

UNIVERSITÉ SORBONNE PARIS NORD
UFR SANTE MEDECINE BIOLOGIE HUMAINE
ECOLE DOCTORALE GALILÉE

THÈSE DE DOCTORAT DE BIOLOGIE
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Menée au sein du Laboratoire INSERM UMR U1272 « Hypoxie et Poumon »

Soutenue publiquement le 26 Juin 2024 par

Thinhinane ISKOUNEN

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR

La voie JAK/STAT : cible potentielle dans le traitement de la sarcoïdose

Directrice du laboratoire : Pr Carole Planès

Directrice de thèse : Pr Valérie Besnard

Co-directrice : Pr Carole Planès

Membres du jury :

Pr Nadia Nathan : Rapporteur

Dr Philippe Gosset : Rapporteur

Pr Natacha Bessis : Examinatrice

Pr Philippe Bonniaud : Examineur

Pr Valérie Besnard : Directrice de thèse

Pr Carole Planès : Co-directrice de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer travail de ma thèse : Pr Nadia Nathan, Dr Philippe Gosset, Pr Natacha Bessis et Pr Philippe Bonniaud.

Je remercie l'école doctorale Galilée pour m'avoir octroyé une bourse de thèse de trois ans, ce qui m'a permis de mener à bien mes recherches dans des conditions favorables.

Je remercie grandement la directrice de l'unité de recherche U1272, le **Pr Carole Planès**, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée et votre bienveillance.

Je tiens à remercier particulièrement le **Pr Valérie Besnard** pour son soutien continu tout au long de ma thèse. Sa disponibilité, son écoute et ses encouragements constants ont été d'une aide précieuse. Durant ces années, elle a su me guider à travers chaque étape, que ce soit dans l'aspect technique, scientifique, ou rédactionnel de mon travail.

J'adresse mes sincères remerciements au **Pr Jean-François Bernaudin**, au **Pr Dominique Valeyre** et au **Dr Florence Jeny** pour leur précieuse aide et leurs encouragements tout au long de ma thèse. Je leur suis reconnaissante pour leur générosité, et j'ai eu de la chance de pouvoir travailler à leurs côtés et de bénéficier de la richesse de leurs connaissances, en particulier sur la sarcoïdose.

Je remercie chaleureusement le Dr Triba Mohamed Nawfal de m'avoir formé et aidé à réaliser les analyses statistiques.

Je remercie infiniment notre ingénieur de laboratoire Olivia Frenoy pour son aide précieuse dans la réalisation des analyses in vitro.

Je suis reconnaissante envers le Dr Marianne Kambouchner pour son engagement envers ce projet et pour avoir facilité sa réalisation en fournissant les échantillons biologiques nécessaires.

Je remercie tous les membres actuels et anciens de l'unité U1272 : Hilario Nunes, Emilie Boncoeur, Nicolas Voituren, Nicolas Dard, Alexandre Guimard, François Lhuissier, Maria-Luisa Pérez Lozano, Dominique Marchant, Emmanuel Martinod, Patricia Quidu, Jean-Paul Richalet, Lucile Sesé, Emeline Saindoy, Annie Sadoun, Maryem Bezine. Merci à vous tous pour l'accueil, vos conseils, je suis reconnaissante d'avoir pu travailler à vos côtés. Je remercie spécialement les étudiants et « thésards » avec qui j'ai échangé avec beaucoup de plaisir pendant ces années et les remercie pour toute leur aide : Raphael Hindre, Abdallah Fergani, Liasmine Haine, Hivda Yegen, Dana Radu, Ilaria Onorati, Leaticia Bakour, Zakaria Maakoul.

Je remercie les ingénieurs de plateformes, Roxane Hervé pour toutes les formations en microscopie et Odile Sainte-catherine pour son aide et sa disponibilité au sein de la plateforme d'histologie TisCel 13.

Je remercie tous les patients et les « témoins » qui ont participé à cette étude.

Je suis reconnaissante envers mes anciens encadrants et enseignants, qui ont éveillé en moi le désir de poursuivre une thèse ou m'ont encouragé à le faire : Pr Karim Houali, Dr Saliha Zennia-Si Ahmed, Dr Marie-Louise Fremond, Dr Denis Lesage.

Un grand merci à ma famille pour son soutien au quotidien aussi moral que financier.

Je tiens aussi à remercier mes chères amies : Amelia, Lina, Sassia, Sonia, Yasmine pour leur sens de l'écoute, leur soutien et leurs encouragements.

Je remercie enfin mon conjoint pour son soutien inconditionnel, sa confiance et sa présence réconfortante.

Table des matières

Remerciements.....	1
Liste des figures	6
Liste des tableaux	7
Liste des abréviations.....	8
Introduction	11
1 La sarcoïdose.....	11
1.1 Définition de la sarcoïdose.....	11
1.2 Epidémiologie.....	11
1.3 Aspects cliniques	13
1.3.1 <i>Diagnostic</i>	15
1.3.2 <i>Activité de la maladie</i>	16
1.3.3 <i>Marqueurs cliniques</i>	17
1.3.4 <i>Marqueurs biologiques</i>	17
1.3.5 <i>Imagerie</i>	18
1.4 Evolution de la maladie.....	19
1.4.1 <i>Histoire naturelle et pronostic</i>	19
1.4.2 <i>Morbi/mortalité</i>	19
1.5 Etiologie de la maladie.....	20
1.5.1 <i>Facteurs génétiques</i>	20
1.5.2 <i>Facteurs environnementaux</i>	22
1.6 Traitements	24
1.7 Introduction sur les voies de signalisation dans la sarcoïdose : [mTOR et inflammasome]	27
2 Le granulome sarcoïdien.....	28
2.1 Généralités sur les granulomes	28
2.2 Le granulome sarcoïdien, particularités histologiques.....	29
2.3 Dynamique de formation et physiopathologie du granulome sarcoïdien.....	30
2.3.1 <i>Les acteurs cellulaires</i>	30
2.3.2 <i>Formation du granulome</i>	36
2.3.3 <i>Évolution fibrosante</i>	40
3 La voie de signalisation JAK/STAT.....	42
3.1 Cytokines et leurs récepteurs	42
3.2 Les Janus kinases (Jaks).....	43

3.2.1	<i>Structure</i>	43
3.2.2	<i>Fonction</i>	46
3.3	Les STATs (<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>)	51
3.3.1	<i>Structure</i>	51
3.3.2	<i>Fonction</i>	53
3.4	La voie JAK/STAT dans les cellules immunitaires	57
3.5	Activation de la voie canonique JAK/STAT	60
3.6	Régulation négative de la voie canonique JAK/STAT	61
3.7	La voie non canonique	64
3.7.1	<i>La voie non canonique pour les JAKs</i>	64
3.7.2	<i>La voie non canonique pour les STATs</i>	69
3.8	Inhibiteurs de la voie JAK/STAT	69
3.8.1	<i>Cytokines recombinantes et anticorps anti-cytokines ou récepteurs</i>	70
3.8.2	<i>Inhibiteurs de JAK</i>	71
3.8.3	<i>Inhibiteurs de STATs</i>	73
4	La voie JAK/STAT dans la sarcoïdose	74
4.1	Preuves de l'implication de la voie JAK/STAT dans la sarcoïdose	74
4.2	Inhibiteurs de JAKs dans la sarcoïdose	75
	Hypothèse et objectifs généraux du travail de thèse	77
	Matériels et Méthodes	78
1	Considérations éthiques et réglementaires	78
1.1	Biopsies humaines	78
1.2	Prélèvements sanguins humains	79
2	Etude histologique et immunochimique	79
2.1	Préparation des échantillons	79
2.1.1	<i>Culture des lymphocytes circulants</i>	79
2.1.2	<i>Tissus humains</i>	80
2.2	Colorations histologiques	80
2.2.1	<i>Déparaffinage et réhydratation des coupes histologiques</i>	80
2.2.2	<i>Coloration Hématoxyline Eosine (HE)</i>	80
2.2.3	<i>Coloration Trichrome de Masson</i>	80
2.3	Immuno-histochimie/cytochimie	81
2.4	Hyperion	82
3	Etude morphométrique	82
1.1	Classification des granulomes	82
1.2	Quantifications	84

1.2.1	<i>Distribution des stades de granulomes.....</i>	84
1.2.2	<i>Niveau d'expression.....</i>	84
1.2.3	<i>Scores d'expression.....</i>	85
4	Culture cellulaire.....	85
4.1	Isolement des lymphocytes.....	85
4.2	Stimulation.....	85
5	Etudes protéiques.....	85
5.1	Préparation des échantillons.....	86
5.2	Western blot.....	86
6	Etude Statistiques.....	87
6.1	Analyses univariées.....	87
6.2	Analyse multivariée : la régression PLS.....	87
	Résultats.....	88
1	Article.....	88
2	Complément d'article.....	118
2.1	Caractérisation des cellules constituant le granulome.....	118
2.2	La voie JAK/STAT dans les biopsies rénales.....	121
2.3	Scores d'expression de la voie JAK/STAT.....	122
2.4	La voie JAK/STAT dans les biopsies multiorganes.....	123
2.5	La voie JAK/STAT dans les lymphocytes circulants.....	124
	Discussion générale et perspectives.....	127
1	Comparaison entre la composition du granulome caractérisée VS celle décrite dans la littérature.....	127
2	Détection de pJAK2 nucléaire dans les lymphocytes du granulome et cellules environnantes	128
3	Détection de la voie canonique JAK/STAT dans les cellules CD68+ dans le granulome....	130
4	Association entre pJAK2, les STATs et la sévérité de la sarcoïdose.....	131
5	Détection de la voie canonique JAK/STAT dans les lymphocytes circulants des patients .	132
6	Perspectives.....	133
	Conclusion.....	136
	Références bibliographiques.....	137
	Résumé.....	168
	Abstract.....	169

