypertrophie glandulaire majeure, avec: - Parotidomégalie (>3cm) - ou importante hypertrophie des glandes sous-mandibulaire et lacrymales	<input type="checkbox"/>

<b>ATTEINTE ARTICULAIRE 2</b>		
<i>Attention : ne pas coter les manifestations articulaires non liées à la maladie (ex : arthrose...)</i>		
Absence d'activité [0]	Absence d'atteinte articulaire active	<input type="checkbox"/>
Activité faible [1]	Arthralgies des mains poignets chevilles ou pieds avec dérouillage matinal (>30 min)	<input type="checkbox"/>
Activité modérée [2]	De 1 à 5 synovites sur 28	<input type="checkbox"/>
Activité élevée [3]	≥ 6 synovites sur 28	<input type="checkbox"/>

<b>ATTEINTE CUTANEE 3</b>		
<i>Attention : coter « absence d'activité » les manifestations anciennes stables liées à des lésions séquellaires plutôt qu'à une activité de la maladie, ainsi que, les manifestations cutanées non liées à la maladie.</i>		
Absence d'activité [0]	Absence de manifestation cutanée active	<input type="checkbox"/>
Activité faible [1]	Erythème polymorphe	<input type="checkbox"/>
Activité modérée [2]	Vascularite cutanée limitée (y compris les vascularites urticariennes) ou purpura limité aux pieds et chevilles ou lupus cutané sub-aigu.	<input type="checkbox"/>
Activité élevée [3]	Vascularite cutanée diffuse (y compris vascularites urticariennes) ou purpura diffus ou ulcère lié à une vascularite.	<input type="checkbox"/>

### ATTEINTE PULMONAIRE 5

**Attention :** coter « absence d'activité » les manifestations anciennes stables liées à des lésions séquellaires plutôt qu'à une activité de la maladie, ainsi que les manifestations pulmonaires non liées à la maladie (ex : tabac...)

<b>Absence d'activité [0]</b>	Absence de manifestation pulmonaire active	<input type="checkbox"/>
<b>Activité faible [1]</b>	Toux persistante ou, atteinte bronchique sans anomalie à la radiographie standard. Ou atteinte interstitielle confirmée par l'imagerie : - Sans dyspnée, - Avec EFR normales	<input type="checkbox"/>
<b>Activité modérée [2]</b>	Atteinte pulmonaire modérément active: atteinte interstitielle confirmée au TDM (coupes fines) avec • Dyspnée d'effort (NHYA I, II) • Ou anomalies EFR limitées à : - 70% > DLCO ≥40% - ou 80% > CVF ≥ 60%	<input type="checkbox"/>
<b>Activité élevée [3]</b>	Atteinte pulmonaire très active: atteinte interstitielle confirmée au TDM (coupes fines) avec : • Dyspnée de repos (NHYA III, IV) • Ou anomalies EFR avec: - DLCO < 40% - Ou CVF < 60%	<input type="checkbox"/>

### ATTEINTE RENALE 5

**Attention :** coter « absence d'activité » les manifestations anciennes stables liées à des lésions séquellaires plutôt qu'à une activité de la maladie, ainsi que les manifestations néphrologiques non liées à la maladie (Si une biopsie rénale a été réalisée, ce sont les données histologiques qui doivent être prises en compte pour la cotation de l'activité)

<b>Absence d'activité [0]</b>	Absence d'atteinte rénale active: - Protéinurie < 0.5g/j, pas d'hématurie, pas de leucocyturie, pas d'acidose. - Ou protéinurie ou insuffisance rénale ancienne stable	<input type="checkbox"/>
<b>Activité faible [1]</b>	Atteinte rénale spécifique limitée à : • Acidose tubulaire sans insuffisance rénale • Atteinte glomérulaire : - avec protéinurie (entre 0.5 et 1 g/d) - sans hématurie et sans insuffisance rénale (DFG ≥ 60ml/min)	<input type="checkbox"/>
<b>Activité modérée [2]</b>	Atteinte rénale modérément active : • Acidose tubulaire avec insuffisance rénale (DFG < 60 ml/min) • Atteinte glomérulaire : - avec protéinurie (entre 0.5 et 1 g/d) - sans hématurie et sans insuffisance rénale (DFG ≥ 60ml/min) • Ou signes histologiques : - glomérulonéphrite extra membraneuse - infiltrat interstitiel important	<input type="checkbox"/>
<b>Activité élevée [3]</b>	Atteinte rénale très active : • Atteinte glomérulaire - avec protéinurie > 1.5 g/j - ou hématurie ou insuffisance rénale (GFR < 60 ml/min) • Ou signes histologiques de : - glomérulonéphrite proliférative - atteinte liée à une cryoglobulinémie	<input type="checkbox"/>

### ATTEINTE MUSCULAIRE 6

**Attention :** ne pas coter les manifestations musculaires non liées à la maladie (ex : myopathie cortisonique...)

<b>Absence d'activité [0]</b>	Absence d'atteinte musculaire active	<input type="checkbox"/>
<b>Activité faible [1]</b>	Myosite active avec preuve EMG ou histologique, et : - absence de faiblesse musculaire - ou élévation des CPK (N < CPK ≤ 2N)	<input type="checkbox"/>
<b>Activité modérée [2]</b>	Myosite modérément active avec preuve EMG ou histologique, et : - faiblesse (déficit maximal : 4/5), - ou élévation des CPK (2N < CK ≤ 4N),	<input type="checkbox"/>
<b>Activité élevée [3]</b>	Myosite très active avec preuve EMG ou histologique, et : - faiblesse (déficit ≤ 3/5) - ou élévation des CPK (>4N)	<input type="checkbox"/>

**ATTEINTE NEUROLOGIQUE PERIPHERIQUE 5**

**Attention :** coter « absence d'activité » les manifestations anciennes stables liées à des lésions séquellaires plutôt qu'à une activité de la maladie, ainsi que les manifestations neurologiques périphériques non liées à la maladie

<b>Absence d'activité [0]</b>	Absence d'atteinte neurologique périphérique active	<input type="checkbox"/>
<b>Activité faible [1]</b>	Atteinte neurologique périphérique faiblement active: - Neuropathie axonale sensitive pure (prouvée par l'ENMG) - Névralgie du Trijumeau (V)	<input type="checkbox"/>
<b>Activité modérée [2]</b>	Atteinte neurologique périphérique modérément active prouvée par l'ENMG - Neuropathie axonale sensitivo-motrice pure sans déficit moteur - Neuropathie axonale sensitive pure associée à une cryoglobulinémie - Ganglionopathie avec ataxie modérée - Polyradiculonévrite (PIDC) avec retentissement fonctionnel modéré (déficit moteur maximal 4/5 ou ataxie modérée) Atteinte des nerfs crâniens d'origine périphérique (sauf trijumeau (V))	<input type="checkbox"/>
<b>Activité élevée [3]</b>	Atteinte neurologique périphérique très active prouvée par l'ENMG - Neuropathie axonale sensitivo-motrice pure avec déficit moteur ≤ 3/5 - Atteinte neurologique périphérique liée à une vascularite (ex : mononévrite multiple...) - Ganglionopathie avec ataxie sévère - Polyradiculonévrite (PIDC) avec retentissement fonctionnel sévère (déficit moteur ≤ 3/5, ou ataxie sévère)	<input type="checkbox"/>

**ATTEINTE NEUROLOGIQUE CENTRALE 5**

**Attention :** coter « absence d'activité » les manifestations anciennes stables liées à des lésions séquellaires plutôt qu'à une activité de la maladie, ainsi que les manifestations neurologiques centrales non liées à la maladie.

<b>Absence d'activité [0]</b>	Absence d'atteinte neurologique centrale active	<input type="checkbox"/>
<b>Activité modérée [2]</b>	Atteinte neurologique centrale modérément active - atteinte des nerfs crâniens d'origine centrale - névrite optique - lésions de la substance blanche mimant une SEP entraînant des troubles sensitifs ou troubles cognitifs avérés.	<input type="checkbox"/>
<b>Activité élevée [3]</b>	Atteinte neurologique centrale très active - Vascularite cérébrale (par exemple AVC ou AIT) - convulsions - myélite transverse. - méningite lymphocytaire - lésions de la substance blanche mimant une SEP avec déficit moteur	<input type="checkbox"/>

**ATTEINTE HEMATOLOGIQUE 2**

**Attention :** - pour les anémies, les neutropénies et les thrombopénies, seules les cytopénies auto-immunes sont à prendre à compte. Ne pas coter les cytopénies non liées à la maladie (ex : carenciales, ou cytopénies liées aux traitements comme par exemple les lymphopénies induites par le cyclophosphamide)