Liste des figures

Figure 1 : Cartes représentant la prévalence et l'incidence de la sarcoïdose à travers le monde pour 100 000 habitants	13
Figure 2 : Principales manifestations d'organe de la sarcoïdose	15
Figure 3 : Représentation schématique des types des exemples des types de granulomes existants et de leurs constituants cellulaires	29
Figure 4 : Histologie des granulomes de sarcoïdose	30
Figure 5 : Cellules immunitaires impliquées dans la sarcoïdose	31
Figure 6 : Représentation schématique de la morphologie des différents éléments du système phagocytaire mononucléé	33
Figure 7 : Aperçu des biomarqueurs sériques et liquides du LBA, produits par les cellules immunitaires au cours du développement du granulome de sarcoïdose	37
Figure 8 : Représentation schématique des cytokines activant la voie JAK/STAT	43
Figure 9 : Structure des Janus kinase (JAK)	44
Figure 10 : Structure des protéines STAT	51
Figure 11 : Signatures JAK/STAT impliquées dans la différenciation des macrophages et des LT helper	59
Figure 12 : Activation canonique de la voie de signalisation JAK/STAT	61
Figure 13 : Régulation négative de la voie de signalisation JAK/STAT	64
Figure 14 : Voies canonique et non canonique de la signalisation de l'IFN γ	67
Figure 15 : Rôles des JAKs dans le noyau	68
Figure 16 : Cibles thérapeutiques de la voie de signalisation JAK/STAT	70
Figure 17 : Rémission histologique de la sarcoïdose après traitement par le tofacitinib	76
Figure 18 : Suivi histologique du test de Kveim	83
Figure 19 : Cartographie d'une coupe de biopsie cutanée d'un patient atteint de sarcoïdose	84
Figure 20 : Caractérisation de l'environnement tissulaire et la composition cellulaire du granulome sarcoïdien par Hyperion	120
Figure 21 : Expression de pJAK2, pSTAT1 et pSTAT5 dans les granulomes des biopsies rénales	122
Figure 22 : Variabilité des signatures selon les organes touchés chez les mêmes patients	124
Figure 23 : Activation de JAK2 dans les lymphocytes circulants des patients atteints de sarcoïdose	125
Figure 24 : Activation de STAT1 dans les lymphocytes circulants des patients atteints de sarcoïdose	126

Liste des tableaux

Tableau 1. Stades radiologiques de la sarcoïdose pulmonaire et pronostic _____	14
Tableau 2. Résumé des phénotypes engendrés à la suite de l'inactivation des gènes codant pour les kinases JAKs _____	50
Tableau 3. Résumé des phénotypes engendrés à la suite de l'inactivation des STATs, ainsi que les fonctions biologiques générées par leurs activations _____	57
Tableau 4 : Rôles de la voie JAK/STAT dans les cellules immunitaires _____	59
Tableau 5. Inhibiteurs de JAKs approuvés, leurs cibles et applications cliniques _____	73
Tableau 6 : Résumé de la répartition des populations cellulaires au sein du granulome _____	121
Tableau 7 : Scores d'expression exprimé en pourcentage de pJAK2, pSTAT1, pSTAT3 et pSTAT5 dans les granulomes des biopsies analysées _____	123
Tableau 8 : Niveaux d'expression de pJAK2, pSTAT1, pSTAT3 et pSTAT5 dans deux organes (biopsies) provenant des mêmes patients _____	124

Liste des abréviations

18F-FDG : 18-FluoroDésoxyGlucose

ABCG1 : transporteur ABC du cholestérol régulé

ACCESS : a case control etiologic study of sarcoidosis

ANXA11 : annexin A11

ATP : adenosine triphosphate

BAFF : B-cell activating factor

Bax : Bcl2-associated X protein

BTNL-2 : butyrophilin-like 2

BMP : bone morphogenic protein

CCD : coiled-coil domain

CCL : C-C chemokine ligand

CCR : C-C chemokine receptor

CD : cluster of differentiation

CGM : cellules géantes multinucléées

CIS : cytokine-Inducible SH2 containing protein

CNTF : ciliary neurotrophic factor

COS : clinical outcome status

CPA : cellules présentatrices d'antigène

CT-1 : cardiotrophin-1

CTAS : computed tomography activity score

CTO : chitotriosidase

CVF : capacité vitale forcée

CXCR : C-X-C chemokine receptor

DBD : DNA-binding domain

DLCO : diffusion pulmonaire au monoxyde de carbone

ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine

EMA : european medicins agency

EPO : erythropoietin

ePOST : Extrapulmonary Physician Organ Severity Tool

ESAT-6 : 6-kDa early secretory antigenic target

Fas : Fas cell surface death receptor

FERM : four-point-one/ezrin/radixin/meosin

FDA : food and drug administration

FGF : fibroblast growth factor

FOXP3 : forkhead box P3

GAS : interferon-gamma-activated site

GATA3 : GATA binding protein 3

GH : growth hormone

gH2AX : gamma-histone 2AX

GLUT : glucose transporter

GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

gp130 : glycoprotéine 130

GRE : glucocorticoid response element

GREM1 : gremlin 1

GSN : granulomatose sarcoïdique nécrosante

H2O2 : peroxyde d'hydrogène

HE : hématoxyline-eosine

HGF : hepatocyte growth factor

HIF : hypoxia inducible factor

HLA : human leukocyte antigen

HP1 α : protéine d'hétérochromatine 1 α
Hsp70/Hsc70 : heat shock 70kDa protein/heat shock cognate 70kDa protein
ICOS : inducible T cell costimulator
ICOSL : inducible T cell costimulator ligand
IFNg : interferon gamma
IgA : immunoglobuline A
IkB : inhibitor of nuclear factor kappa B
IKK : IkB kinase
IL : interleukine
iMCD : castleman multicentrique idiopathique
IRAK2 : interleukin-1 receptor-associated kinase 2
IRF9 : interferon regulatory factor 9
JAK : janus kinase
JH : JAK homology
KIR : kinase inhibitory region
LBA : lavage broncho-alvéolaire
LCT : lymphome cutané à cellules T
lmo : LIM domain only2
MAPK : mitogen activated protein kinase
MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1
MEP50 : protéine 50 du méthylosome
MIP : macrophage inflammatory protein
mKatG : mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase
MMP : matrix metallo-proteinase
mSODA : mycobacterium superoxide dismutase A peptide
MSP : macrophage stimulating protein
mTOR : mechanistic target of rapamycin
N-CoR : nuclear receptor corepressor

NF1-C2 : neurofibromine 1 domaine C-terminal 2
NFAT : nuclear factor of activated T-cells
NF- κ B : nuclear factor-kappa-B
NK : natural Killer
NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
Nmi : N-Myc interactor
NOD2 : nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
Noxa : Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
OSM : oncostatin M
P21 : cyclin-dependent kinase inhibitor 1
PA : propionibacterium acnes
PAI-1 : plasminogen activator inhibitor-1
PAMP : pathogen associated molecular patterns
PBMC : peripheral blood mononuclear cells
PBS : phosphate buffered saline
PD-1 : programmed death 1
PD-L1 : programmed death-ligand 1
PDGF : platelet-derived growth factor
PFA : paraformaldehyde
PIAS : protein inhibitor of activated STATs
PR : polyarthrite rhumatoïde
PRL : prolactin
PRMT5 : arginine méthyltransférase 5
PTP : protein tyrosin phosphatase
Ran : Ras-related nuclear protein
RANTES : regulated on activation, normal T cell expressed and secreted

RING : really interesting new gene-finger

RIP2 : receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2

ROR γ t : retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t

RPMI : roswell park memorial institute medium

SAA : serum amyloid A

SAP : scaffold attachment factor A/B, acinus, and PIAS

SCID : severe combined immunodeficiency

SH2 : src homology domain 2

sIL-2R : soluble interleukin 2 receptor

SMART : silencing mediator of retinoic acid and an thyroid hormone receptor

SOCS : suppressor of cytokine signaling

STAT : signal transducer and activator of transcription

STING : stimulator of interferon genes

SUMO : small ubiquitin-related modifier

SVF : sérum de veau fœtal

TA : température ambiante

TAD : transactivation domain

T-bet : T-box expressed in T cells

TBS : Tris-buffered saline

TC-PTP : T-cell protein tyrosin phosphatase

TCR : récepteur des cellules

TDM : tomodensitométrie

TEP : tomographie par émission de positons

Tfh : T follicular helper cells

TGF- β : transforming growth factor beta 1

Th : T helper

TLR : toll like receptor

TNF- α : tumor necrosis factor alpha

TPO : thrombopoietin

TYK2 : tyrosine kinase 2

VAL-4 : α 4- β 1 integrin

VEGF : vascular endothelial growth factor

WASOG : world association of sarcoidosis and other granulomatous disorders

Introduction

1 La sarcoïdose

1.1 Définition de la sarcoïdose

La sarcoïdose est une maladie inflammatoire caractérisée par la formation de granulomes dits « immuns » dans les organes atteints, préférentiellement le poumon et le système lymphatique (Hunninghake et al., 1999). Malgré sa longue histoire, cette granulomatose reste énigmatique. L'étiologie non identifiée et la nature multisystémique de la maladie l'ont rendue plus complexe. Le premier cas de sarcoïdose a été rapporté en 1878 par Jonathan Hutchinson au King's College Hospital de Londres (Royaume-Uni). En 1889, Ernest Besnier a décrit les caractéristiques cutanées de la sarcoïdose chronique comme étant le lupus pernio. Plus tard, Caesar Boeck a utilisé le terme sarkoïde (sarcoïde) pour la première fois lorsqu'il a supposé que ces lésions étaient similaires au sarcome, mais bénignes. En 1923 le premier cas de sarcoïdose familiale a été enregistré chez deux sœurs atteintes (Young et al., 1984).

1.2 Epidémiologie

La sarcoïdose est une affection ubiquitaire, dont l'épidémiologie est difficile à déterminer précisément en raison du caractère latent de nombreuses atteintes, et d'une grande variabilité de présentation clinique. De nombreux facteurs épidémiologiques influencent la survenue et le phénotype de la sarcoïdose à savoir le sexe, l'âge, l'ethnie, l'origine géographique, les expositions environnementales, et certains facteurs de prédisposition génétique (Brito-Zerón et al., 2019)

La prévalence de la sarcoïdose varie considérablement selon l'origine géographique, de 1 à 5 pour 100 000 habitants en Asie (Corée du Sud, à Taïwan et au Japon) (Pietinalho et al., 1995; Wu et al., 2017; Yoon et al., 2018) à 140 à 160 pour 100 000 habitants en Suède et au Canada (Arkema et al., 2016; Fidler et al., 2019) (Figure 1). Il est fréquemment mentionné que l'incidence est plus élevée dans les pays scandinaves, mais il convient de souligner qu'il n'y a eu aucune estimation de pays scandinaves autre que la Suède au cours des 20 dernières années

(Arkema et al., 2016). Selon les données du registre national de la Suède, l'incidence de la sarcoïdose était de 11,5 pour 100 000 habitants/an (Arkema et al., 2016), ce qui est légèrement supérieur aux estimations des États-Unis (environ 8 à 11 pour 100 000 habitants/an (Baughman et al., 2016)). L'incidence et la prévalence de la sarcoïdose les plus élevées aux États-Unis sont systématiquement observées chez les Noirs non hispaniques (Wills et al., 2018). En France, la sarcoïdose est considérée comme une maladie rare, avec une prévalence estimée à près de 30/100 000 habitants et une incidence de 4,9/100 000/an (Duchemann et al., 2017).

La survenue de la sarcoïdose varie considérablement selon l'âge et le sexe. La maladie peut survenir aussi bien chez l'homme que chez la femme, 70 % des patients étant âgés de 25 à 45 ans. Cependant, en Europe et au Japon, un deuxième pic d'incidence péri-ménopausique se produit chez les femmes de plus de 50 ans (Costabel et al., 1999). Dans certaines populations, il existe une différence d'âge de 10 ans au moment du diagnostic entre les hommes et les femmes (Arkema and Cozier, 2018).

La sarcoïdose est habituellement sporadique, mais elle peut également être associée à des antécédents familiaux dans 3,6 à 9,6 % des cas. Les frères et sœurs d'un patient ont un risque plus élevé de sarcoïdose que les parents, ce qui suggère un mode d'hérédité récessif à pénétrance incomplète. Une augmentation de 80 fois du risque chez les jumeaux monozygotes appuie l'idée que les facteurs génétiques pourraient expliquer les deux tiers de la susceptibilité à la maladie. L'analyse des facteurs socio-économiques et des habitudes de vie des patients a mis en évidence une corrélation entre l'appartenance à un milieu défavorisé ou l'obésité et une augmentation probable du risque de sarcoïdose. Cette augmentation du risque peut être attribué à un contexte pro-inflammatoire associé à ces conditions (Dehara et al., 2023; Harper et al., 2020).

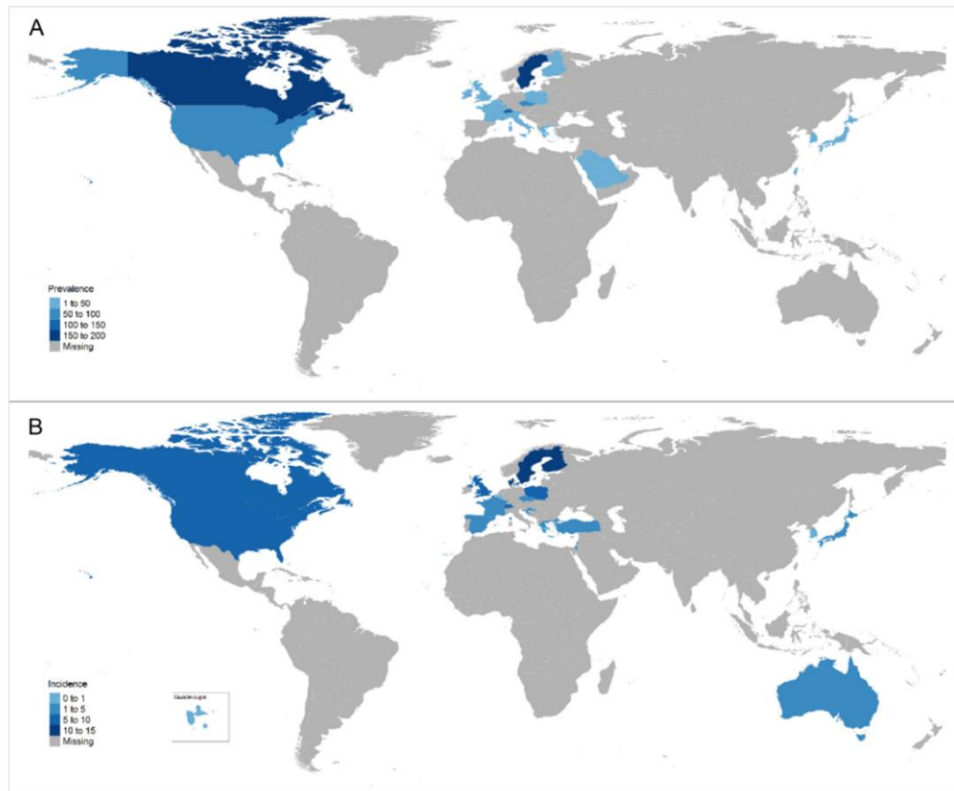


Figure 1 : Cartes représentant la prévalence et l'incidence de de la sarcoïdose à travers le monde pour 100 000 habitants. Données reportées depuis 1990. Adapté de (Arkema and Cozier, 2020)

1.3 Aspects cliniques

Sarcoïdose pulmonaire

Dans la sarcoïdose, les organes les plus fréquemment affectés sont les poumons et les ganglions lymphatiques intrathoraciques, touchant plus de 90 % de patients (Baughman et al., 2001; Mañá et al., 2017). La sarcoïdose pulmonaire peut être classée en quatre stades (Scadding, 1961) (Tableau 1). Les symptômes courants incluent la toux, la dyspnée et une oppression thoracique. Cependant, près de la moitié des patients atteints de sarcoïdose pulmonaire sont asymptomatique, en particulier ceux au stade I. Le pronostic global de la sarcoïdose pulmonaire est favorable, avec une régression spontanée des anomalies radiographiques observée jusqu'à 80 % des patients au stades I, et un faible taux de développement d'une insuffisance respiratoire chronique chez moins de 5 % des patients sur une période de 10 ans. Cependant, le pronostic est moins favorable chez les patients avec un stade plus avancé au moment du diagnostic. Par exemple, une régression spontanée des anomalies radiographiques est observée chez seulement un tiers des patients au stade II et III, tandis que les patients au stade III et IV ont un risque 5

fois plus élevé de développer une insuffisance respiratoire chronique par rapport à ceux au stade I (Hillerdal et al., 1984; Nagai et al., 1999; Ungprasert et al., 2018).

Tableau 1. Stades radiologiques de la sarcoïdose pulmonaire et pronostic

Stades	Aspects radiographiques	% Résolution spontanée
0	Radiographie normale	
I	Adénopathies hilaires bilatérales	60 à 90 %
II	Adénopathies et infiltration pulmonaire	40 à 70 %
III	Infiltration pulmonaire sans fibrose	10 à 20 %
IV	Fibrose pulmonaire	0 %

Sarcoïdose extrathoracique

La sarcoïdose est une maladie multiviscérale, avec des fréquences qui varient selon l'origine ethnique et géographique. Une atteinte extrathoracique est présente dans 30 à 50 % des cas. Le plus fréquemment, il s'agit d'adénopathies périphériques, d'atteintes cutanées (plaques, nodules, lupus pernio), d'atteintes ophtalmiques. D'autres atteintes peuvent se manifester à savoir : les atteintes cardiaques, celles du système nerveux central et périphérique, hépatiques, rénales, ORL, osseuses, articulaires, spléniques ou musculaires.

Syndrome parasarcoïdien

Le terme « syndrome para-sarcoïdien » fait référence aux manifestations accompagnant la maladie mais non provoquées directement par les granulomes (Judson, 2015). Ces manifestations sont parfois extrêmement invalidantes et comprennent : une neuropathie des petites fibres caractérisée par l'association de douleurs neuropathiques et une atteinte du système nerveux autonome (palpitations, hypotension orthostatique, dyshidrose, troubles du transit), des troubles cognitifs, une dépression et des syndromes algiques articulaires et musculaires en dehors d'anomalies objectives, un érythème noueux dont les biopsies montrent une absence de granulome ; une fatigue touchant 50-70% des patients (Drent et al., 2012; Heij et al., 2012; Tavee et al., 2017). Les mécanismes physiopathologiques du syndrome parasarcoïdien ne sont pas connus, mais il est possiblement lié à la libération de médiateurs de l'inflammation comme la C-reactive protein, ou plus récemment associé à des anticorps anti-cononeuronaux (auto-anticorps dirigés contre des protéines neuronales et associés à certains

types de troubles neurologiques, y compris les syndromes paranéoplasiques) (Drent et al., 1999; Lower et al., 2019).

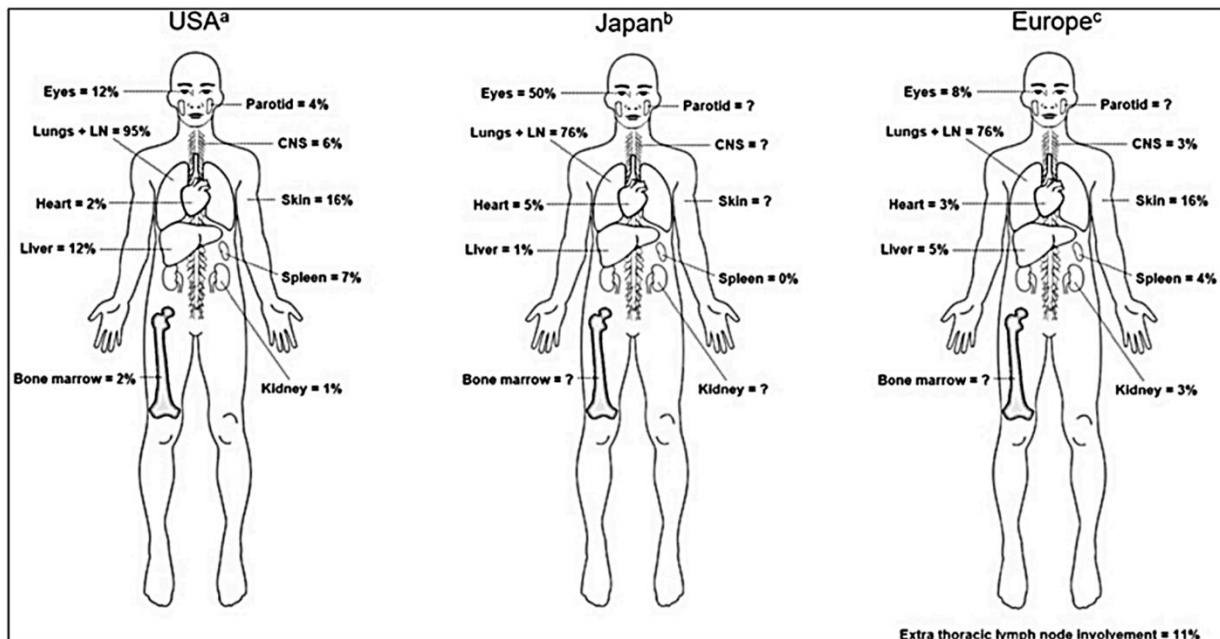


Figure 2 : Principales manifestations d'organe de la sarcoïdose.

Fréquence des principales manifestations d'organes en a) États-Unis, b) Japon, c) Europe. CNS : central nervous system : système nerveux central ; LN : Lymph node : ganglions. Adapté de (Thillai et al., 2021)

1.3.1 Diagnostic

Le diagnostic définitif de la sarcoïdose ne peut reposer uniquement sur des résultats cliniques et radiologiques. La présence d'un granulome non caséux lors d'une biopsie n'est pas spécifique à la sarcoïdose, car il peut également être observé dans plusieurs autres maladies telles que la béryllose et la granulomatose de Wegener. Le diagnostic de la sarcoïdose repose sur les éléments suivants : (1) la présence d'un granulome non caséux à l'examen histopathologique, (2) une présentation clinique compatible, et (3) l'exclusion d'autres causes d'inflammation granulomateuse (Hunninghake et al., 1999). Les seules exceptions à l'exigence histopathologique sont la sarcoïdose pulmonaire de stade I, pour laquelle la présence d'une adénopathie hilare bilatérale seule est généralement considérée comme suffisante pour le diagnostic, après avoir écarté d'autres éventuelles causes. De même pour le syndrome de Löfgren caractérisé par une adénopathie hilare bilatérale accompagnée d'un érythème noueux, fièvre et arthrite (Govender and Berman, 2015; Judson, 2008).