<b>Absence d'activité [0]</b>	Absence de cytopénie auto-immune	<input type="checkbox"/>
<b>Activité faible [1]</b>	Cytopénie auto-immune avec: - neutropénie (1000 < neutrophiles < 1500/mm3) - ou anémie (10 < Hémoglobine < 12g/dl) - ou thrombocytopénie (100.000 < Plaquettes < 150.000/mm3) Ou lymphopénie (500 < lymphocytes < 1000/mm3)	<input type="checkbox"/>
<b>Activité modérée [2]</b>	Cytopénie auto-immune avec: - neutropénie (500 ≤ neutrophiles ≤ 1000/mm3), - ou anémie (8 ≤ Hémoglobine ≤ 10g/dl) - ou thrombocytopénie (50.000 ≤ Plaquettes ≤ 100.000/mm3) Ou lymphopénie (≤ 500/mm3)	<input type="checkbox"/>
<b>Activité élevée [3]</b>	Cytopénie auto-immune avec: - neutropénie (neutrophiles < 500/mm3), - ou anémie (Hémoglobine < 8 g/dl) - ou thrombocytopénie (Plaquettes < 50.000/mm3),	<input type="checkbox"/>

**DOMAINE BIOLOGIQUE 1**

<b>Absence d'activité [0]</b>	Absence des signes biologiques (se trouvant aux niveaux d'activité faible et modérée)	<input type="checkbox"/>
<b>Activité faible [1]</b>	- composant monoclonal - ou hypocomplémentémie (C4 ou C3 ou CH50 bas) - ou hypergammaglobulinémie ou taux d'IgG compris entre 16 et 20 g/L	<input type="checkbox"/>
<b>Activité modérée [2]</b>	- présence d'une cryoglobulinémie - ou hypergammaglobulinémie ou taux d'IgG > 20 g/L - ou apparition d'une hypogammaglobulinémie (<5 g/L)	<input type="checkbox"/>

### *Annexe 3. Score ESSPRI*

Echelle visuelle numérique patient (EVN) **sécheresse globale** :

Pas de sécheresse	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Sécheresse maximale imaginable
-------------------	------------------------	--------------------------------

EVN **fatigue** :

Pas de fatigue	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Fatigue très intense
----------------	------------------------	----------------------

EVN **douleur** :

Pas de douleur	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Douleur maximale imaginable
----------------	------------------------	-----------------------------

Score ESSPRI (moyenne des 3 EVN) :|\_\_|\_\_|

## Annexe 4. Score clinESSDAI

### Constitutional domain

Domain	Activity level	Description
<b>Constitutional</b>	No	Absence of the following symptoms
<i>Exclusion of fever of infectious origin and voluntary weight loss</i>	Low	Mild or intermittent fever (37.5°-38.5°C) / night sweats and/or involuntary weight loss of 5 to 10% of body weight
	Moderate	Severe fever (>38.5°C) / night sweats and/or involuntary weight loss of >10% of body weight

### Lymphadenopathy and lymphoma domain

Domain	Activity level	Description
<b>Lymphadenopathy and lymphoma</b>	No	Absence of the following features
<i>Exclusion of infection</i>	Low	Lymphadenopathy $\geq 1$ cm in any nodal region or $\geq 2$ cm in inguinal region
	Moderate	Lymphadenopathy $\geq 2$ cm in any nodal region or $\geq 3$ cm in inguinal region, and/or splenomegaly (clinically palpable or assessed by imaging)
	High	Current malignant B-cell proliferative disorder

### Glandular domain

Domain	Activity level	Description
<b>Glandular</b>	No	Absence of glandular swelling
<i>Exclusion of stone or infection</i>	Low	Small glandular swelling with enlarged parotid ( $\leq 3$ cm), or limited submandibular ( $\leq 2$ cm) or lachrymal swelling ( $\leq 1$ cm)
	Moderate	Major glandular swelling with enlarged parotid ( $> 3$ cm), or important submandibular ( $> 2$ cm) or lachrymal swelling ( $> 1$ cm)

### Articular domain

Domain	Activity level	Description
<b>Articular</b>	No	Absence of currently active articular involvement
<i>Exclusion of osteoarthritis</i>	Low	Arthralgias in hands, wrists, ankles and feet accompanied by morning stiffness (>30 min)
	Moderate	1 to 5 (of 28 total count) synovitis
	High	$\geq 6$ (of 28 total count) synovitis

### Cutaneous domain

Domain	Activity level	Description
<b>Cutaneous</b>	No	Absence of currently active cutaneous involvement
<i>Rate as "No activity" stable long-lasting features related to damage</i>	Low	Erythema multiforma
	Moderate	Limited cutaneous vasculitis, including urticarial vasculitis, or purpura limited to feet and ankle, or subacute cutaneous lupus
	High	Diffuse cutaneous vasculitis, including urticarial vasculitis, or diffuse purpura, or ulcers related to vasculitis