La confirmation histopathologique est généralement nécessaire pour établir le diagnostic de la sarcoïdose chez la plupart des patients. Cependant, une biopsie tissulaire de chaque organe

affecté n'est pas systématiquement requise. En effet, la présence d'un granulome non caséux dans au moins un organe, accompagnée de symptômes compatibles pour les autres organes, est considérée comme une preuve suffisante pour confirmer les atteintes tissulaires (Judson, 2008). Ainsi, les lésions facilement accessibles, telles que les éruptions cutanées, les nodules conjonctivaux, l'hypertrophie des ganglions lymphatiques superficiels, de la glande lacrymale et des glandes salivaires, sont généralement préférées pour la réalisation de la biopsie. Si ces lésions ne sont pas présentes ou si les résultats de la biopsie ne permettent pas de diagnostic, les ganglions lymphatiques intrathoraciques et/ou le parenchyme pulmonaire constituent souvent les sites de prélèvements privilégiés en raison de leur implication chez plus de 95 % des patients et de leur accessibilité avec moins de risques de complications par rapport à d'autres organes internes tels que le foie et les reins (Baughman et al., 2001; Govender and Berman, 2015).

1.3.2 Activité de la maladie

Le terme « activité » de la sarcoïdose est employé au cours de la pratique et des études cliniques. Néanmoins, il n'y'a pas de définition précise ni consensuelle de l'activité de la maladie ("Consensus conference," 1994). Une définition a été proposée en 1994 par la *world association of sarcoidosis and other granulomatous disorders* (WASOG) : « En cas de maladie active, les patients peuvent présenter des signes cliniques d'activité, et/ou des marqueurs biologiques/immunologiques d'activité, et/ou une formation de granulomes actifs, et/ou de progression active vers la fibrose. Dans la maladie inactive, les signes cliniques régressent ou restent stables, et les marqueurs biologiques/immunologiques sont dans la fourchette normale ». Autrement dit, la forme active implique une inflammation en cours, une évolution du/des granulomes et une progression possible vers la fibrose. Il est important de souligner le fait que cette définition ne prend pas en compte toutes les formes de la maladie et leurs devenir.

Il existe deux types d'apparition chez les patients atteints de sarcoïdose. La sarcoïdose aiguë apparaît brusquement, est plus fréquente chez les Caucasiens que chez les Afro-Américains et peut se présenter sous la forme du syndrome de Löfgren, caractérisé par une adénopathie hilare bilatérale, une arthrite de la cheville, un érythème noueux et fréquemment des symptômes constitutionnels comprenant de la fièvre, des myalgies et des malaises, et perte de poids (LÖFGREN and Lundbäck, 1952). Le pronostic est bon et une rémission spontanée survient généralement dans les 2 ans. Dans de rares cas, l'érythème noueux peut récidiver, même après de nombreuses années. Au contraire, la sarcoïdose chronique a un début

insidieux. Les symptômes sont souvent liés à une infiltration pulmonaire, comme la toux et la dyspnée, tandis que les symptômes constitutionnels sont beaucoup plus rares que dans la forme aiguë. L'évolution est souvent récurrente, la résolution étant moins probable et prenant plus de temps que dans la forme aiguë.

1.3.3 Marqueurs cliniques

Dans diverses cohortes, 30 à 50 % des patients sont asymptomatiques au moment du diagnostic. Le nombre réel de patients asymptomatiques ne peut être déterminé de manière fiable, car beaucoup d'entre eux échappent au diagnostic. Ces patients sont généralement détectés par une radiographie thoracique de routine anormale. Les symptômes non spécifiques sont présents chez un tiers des patients, et comprennent la fièvre, la perte de poids, la fatigue, la dyspnée et la toux. L'aggravation de la dyspnée et de la toux sont plus évocateurs d'une atteinte respiratoire active. D'autres signes sont évocateurs d'une atteinte active de la sarcoïdose : uvéite, érythème noueux, lupus pernio, fièvre, polyarthralgie, splénomégalie, adénopathie périphérique, atteinte des glandes salivaires ou lacrymales, signes cliniques en rapport avec une hypercalcémie (Hunninghake et al., 1999).

1.3.4 Marqueurs biologiques

Il est important de souligner qu'aucun biomarqueur spécifique de la sarcoïdose n'a jusqu'à présent été identifié. Dans la sarcoïdose les biomarqueurs sont plutôt utilisés pour évaluer l'activité de la maladie. Néanmoins, lorsqu'ils sont combinés à d'autres biomarqueurs (d'imagerie) et à des caractéristiques cliniques, ils peuvent être utiles au diagnostic. La plupart des biomarqueurs sériques trouvés dans la sarcoïdose sont produits par des cellules inflammatoires impliquées dans la formation des granulomes. Le biomarqueur sérique le plus connu de la sarcoïdose est l'enzyme de conversion sérique de l'angiotensine (ECA). L'ECA est une glycoprotéine qui convertit l'angiotensine I en angiotensine II. Il est principalement produit par les macrophages et a été identifié en immunohistochimie dans les cellules épithélioïdes des granulomes sarcoïdiens (Silverstein et al., 1979). Le taux d'ECA est en corrélation avec la charge de granulomes et les stades radiologiques II et III. Environ 30 à 80 % des patients atteints de sarcoïdose présentent une augmentation des taux d'ECA. La chitotriosidase (CTO) est une enzyme qui dégrade la chitine, un polymère présent dans les parois cellulaires des champignons et les exosquelettes des insectes et des crustacés. Cette enzyme est sécrétée par les neutrophiles pulmonaires et les macrophages stimulés. Les niveaux sériques du CTO sont corrélés aux

niveaux d'ECA (Popević et al., 2016). Les taux sériques les plus élevés sont observés chez les patients présentant une maladie évolutive.

Le récepteur de l'interleukine 2 soluble dans le sérum (sIL-2R) est la forme circulante de l'IL-2R membranaire. Lors de leur activation, les cellules « *Type 1 T helper* » (Th1) régulent positivement l'expression de l'IL-2R à la surface des cellules et sont capables de libérer la sIL-2R dans la circulation (Rubin and Nelson, 1990). L'augmentation des niveaux de sIL-2R est donc considérée comme un marqueur de l'activation des cellules Th1 dans la formation et la perpétuation du granulome (Sakthivel and Bruder, 2017). La sIL-2R semble être en corrélation avec une maladie active et une atteinte de plusieurs organes, et peut éventuellement prédire la progression et la rechute après l'arrêt du traitement (Vorselaars et al., 2014).

D'autres perturbations biologiques sont observées au cours de la sarcoïdose comme la lymphopénie qui pourrait être corrélée à la sévérité de la maladie ; l'hypergammaglobulinémie suggérant une participation des lymphocytes B ; ou l'hypercalcémie liée à une augmentation de l'activité de la 1-alpha hydroxylase des macrophages du granulome, convertissant la 25-OH vitamine D en 1.25-diOH vitamine D (forme active favorisant l'absorption digestive du calcium) (Kamphuis et al., 2013; Saidenberg-Kermanac'h et al., 2014; Sweiss et al., 2010).

1.3.5 *Imagerie*

La tomodenstométrie (TDM) est utilisée pour donner des arguments en faveur d'une activité thoracique de la sarcoïdose, afin de discriminer les lésions granulomateuses des lésions de fibrose. Deux scores d'activité du scanner thoracique ont été mis au point dans la sarcoïdose (Benamore et al., 2016; Oberstein et al., 1997). Le plus récent est le *computed tomography activity score* (CTAS) qui a été développé par Benamore et al. et qui consiste en une évaluation de la présence ou l'étendue de lésions potentiellement réversibles comme les nodules, le verre dépoli, les condensations et les épaississements péribronchovasculaires. Le CTAS permettrait de prédire la réponse au traitement, évaluée par l'amélioration de la capacité vitale forcée (CVF). Le CTAS présente les avantages suivants : la concordance inter-observateur élevée ; sa valeur prédictive a été confirmée par une autre équipe ; sa corrélation avec l'ECA sérique (Benamore et al., 2016; Duan et al., 2018).

La tomographie par émission de positons (TEP scanner) est une technique d'imagerie médicale qui permet de mesurer l'activité métabolique d'un organe. Cette technique est basée sur la détection de la radioactivité émise après l'injection d'une petite quantité d'un traceur

radioactif dans une veine périphérique. Le 18-fluorodésoxyglucose (FDG) analogue du glucose entre en compétition avec le 2-déoxyglucose vis-à-vis du transporteur trans-membranaire en excès (GLUT), et pénètre dans la cellule. Métabolisé en 18F-FDG -6-Phosphate par l'hexokinase, il ne peut alors être transformé par les étapes suivantes de la glycolyse et s'accumule dans la cellule (Love et al., 2005). Les cellules composant les granulomes (macrophages, lymphocytes) présentent un hypermétabolisme de type glycolyse aérobie (Piekarski et al., 2018). Dans la sarcoïdose, le TEP scanner permet d'évaluer l'activité, le staging, suivre l'évolution sous traitement (Keijsers and Grutters, 2020). Néanmoins en raison de son coût et du fait de l'irradiation, les indications du TEP scanner au 18F-FDG sont limitées aux indications suivantes : besoin d'identification d'un site occulte, possiblement biopsiable en l'absence de confirmation histologique aisée ; recherche d'une localisation cardiaque active ; évaluation de l'activité associée à la présence d'une fibrose pulmonaire (Valeyre et al., 2014).

1.4 Evolution de la maladie

1.4.1 Histoire naturelle et pronostic

L'évolution naturelle de la maladie est également très variable allant de la résolution spontanée sans ou avec traitements à des atteintes d'organes récalcitrantes nécessitant une greffe. Un trait caractéristique de la sarcoïdose est le taux élevé de rémission spontanée, observé globalement chez 60 à 70 % des patients 2 ans après le diagnostic, alors qu'une évolution chronique n'est observée que chez 10 à 30 % au minimum 5 ans après le diagnostic. Certains paramètres sont prédictifs d'une résolution rapide : un syndrome de Löfgren, une uvéite aiguë, un stade I, et certains haplotypes (human leukocyte antigen (HLA)-DRB1*03). D'autres prédisent une évolution chronique : un âge de début > 40 ans, une origine afro-caribéenne, le stade IV, certaines atteintes extra-thoraciques (cardiaque, neurologique, rénale, ORL, lupus pernio, uvéite postérieure, splénomégalie, néphrocalcinose), l'atteinte multiviscérale de plus de 3 organes (Mañá et al., 1994; Neville et al., 1983; Valeyre et al., 2014).

1.4.2 Morbi/mortalité

Le risque de manifestation de certaines maladies augmente dans la sarcoïdose, notamment, l'insuffisance cardiaque, le processus néoplasique, la lymphoprolifération, maladie auto-immune (syndrome de Sjögren), le syndrome d'apnée obstructive du sommeil et les

infections sévères (Hinz et al., 2018; Kim et al., 2021; Larsson et al., 2020; Rossides et al., 2020; Valeyre et al., 2014).

La mortalité liée à la sarcoïdose est faible : seuls 1 à 5 % des patients décèdent de leur maladie, le plus souvent d'une insuffisance respiratoire, d'une neurosarcoïdose ou d'une atteinte cardiaque. Des études ont révélé que les néoplasies étaient la principale cause de décès chez les patients, avec une incidence plus élevée que dans la population générale. La sarcoïdose entraîne une diminution de l'espérance de vie de près de 6 ans et une augmentation de la mortalité par rapport à la population générale (Jamilloux et al., 2016; Larsson et al., 2020; Rossides et al., 2018b). En particulier, la mortalité est plus élevée chez les afro-caribéens, les femmes et les personnes de plus de 55 ans (Swigris et al., 2011). De plus, la nécessité de traitements, la diminution de la fonction pulmonaire, l'extension de la fibrose > 20 % au scanner, et la présence d'une hypertension pulmonaire sont considérés comme des facteurs de risques de surmortalité (Yao et al., 2023).

1.5 Etiologie de la maladie

1.5.1 Facteurs génétiques

Une prédisposition génétique existe dans la sarcoïdose. L'étude de formes familiales est en faveur d'une transmission complexe, polygénique, récessive de pénétrance variable. Il existe un risque majoré de développer une sarcoïdose en cas d'antécédent familial. Les formes familiales et les particularités ethniques observées ont conduit à rechercher les gènes de prédisposition impliqués dans la maladie. En effet, le fait d'avoir un jumeau monozygote atteint multiplie par 80 le risque de développer une sarcoïdose par rapport à la population générale (Sverrild et al., 2008). Le risque de survenue d'une sarcoïdose chez un parent du premier degré d'un patient atteint est multiplié par un facteur de 3,7 (Rossides et al., 2018a). Les sujets caucasiens sont plus susceptibles de développer une forme familiale (Rybicki et al., 2001).

La sarcoïdose n'est pas due à des défauts dans un seul gène majeur, ce qui pourrait expliquer la variabilité dans la présentation clinique. À cet égard, certains pensent que la sarcoïdose représente une famille de maladies (sarcoïdoses), parmi lesquelles, entre autres : le syndrome de Löfgren, qui est défini comme l'apparition brutale d'une fièvre, d'un érythème noueux, d'une lymphadénopathie hilare bilatérale et d'une polyarthralgie ; maladie pulmonaire non résolutive/évolutive ; et uvéite granulomateuse, chacune avec des associations génétiques potentiellement distinctes (Spagnolo and du Bois, 2007).

Les facteurs de risque génétique les plus importants ont été identifiés sur le chromosome 6p21, un locus contenant les principaux gènes liés à la présentation de l'antigène et à la régulation des lymphocytes T, tels que l'HLA et la protéine Butyrophilin-like 2 (BTNL-2). BTNL-2 est un cofacteur de CD80/CD86 agissant comme régulateur négatif de l'activation des lymphocytes T pendant la présentation des antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes (Suzuki et al., 2012). Le projet ACCESS (*A Case Control Etiologic Study of Sarcoidosis*) a été le premier à montrer que les allèles HLA-DRB1 (*1101) et HLA-DPB1 (*0101) contribuent de manière significative au risque de sarcoïdose (Rossman et al., 2003). Les allèles HLA-DRB1*14, DRB1*15 et DQB1*0601 sont associés aux formes chroniques de la maladie (Sato et al., 2010; Wennerström et al., 2013). Le syndrome de Lofgren est plus fréquent chez les patients porteurs des allèles HLA-DRB1*03 et DQB1*0201 (Fischer and Rybicki, 2015; Grunewald et al., 2010). L'implication de divers organes est associée à des allèles HLA spécifiques, par exemple une réduction du risque de manifestation extra-pulmonaires chez les porteurs de DRB1*0301, et un risque accru de lésions extra-thoraciques et cutanées chez les porteurs de DRB1*04 et DRB1*0302, respectivement (Darlington et al., 2014; Levin et al., 2015). De nombreux autres polymorphismes ont été mis en évidence notamment *NOD2* (récepteur de reconnaissance de motif moléculaires (PRR)), *TNFA*, *NFKB*, *ANXA11* ou *NOTCH4* (impliquée dans la division cellulaire et l'apoptose) (Adrianto et al., 2012; Besnard et al., 2018; Karakaya et al., 2022; Song et al., 2014).

De plus en plus d'études s'intéressent au rôle de l'épigénétique dans la sarcoïdose : cela est dû aux différences démographiques dans la présentation de la sarcoïdose, à l'implication de l'épigénétique dans d'autres maladies caractérisées par un contexte inflammatoire proche de celui de la sarcoïdose, notamment la tuberculose, la fibrose pulmonaire idiopathique et la polyarthrite rhumatoïde (Khadela et al., 2022; Liu et al., 2013; Yang et al., 2014). Une étude a suggéré l'implication de l'épigénétique par méthylation de l'ADN au cours des formes progressives de sarcoïdose (Yang et al., 2019). De plus, les gènes importants dans la régulation épigénétique, y compris *HDAC* et d'autres gènes modifiant l'histone et la chromatine ont été associés à la sarcoïdose (Jiang et al., 2022), ce qui suggérerait l'impact des facteurs environnementaux à l'origine de ces modifications sur l'évolution de la sarcoïdose. En effet, une association a été démontrée entre certains variants génétiques prédisposant et le tabagisme ou l'exposition aux insecticides. (Garman et al., 2020).

1.5.2 Facteurs environnementaux

Plusieurs hypothèses sont proposées concernant l'implication des expositions environnementales dans la pathogénie de la sarcoïdose. La première est celle d'une exposition environnementale agissant comme une stimulation antigénique directe du système immunitaire. Dans une deuxième hypothèse, l'antigène présenterait des similitudes avec les auto-peptides, ce qui dérégulerait le système immunitaire en favorisant l'apparition d'une auto-immunité par mimétisme moléculaire. La troisième hypothèse est celle de l'action de l'antigène comme dérégulant du système immunitaire sans être la principale cause de la maladie. La quatrième hypothèse suggère que les facteurs environnementaux sont uniquement des facteurs associés ne causant pas directement la maladie (Judson, 2020).

Plusieurs arguments sont en faveur d'une implication des facteurs environnementaux : les atteintes des organes exposés au milieu extérieur, en particulier le poumon, la peau et l'œil, sont plus fréquentes ; les fluctuations épidémiologiques, avec des pics d'incidence saisonniers, notamment au printemps, ou dans des zones géographiques très restreintes ; la possibilité d'un agent transmissible pouvant expliquer le développement de la sarcoïdose chez le receveur après une transplantation d'organes provenant de patients atteints de sarcoïdose (Beghè et al., 2017; Burke et al., 1990; Demirkok et al., 2007; Wilsher, 1998).

1.5.2.1 *Facteurs infectieux potentiels*

De nombreuses observations suggèrent que les agents infectieux pourraient jouer un rôle dans le développement de la sarcoïdose. Plusieurs agents infectieux ont été soupçonnés dans l'immunopathogénèse de la sarcoïdose, seuls deux ont été significativement associés à la pathologie : le *Propionibacterium acnes* (PA) (nouvellement nommé *Cutibacterium acnes*) et les mycobactéries (Esteves et al., 2016). Des peptides de mycobactéries ont été identifiés dans les granulomes sarcoïdiens comme la catalase G mycobactérienne (mKatG), la Superoxyde Dismutase A (mSODA) ou le 6 kDa *early secretory antigenic target* (ESAT-6). Ces peptides entraînent une réponse immunitaire spécifique T et la production d'anticorps sériques chez les patients atteints de sarcoïdose (Chen and Moller, 2014). La mise en évidence d'antigènes mycobactériens chez les patients atteints de sarcoïdose n'implique pas que la sarcoïdose soit une forme d'infection mycobactérienne. Il se pourrait plutôt que certains antigènes mycobactériens faiblement dégradés contribuent au processus immunitaire de la sarcoïdose sans la présence d'organismes mycobactériens invasifs viables.

Le *P. acnes*, est une bactérie anaérobie, commensale de la peau. Cette bactérie est le seul micro-organisme qui ait été cultivé à partir de lésions de sarcoïdose (Homma et al., 1978). De nombreuses études ont identifié des réponses immunitaires spécifiques au *P.acnes* chez les patients atteints de sarcoïdose en comparaison à des sujets sains (Ebe et al., 2000; Furusawa et al., 2012; Schupp et al., 2015).

En plus d'examiner les agents pathogènes infectieux individuels comme causes de la sarcoïdose, des changements spécifiques dans la composition du microbiote pulmonaire ou intestinal pourraient jouer un rôle important dans le développement de la maladie. Cependant, quelques études examinant les modifications du microbiome pulmonaire n'ont pas réussi à identifier les distributions spécifiques à la sarcoïdose. Une étude a suggéré que les bactéries anaérobies *Atopobium* et *Fusobacterium* détectées dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA) pourraient être associées à la sarcoïdose (Zimmermann et al., 2017). Une autre étude a révélé que le microbiote présent dans le LBA des patients atteints de sarcoïdose était moins diversifié et moins abondant que celui des témoins sains (Scher et al., 2016). Cependant, on ne sait pas clairement si ces changements dans le microbiote pulmonaire sont à l'origine de la sarcoïdose ou sont le résultat de la maladie.

1.5.2.2 Facteurs non infectieux potentiels

Des études épidémiologiques ont associé des facteurs organiques et inorganiques non infectieux à la sarcoïdose. Il a été démontré que la sarcoïdose survient le plus souvent au printemps (Fité et al., 1996; Henke et al., 1986), suggérant que certains cas de sarcoïdose pourraient résulter de l'inhalation d'un bioaérosol organique plus abondant au printemps. Plusieurs autres analyses épidémiologiques ont révélé que la prévalence de la sarcoïdose est associée à l'exposition à d'autres bioaérosols organiques tels que l'exposition aux odeurs de moisi sur le lieu de travail et l'exposition aux poussières organiques industrielles (Barnard et al., 2005; Kucera et al., 2003; Newman et al., 2004).