### Pulmonary domain

Domain	Activity level	Description
<b>Pulmonary</b> <i>Rate as "No activity" stable long-lasting features related to damage, or respiratory involvement not related to the disease (tobacco use etc.)</i>	No	Absence of currently active pulmonary involvement
	Low	Persistent cough due to bronchial involvement with no radiographic abnormalities on radiography Or radiological or HRCT evidence of interstitial lung disease with: No breathlessness and normal lung function test.
	Moderate	Moderately active pulmonary involvement, such as interstitial lung disease shown by HRCT with shortness of breath on exercise (NHYA II) or abnormal lung function tests restricted to: 70% >DL <sub>CO</sub> ≥ 40% or 80%>FVC≥60%
	High	Highly active pulmonary involvement, such as interstitial lung disease shown by HRCT with shortness of breath at rest (NHYA III, IV) or with abnormal lung function tests: DL <sub>CO</sub> < 40% or FVC< 60%

HRCT: high resolution computed tomography; NYHA: New York Heart Association; FVC: Forced Vital Capacity

### Renal domain

Domain	Activity level	Description
<b>Renal</b> <i>Rate as "No activity" stable long-lasting features related to damage, and renal involvement not related to the disease. If biopsy has been performed, please rate activity based on <b>histological</b> features first</i>	No	Absence of currently active renal involvement with proteinuria< 0.5 g/d, no hematuria, no leucocyturia, no acidosis, or long-lasting stable proteinuria due to damage
	Low	Evidence of mild active renal involvement, limited to tubular acidosis without renal failure or glomerular involvement with proteinuria (between 0.5 and 1 g/d) and without hematuria or renal failure (GFR ≥60 ml/min)
	Moderate	Moderately active renal involvement, such as tubular acidosis with renal failure (GFR <60 ml/min) or glomerular involvement with proteinuria between 1 and 1.5 g/d and without hematuria or renal failure (GFR ≥60 ml/min) or histological evidence of extra-membranous glomerulonephritis or important interstitial lymphoid infiltrate
	High	Highly active renal involvement, such as glomerular involvement with proteinuria >1.5 g/d or hematuria or renal failure (GFR <60 ml/min), or histological evidence of proliferative glomerulonephritis or cryoglobulinemia related renal involvement

GFR: glomerular filtration rate

### Muscular domain

Domain	Activity level	Description
<b>Muscular</b> <i>Exclusion of weakness due to corticosteroids</i>	No	Absence of currently active muscular involvement
	Low	Mild active myositis shown by abnormal EMG, MRI* or biopsy with no weakness and creatine kinase (N ≤CK ≤ 2N)
	Moderate	Moderately active myositis proven by abnormal EMG, MRI* or biopsy with weakness (maximal deficit of 4/5), or elevated creatine kinase (2N <CK ≤4N),
	High	Highly active myositis shown by abnormal EMG, MRI* or biopsy with weakness (deficit ≤ 3/5) or elevated creatine kinase (>4N)

EMG= electromyogram; MRI= magnetic resonance imaging

### Peripheral nervous system domain

Domain	Activity level	Description
<b>Peripheral Nervous system</b> <i>Rate as "No activity" stable long-lasting features related to damage or PNS involvement not related to the disease</i>	No	Absence of currently active PNS involvement
	Low	Mild active peripheral nervous system involvement, such as pure sensory axonal polyneuropathy shown by NCS or trigeminal (V) neuralgia <i>* Proven small fibre neuropathy</i>
	Moderate	Moderately active peripheral nervous system involvement shown by NCS, such as axonal sensory-motor neuropathy with maximal motor deficit of 4/5, pure sensory neuropathy with presence of cryoglobulinemic vasculitis, ganglionopathy with symptoms restricted to mild/moderate ataxia, inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) with mild functional impairment (maximal motor deficit of 4/5 or mild ataxia), Or cranial nerve involvement of peripheral origin (except trigeminal (V) neuralgia)
	High	Highly active PNS involvement shown by NCS, such as axonal sensory-motor neuropathy with motor deficit $\leq 3/5$ , peripheral nerve involvement due to vasculitis (mononeuritis multiplex etc.), severe ataxia due to ganglionopathy, inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) with severe functional impairment: motor deficit $\leq 3/5$ or severe ataxia

NCS: Nerve conduction study

### Central nervous system domain

Domain	Activity level	Description
<b>Central Nervous System</b> <i>Rate as "No activity" stable long-lasting features related to damage or CNS involvement not related to the disease</i>	No	Absence of currently active CNS involvement
	Moderate	Moderately active CNS features, such as cranial nerve involvement of central origin, optic neuritis or multiple sclerosis-like syndrome with symptoms restricted to pure sensory impairment or proven cognitive impairment
	High	Highly active CNS features, such as cerebral vasculitis with cerebrovascular accident or transient ischemic attack, seizures, transverse myelitis, lymphocytic meningitis, multiple sclerosis-like syndrome with motor deficit.