Un pic d'incidence de cas de sarcoïdose a été retrouvé chez les pompiers qui sont intervenus au moment des attentats du *World Trade Center* (Izbicki et al., 2007). Ces attaques ont entraîné la libération de nombreuses substances pouvant potentiellement déclencher une réaction granulomateuse comme, des métaux, des fibres (verre, amiante), des particules (carbonate de calcium et silice) mais aussi des polluants organiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Izbicki et al., 2007; Liroy et al., 2002).

Les particules de carbone ont aussi été incriminées dans les atteintes cutanées de sarcoïdose liées aux tatouages. Les tatouages noirs composés de carbone amorphe sont plus souvent responsables de lésions cutanées que les tatouages rouges dénués de carbone. Ce type de tatouage est accompagné du « *rush phenomenon* » particulièrement observé chez les patients atteints de sarcoïdose. Il s'agit d'une réaction papulo-nodulaire qui survient sur un tatouage noir récent puis dans un second temps qui se développe sur d'autres tatouages noirs anciens, rappelant les deux phases : locale puis systémique (Dréno, 2020; Sepehri et al., 2016).

La sarcoïdose est également associée à l'exposition à des aérosols inorganiques, en particulier à plusieurs poussières métalliques. En effet, une étude a révélé une association significative entre l'exposition aux fibres minérales artificielles et le développement de la sarcoïdose. Les résultats de l'analyse quantitative par microscopie électronique sur des échantillons de poumons atteints de sarcoïdose ont révélé que la moitié d'entre eux contenaient de la silice, de l'aluminium ou du titane (Drent et al., 2000). Des emplois avec une exposition à la silice cristalline ont été identifiés comme associés à la sarcoïdose (Graff et al., 2020). De plus, l'étude PEDIASARC a montré l'existence d'un lien entre l'exposition aux particules inorganiques due aux activités professionnelles des adultes (parents) et la sarcoïdose pédiatrique, soulignant ainsi le lien entre la génétique et l'environnement (Nathan et al., 2022).

Une réactivité lymphocytaire plus importante à différents métaux était observée chez des patients atteints de sarcoïdose en comparaison avec des patients atteints de syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAOS) dont l'exposition professionnelle aux métaux n'était pas différente entre les deux groupes. L'immuno-réactivité à la silice et/ou aux métaux semble être corrélée à l'apparition d'une fibrose pulmonaire sarcoïdienne (Beijer et al., 2020). Une étude a identifié des particules de silice cristalline au centre de granulomes cutanés, tandis que des dépôts de calcite étaient présents en périphérie. Cela pourrait suggérer que la composition de l'agent joue un rôle différent dans la constitution du granulome (Colboc et al., 2019).

1.6 Traitements

La cause de la maladie étant inconnue, seuls les symptômes sont traités. La base du traitement de la sarcoïdose est la régulation de la réponse immunitaire excessive et la suppression de l'inflammation granulomateuse dont les macrophages et des lymphocytes T hautement activés et de leurs cytokines telles que le TNF- α (tumor necrosis factor alpha), l'IL-1, l'IFN- γ (interferon gamma) et l'IL-6, dans le but d'empêcher une interférence dangereuse avec la fonction des organes et pour prévenir l'installation de la fibrose.

Tous les patients n'ont pas besoin d'être traités. La décision de traiter un patient atteint de sarcoïdose est fondée sur le développement de symptômes spécifiques et la progression de la maladie mise en évidence par une aggravation de l'état fonctionnel et des anomalies d'imagerie. Si un traitement doit être instauré, les corticoïdes oraux sont la première ligne de traitement. Les glucocorticoïdes diffusent à travers la membrane cellulaire, puis se fixent et activent un récepteur intra-cytoplasmique. Ce complexe activé, passe la membrane nucléaire et s'associe au *glucocorticoid response element* (GRE) pour activer des gènes codant pour des protéines anti-inflammatoires (annexine 1, IκB (*Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta*) qui inhibe NF-κB (*nuclear factor kappa B subunit*), ou le récepteur de l'IL1) ou inhiber la transcription de gènes codant pour des protéines pro-inflammatoires (IL-1β, TNFα, molécules d'adhésions). Le mécanisme d'action des corticoïdes peut également être direct en inhibant la voie NF-κB. Les corticostéroïdes se sont révélés utiles pour soulager les symptômes, mais les risques liés à l'utilisation de corticostéroïdes sont toujours un sujet de préoccupation (Grutters and van den Bosch, 2006).

Des agents de deuxième et troisième intention peuvent être prescrits en cas d'absence de réponse au traitement, d'effets secondaires toxiques ou d'incapacité à réduire progressivement la dose de corticostéroïdes (James and Baughman, 2018).

Le méthotrexate, l'azathioprine, le léflunomide et le mycophénolate sont les alternatives d'épargne stéroïdienne les plus courantes dans le traitement de la sarcoïdose. Le méthotrexate est le traitement de deuxième intention le plus souvent recommandé, en raison de son profil d'effets secondaires bien établi et de son efficacité dans les maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde (PR) et le psoriasis (Rahaghi et al., 2020). Il s'agit d'un antagoniste de l'acide folique qui inhibe le métabolisme des purines et des pyrimidines, ainsi que la synthèse des acides aminés et des polyamines : il agit donc sur la synthèse de l'ADN, la réparation et la réplication cellulaire. Il a également des effets anti-inflammatoires sur les cellules T via une augmentation de l'adénosine et par un mécanisme mal connu qui inhiberait le TNFα via la voie NF-κB (Iannuzzi and Fontana, 2011).

Les antipaludéens de synthèse (la chloroquine et l'hydroxychloroquine) ont été fréquemment utilisés dans le traitement de la sarcoïdose, sur la base des premiers essais randomisés qui ont montré un bénéfice à long terme avec la chloroquine (Morse et al., 1961).

L'hydroxychloroquine interfère avec la présentation antigénique en inhibant l'acidification du lysosome nécessaire à la présentation antigénique et à l'activation des *toll like receptor* (TLR) (Schrezenmeier and Dörner, 2020). L'hydroxychloroquine a été particulièrement utilisée dans les maladies cutanées, l'hypercalcémie et dans certains cas de neurosarcoïdose (Baughman and Lower, 2007; Sharma, 1998).

Les anticorps monoclonaux anti-cytokines sont considérés comme des thérapies de troisième intention. Le TNF- α est connu pour jouer un rôle important dans la formation des granulomes associés à la sarcoïdose. Les anti-TNF- α (infliximab et adalimumab) ont montré leur efficacité pour les cas de sarcoïdose chronique réfractaire (particulièrement lupus pernio, neurosarcoïdose, et atteinte oculaire). L'efficacité est prouvée pour les atteintes pulmonaires mais avec un effet modeste (Baughman et al., 2006; Sweiss et al., 2014b).

La sarcoïdose a été associée à une altération de l'homéostasie des lymphocytes B, à un BAFF (*B-cell activating factor*) élevé, à une hypergammaglobulinémie, à la présence de plasmocytes producteurs d'immunoglobuline A (IgA) à proximité du granulome et à des anticorps auto-immuns (Ando et al., 2018; Kamphuis et al., 2013; Lee et al., 2011a). Par conséquent, il a été suggéré que le ciblage des cellules B pourrait influencer le processus pathologique (Ueda-Hayakawa et al., 2013). Le rituximab, un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre les lymphocytes B CD20+ qui réduisent la population mature en circulation, a fait l'objet d'essais cliniques sur des petites cohortes (Belkhou et al., 2008; Sweiss et al., 2014a). À l'heure actuelle, le rôle du rituximab en tant qu'agent de troisième ou quatrième intention dans la sarcoïdose reste incertain, mais une meilleure compréhension des actions des lymphocytes B dans la sarcoïdose contribuera probablement à clarifier l'utilisation de ce médicament.

D'autres anticorps monoclonaux ciblant différentes molécules impliquées dans la sarcoïdose, ont fait l'objet d'essais cliniques, tels que l'ustékinumab, un inhibiteur de l'IL-12 et de l'IL-23. De plus, des anti-fibrotiques ont été testés : le nintedanib (inhibiteur de tyrosine kinase ciblant les récepteurs du *Platelet-derived growth factor* (PDGF), *fibroblast growth factor* (FGF) et *vascular endothelial growth factor* (VEGF)) (Flaherty et al. 2019). Ces dernières années, de nouveaux traitements ciblant les voies de signalisation cellulaires impliquées dans la formation des granulomes sont apparus (voir ci-après).

1.7 Introduction sur les voies de signalisation dans la sarcoïdose : [mTOR et inflammasome]

D'après des études récentes, trois voies de signalisations inflammatoires clés impliquées dans la formation des granulomes présentent un intérêt pour d'éventuelles nouvelles options thérapeutiques. Ces voies clés sont la voie mTORC1 (*mechanistic target of rapamycin complex 1*), la voie de l'inflammasome NLRP3 (*nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domaincontaining-3*) et la voie JAK/STAT (spécifiquement décrite ultérieurement).

Le rôle de la voie mTORC1 dans la pathogenèse de la sarcoïdose a été décrit pour la première fois par Linke et al, qui ont montré que l'activation de la voie de signalisation mTORC1 dans les macrophages entraînait la formation de granulomes similaires à ceux de la sarcoïdose chez la souris. De plus, ils ont identifié l'activation de cette voie dans un tiers des granulomes de 27 biopsies de patients atteints de sarcoïdose. La voie mTORC1 était significativement enrichie en cas de formes progressives de sarcoïdose pulmonaire (Linke et al., 2017). Néanmoins d'autres études plus récentes ont montré que la voie mTORC1 était impliquée dans la formation du granulome mais n'était pas corrélée avec la sévérité ou la chronicité de la maladie (Pizzini et al., 2021). Il a été rapporté que l'inhibition de la voie mTORC1 implique la résorption des granulomes chez les souris. Ces résultats ont conduit à se demander si un traitement par un inhibiteur de mTOR serait bénéfique pour les patients atteints de sarcoïdose. En effet, le sirolimus qui est un inhibiteur pharmacologique de mTOR a montré déjà son efficacité chez un patient atteint de sarcoïdose pulmonaire ; et une étude clinique sur le sirolimus dans la sarcoïdose cutanée est en cours (ClinicalTrials.gov, Identifier : NCT05458492).

Huppertz et al. ont suggéré un rôle pour l'inflammasome NLRP3 dans la pathogenèse de la sarcoïdose en identifiant l'activation de l'IL-1 β et de la caspase-1 dans les granulomes des biopsies de patients atteints de sarcoïdose. En outre, ils ont montré qu'une expression de l'IL-1 β était corrélée avec l'évolution de la maladie. L'inflammasome NLRP3 pourrait également être une cible potentielle pour le traitement de la sarcoïdose. Un essai clinique évaluant l'efficacité du canakinumab, un inhibiteur pharmacologique de l'IL-1 β a été réalisé sur des patients atteints de sarcoïdose pulmonaire. Les résultats publiés sont peu encourageants,

notamment parce que l'essai a spécifiquement exclu les patients identifiés comme ayant une maladie réfractaire (ClinicalTrials.gov, Identifiant : NCT02888080).

2 Le granulome sarcoïdien

2.1 Généralités sur les granulomes

Le granulome est généralement composé d'agrégat d'histiocytes épithélioïdes, avec une couronne périphérique de lymphocytes et de plasmocytes, et parfois un centre nécrotique. Le terme « inflammation granulomateuse » englobe un éventail de formes histologiques, allant des granulomes bien formés aux amas d'histiocytes mélangés à d'autres cellules inflammatoires (Figure 3).

Il existe deux grandes formes de granulomes, définis par leur étiologie : les granulomes à « corps étranger » et les granulomes « immuns ». Les granulomes à « corps étranger » résultent d'un défaut de phagocytose de l'antigène combiné à l'absence de déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative. Les granulomes « immuns » sont le résultat de diverses étiologies. Chaque étiologie a un aspect histologique identifiable permettant aux pathologistes d'affiner le diagnostic différentiel. Les granulomes « immuns » sont caractérisés histologiquement comme étant lymphohistiocytaires et impliquent donc le déclenchement de l'immunité innée et adaptative. Ces granulomes peuvent être caséux et présenter donc une nécrose centrale.

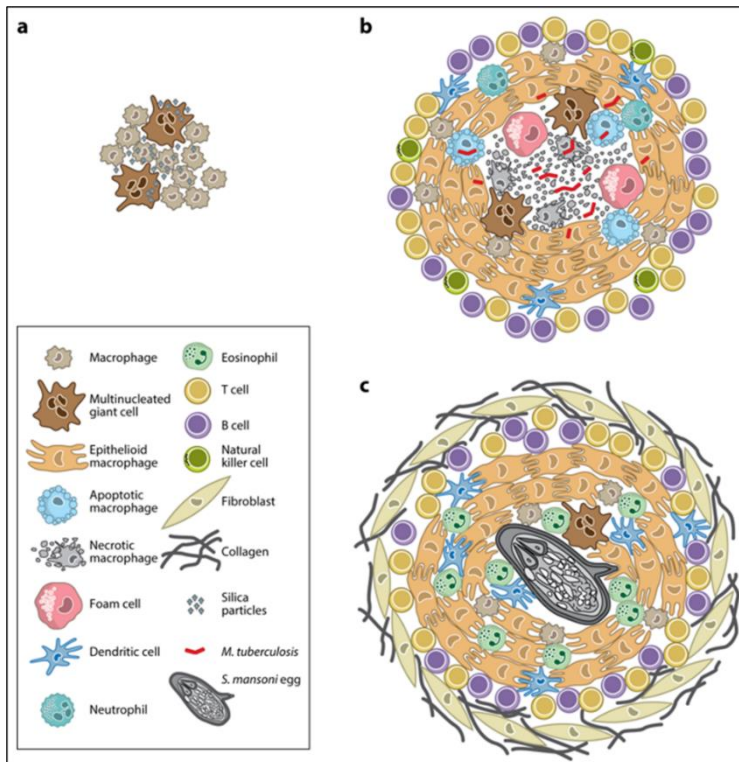


Figure 3 : Représentation schématique des types des exemples des types de granulomes existants et de leurs constituants cellulaires.

Un granulome de silice (réaction à corps étranger) constitué de macrophages non épithélioïdes et de cellules géantes multinucléées (CGM) (a). Granulome de *Mycobacterium tuberculosis* avec nécrose centrale. Plusieurs populations de leucocytes sont présentes, notamment des macrophages infectés et non infectés, des macrophages épithélioïdes, des CGM, des cellules spumeuses, des macrophages apoptotiques et nécrotiques et des cellules T (b). Granulome de *Schistosoma mansoni* avec fibrose. Des macrophages épithélioïdes entourent l'œuf. Des éosinophiles et des lymphocytes sont également présents et la périphérie du granulome est devenue fibreuse (c). Adapté de (Pagán and Ramakrishnan, 2018)

2.2 Le granulome sarcoïdien, particularités histologiques

La lésion caractéristique de la sarcoïdose est un granulome à cellules épithélioïdes, compact et non caséux. Les granulomes à cellules épithélioïdes sont composés d'un follicule central constitué essentiellement de macrophages, de cellules épithélioïdes et de cellules géantes, et entouré de lymphocytes T CD4+ (les LT régulateurs CD4+ *Forkhead-Box-Protein 3* (FOXP3)+, les Th17, les Th1 et les Th2) (Facco et al., 2011; Miyara et al., 2006; Nguyen et al., 2018; Soler and Basset, 1976), et d'autres cellules comme les lymphocytes T CD8+, des cellules dendritiques, des lymphocyte B ou des plasmocytes principalement à IgA (Broos et al., 2013). En microscopie électronique, les cellules épithélioïdes bien développées présentent de nombreuses projections cytoplasmiques avec de fréquentes interdigitations, leur morphologie

suggère une fonction sécrétoire (“Statement on Sarcoidosis,” 1999). Les cellules géantes peuvent contenir des inclusions cytoplasmiques telles que des corps d'astéroïdes (fragments de collagène ou de vimentine emprisonnés) et des corps de Schaumann (lysosomes dégénérés) (Rossi et al., 2015). Les granulomes peuvent occasionnellement présenter une nécrose centrale focale (“Statement on Sarcoidosis,” 1999). Il a été suggéré que la granulomatose sarcoïdique nécrosante (GSN) pourrait être une variante de la sarcoïdose (Churg et al., 1979). Les granulomes sarcoïdiens peuvent développer des modifications fibreuses qui commencent généralement à la périphérie en organisation lamellaire concentrique, pouvant progresser jusqu'à une hyalinisation complète du granulome et vers une extension dans les tissus-hôtes (Figure 4). L'épaisseur de cette couronne paraît être en rapport avec l'âge du granulome.

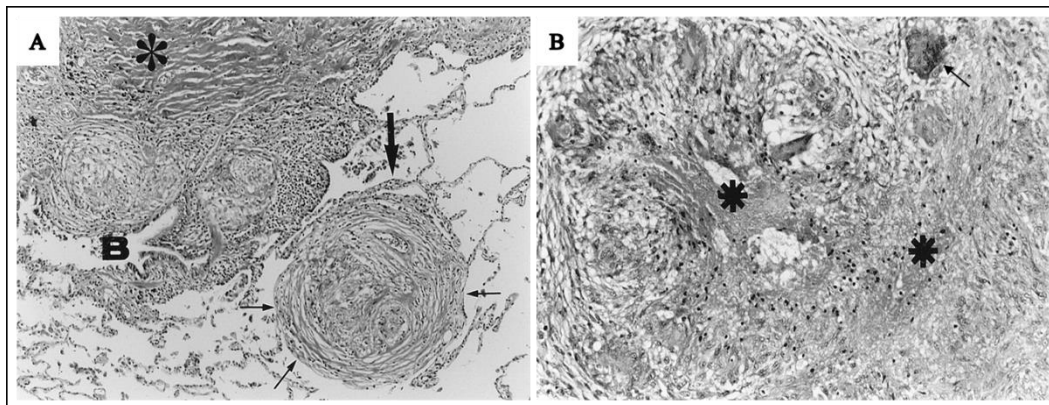


Figure 4 : *Histologie des granulomes de sarcoïdose.*

Les granulomes dans les biopsies pulmonaires se localisent dans l'interstitium comme dans la couche sous-épithéliale d'une bronchiole (désigné par la lettre **B**), le tissu conjonctif péribronchiolaire et l'interstitium alvéolaire. Les granulomes peuvent subir des modifications fibreuses périgranulomateuses (flèche fine) et sont parfois remplacés par des modifications hyalineuses (astérisque) au stade chronique. Les septums alvéolaires périgranulomateux peuvent présenter une infiltration interstitielle principalement des lymphocytes (flèche épaisse) x25 (A). Un petit nombre de granulomes peuvent présenter une nécrose dans le follicule central (astérisque). Cellule géante (flèche) x50 (B). Adapté de (“Statement on Sarcoidosis,” 1999)

2.3 Dynamique de formation et physiopathologie du granulome sarcoïdien

2.3.1 Les acteurs cellulaires

Les acteurs cellulaires impliqués dans la sarcoïdose jouent un rôle crucial dans la médiation de l'inflammation et la formation des granulomes. Ils contribuent à la réponse inflammatoire en participant à la production et à la régulation des cytokines pro-inflammatoires, à la présentation de l'antigène et à la modulation de la réponse immunitaire adaptative.

Comprendre le rôle et l'interaction de ces acteurs cellulaires est essentiel pour élucider les mécanismes sous-jacents de la maladie et développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées.

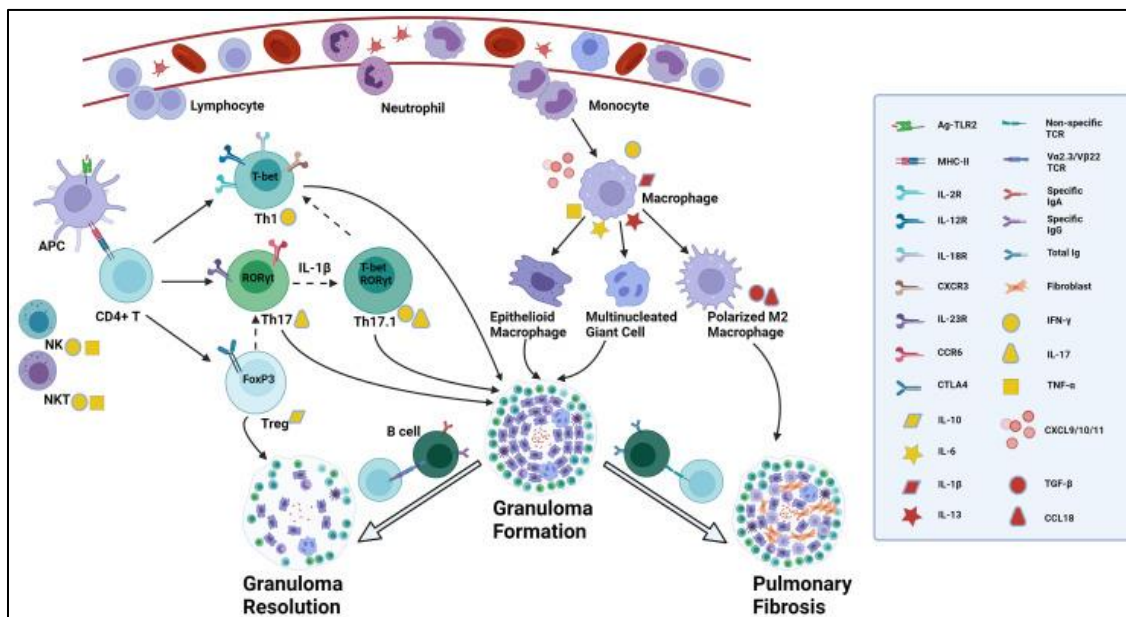


Figure 5 : Cellules immunitaires impliquées dans la sarcoïdose.