### Hematological domain

Domain	Activity level	Description
<b>Hematological</b> <i>For anemia, neutropenia, and thrombopenia, only auto-immune cytopenia must be considered Exclusion of vitamin or iron deficiency, drug-induced cytopenia</i>	No	Absence of auto-immune cytopenia
	Low	Cytopenia of auto-immune origin with neutropenia ( $1000 < \text{neutrophils} < 1500/\text{mm}^3$ ), and/or anemia ( $10 < \text{hemoglobin} < 12 \text{ g/dl}$ ), and /or thrombocytopenia ( $100,000 < \text{platelets} < 150,000/\text{mm}^3$ ) Or lymphopenia ( $500 < \text{lymphocytes} < 1000/\text{mm}^3$ )
	Moderate	Cytopenia of auto-immune origin with neutropenia ( $500 \leq \text{neutrophils} \leq 1000/\text{mm}^3$ ), and/or anemia ( $8 \leq \text{hemoglobin} \leq 10 \text{ g/dl}$ ), and/or thrombocytopenia ( $50,000 \leq \text{platelets} \leq 100,000/\text{mm}^3$ ) Or lymphopenia ( $\leq 500/\text{mm}^3$ )
	High	Cytopenia of auto-immune origin with neutropenia ( $\text{neutrophils} < 500/\text{mm}^3$ ), and/or or anemia ( $\text{hemoglobin} < 8 \text{ g/dl}$ ) and/or thrombocytopenia ( $\text{platelets} < 50,000/\text{mm}^3$ )

### Biological domain

Domain	Activity level	Description
<b>Biological</b>	No	Absence of any of the following biological feature
	Low	Clonal component and/or hypocomplementemia (low C4 or C3 or CH50) and/or hypergammaglobulinemia or high IgG level between 16 and 20 g/L
	Moderate	Presence of cryoglobulinemia and/or hypergammaglobulinemia or high IgG level $> 20 \text{ g/L}$ , and/or recent onset hypogammaglobulinemia or recent decrease of IgG level ( $< 5 \text{ g/L}$ )

**Renaud FELTEN**  
**Identification de  
nouvelles cibles  
thérapeutiques au  
cours du syndrome de  
Gougerot-Sjögren  
primitif (SJp)**

## Résumé

L'objectif de cette thèse était d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans le syndrome de Sjögren primitif (SJp). Par nos 3 approches variées mais complémentaires, nous avons été en mesure de confirmer l'intérêt de cibler BAFF, une molécule cruciale pour la survie et l'activation des LB, combiné à une déplétion B. Cette efficacité passe, au moins en partie, par l'accumulation de Trég. Notre étude de repositionnement thérapeutique, basée sur une analyse transcriptomique, a permis de confirmer l'intérêt de cibler les interférons dans le SJp. Elle a également identifié de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques, les HDAC et les PI3K. Enfin, notre recherche de nouveaux acteurs potentiellement impliqués dans la physiopathologie du SJp nous a mené vers les innate lymphoid cells (ILC). A l'instar des Trég, cette population cellulaire rare et longtemps méconnue pourrait jouer un rôle pathogène important. Nos résultats suggèrent que les ILC3 pourraient être à l'origine de la mise en place des infiltrats lymphocytaires au sein des glandes salivaires. Ainsi, ce travail complète notre connaissance de la physiopathologie du SJp et ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques.

**Mots-clés** : Sjögren's syndrome ; souris NOD ; BAFF ; Repositionnement thérapeutique ; Interféron ; ILC

## Résumé en anglais

The aim of this thesis was to identify new therapeutic targets in primary Sjögren's syndrome (pSS). Using our 3 varied but complementary approaches, we were able to confirm the value of targeting BAFF, a molecule that is crucial for the survival and activation of B cells, combined with B depletion. Our drug repurposing study, based on transcriptomic analysis, confirmed the value of targeting interferons in pSS. It also identified potential new therapeutic targets, HDACs and PI3Ks. Finally, our search for new actors potentially involved in the pathophysiology of pSS led us to innate lymphoid cells (ILCs). Like Tregs, this rare and long-ignored cell population could play an important pathogenic role. Our results suggest that ILC3 may be responsible for the development of lymphocytic infiltrates in the salivary glands. This work adds to our knowledge of the pathophysiology of pSS and opens up new therapeutic prospects.

**Keywords**: Sjögren's syndrome; NOD mice; BAFF; Drug repurposing; Interferon; ILC