En fonction de l'environnement immunitaire, les macrophages activés peuvent se différencier en cellules épithélioïdes et cellules géantes et se polarisés en macrophages M1 ou M2. En parallèle, les LT CD4⁺ activés peuvent se différencier en divers lymphocytes T effecteurs : les cellules Th1 expriment T-bet, sécrètent l'IFN- γ et interagissent avec des ligands appariés via l'IL-2R, l'IL-12R, l'IL-18R et le CXCR3 (*C-X-C chemokine receptor type 3*) ; les cellules Th17 expriment ROR γ t (*retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t*), ainsi que l'IL-23R et le CCR6 (*C-C chemokine receptor type 6*), et produisent l'IL-17 ; les cellules Tregs expriment FoxP3 et jouent un rôle de régulation immunitaire en exprimant CTLA4 et en sécrétant de l'IL-10. Les cellules Th17 peuvent co-exprimer ROR γ t et T-bet (*T-box expressed in T cells*), se convertissant en cellules dites Th17.1, régulées par l'IL-1 β . Les cellules Th17.1, capables de produire simultanément de l'IL-17 et de l'IFN- γ , peuvent perdre l'expression de l'ARNm de ROR γ t et finalement se différencier en cellules Th1 exprimant T-bet par des mécanismes incertains, sécrétant l'IFN- γ seul. Les cellules Treg peuvent perdre l'expression de FoxP3 et exprimer à la place ROR γ t, se transformant ainsi en cellules Th17 dans certaines circonstances. Adapté de (Zhang et al., 2021)

2.3.1.1 Macrophages, cellules épithélioïdes, cellules géantes

Le macrophage et les cellules qui en dérivent sont des constituants majeurs du granulome. Les macrophages sont une population de globules blancs dont la principale fonction est la phagocytose. Les macrophages ont une grande taille (20 à 50 μ m) et sont pourvus d'un grand nombre d'organites cytoplasmiques, associés à leurs fonctions phagocytaires et sécrétoires. Les macrophages sont une population diversifiée, présentant une morphologie, une fonction et un phénotype particuliers en fonction de leur localisation au niveau tissulaire

(macrophages alvéolaires du poumon, cellules de Küpffer du foie, ostéoclastes de l'os...), de leur environnement cellulaire et cytokinique (polarisation M1 et M2) et de leur origine (cellules auto répliquées d'origine embryonnaire versus cellules dérivées de monocytes) (Gordon and Martinez-Pomares, 2017). Dans les granulomes « immuns », les macrophages présents en périphérie hors du granulome proprement dit possèdent de nombreux phagosomes et phagolysosomes contenant des débris cellulaires, alors que les macrophages du follicule n'ont pas ou très peu de phagosomes mais présentent des organites développées (appareil de Golgi, lysosomes, réticulum endoplasmique et mitochondries), suggérant des fonctions et un degré de maturation différents (Soler and Basset, 1976).

Les cellules épithélioïdes sont le résultat de la transformation et de l'activation des macrophages (Adams, 1976). Leur appellation de « cellules épithélioïdes » provient de leur ressemblance avec les cellules épithéliales. Les cellules épithélioïdes sont de grande taille, avec des limites cytoplasmiques peu nettes, un noyau oval excentré et une chromatine peu dense (Pagán and Ramakrishnan, 2018). Les cellules épithélioïdes ont une fonction sécrétoire prédominante avec l'expression entre autres du TNF α , du TGF β 1 (*transforming growth factor beta 1*), de la cathepsine K, une protéase probablement impliquée dans la formation des granulomes, de l'ECA ou l'ostéopontine qui pourrait jouer un rôle dans la régulation de la migration des macrophages tissulaires, l'adhérence cellulaire et la phagocytose (Bühling et al., 2001; Carlson et al., 1997; Myatt et al., 1994; Shigehara et al., 1998; Stanton et al., 2003; Yanagishita et al., 2007).

Theodor Langhans a décrit pour la première fois **les cellules géantes multinucléées (CGM)** dans ses études sur la tuberculose il y a plus de 150 ans (Helming and Gordon, 2009). Comme leur nom l'indique, les CGM peuvent être identifiées histologiquement par leur morphologie particulière : trois noyaux ou plus disposés de façon aléatoire (à corps étranger) ou disposé en périphérie en forme de fer à cheval (cellule de Langhans). Depuis leur première description dans la tuberculose, les CGM ont été retrouvés dans toutes sortes de granulomes, infectieux et à corps étranger. Dans des modèles *in vivo* et *in vitro*, ces cellules conservent leur activité phagocytaire et microbicide, tout en sécrétant des cytokines (IL-1 α , TNF α et TGF- β) qui participent à la dynamique cellulaire des granulomes. Le mécanisme de formation des CGM n'est pas bien connu. Jusqu'à très récemment, le seul mécanisme de formation des CGM suggéré était la fusion des membranes des macrophages ou des cellules épithélioïdes stimulés par des cytokines, des facteurs de croissance myéloïdes et des lipides mycobactériens. Néanmoins, une

étude a présenté une autre voie de formation des CGM, qui n'implique pas de fusion cellule-cellule. Cette voie implique une activation persistante du TLR2 induisant un stress réplicatif en activant la réponse aux dommages de l'ADN. Le gH2AX (gamma-histone 2AX), marqueur de dommage à l'ADN est exprimé dans les cellules géantes multinucléées de granulomes sarcoïdiens (Herrtwich et al., 2016).

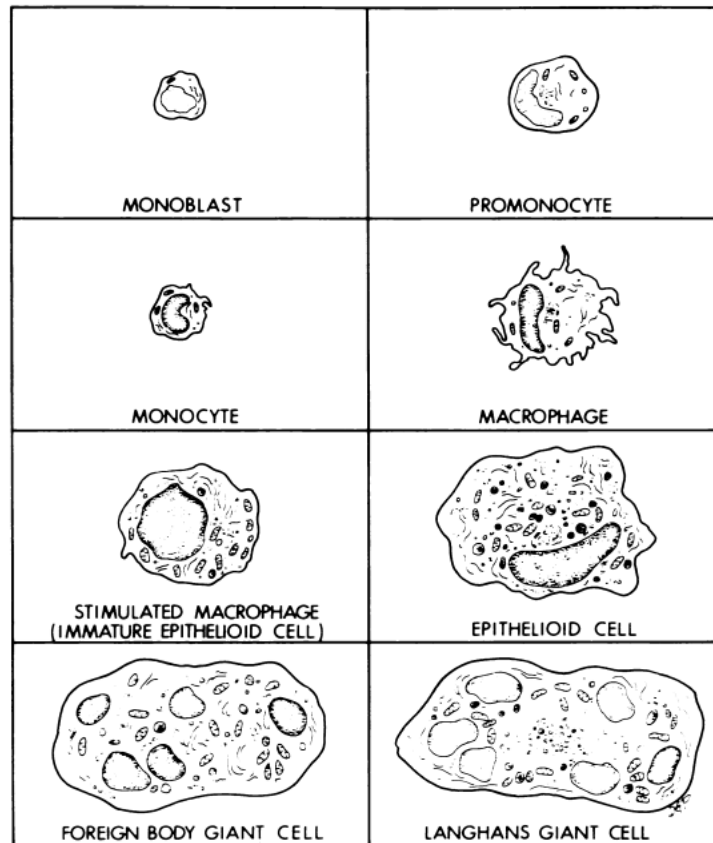


Figure 6 : Représentation schématique de la morphologie des différents éléments du système phagocytaire mononucléé. Adapté de (Adams, 1976)

Stimulated macrophage : macrophage stimulé ; epithelioid : épithélioïde, Foreign body giant cell: cellule géante à corps étranger; Langhans giant cell: cellule de Langhans

2.3.1.2 Lymphocytes

Les lymphocytes T, en particulier les lymphocytes T CD4+, sont des composants clés du granulome sarcoïdien. Des études sur le LBA ont démontré une augmentation du nombre de lymphocytes T CD4+ activés dans les poumons des patients atteints de sarcoïdose. Ils peuvent se différencier en divers lymphocytes T auxiliaires ou « helper » en fonction des stimulus. Ces cellules sécrètent diverses cytokines ou chimiokines qui favorisent ou inhibent l'inflammation

granulomateuse. Plusieurs sous-populations lymphocytaires sont impliquées dans la pathogénie de la sarcoïdose : les Th1, les Th2, les Th17, les Th17.1 et les Tregs.

Les Th1 sont identifiés notamment par l'expression du facteur de transcription T-bet. Ce dernier contrôle la régulation positive des gènes pour l'expression de l'IFN- γ et du CXCR3, deux molécules cruciales dans l'inflammation sarcoïdienne et la formation de granulomes. Les cellules du LBA de patients atteints de sarcoïdose expriment des niveaux plus élevés d'ARNm de *T-bet* que ceux de témoins sains, suggérant un rôle important de T-bet dans cette maladie. Des études ont montré une réponse Th1 exagérée impliqué dans le processus de formation de granulome, et ceci par une production accrue de l'IL2, de l'IFN- γ et des récepteurs fonctionnels de l'IL-2 (IL-2R) dans le sang périphérique et le LBA de patients atteints de sarcoïdose. Il a été démontré que l'expression de certaines chimiokines était préférentiellement associée à une réponse immunitaire Th1 dans les lésions de sarcoïdose. La protéine inductible par l'IFN- γ (IP)-10 ou le ligand de la chimiokine (motif CXC) (CXCL)10, impliquée dans le recrutement des neutrophiles et des lymphocytes, est particulièrement augmentée chez les sujets atteints de sarcoïdose (Miotto et al., 2001).

Les Th2 jouent un rôle dans la présentation des allergènes, favorisent l'immunité contre les parasites par la production d'IL-4, IL-5 et IL-13, et sont régulées par le facteur de transcription GATA3 (*GATA binding protein 3*). Ils interviennent également dans les mécanismes fibrosants (Zhang and Zhang, 2020). Le rôle des Th2 dans la progression de la sarcoïdose est activement étudié.

Les cellules Th17 sont caractérisées par leur capacité à produire de l'IL-17A. Elles sont également identifiées par leur expression du facteur de transcription ROR γ t. Ces cellules sont impliquées dans de nombreuses maladies inflammatoires et auto-immunes. L'accumulation des Th17 dans le sang, le LBA et leur expression combiné à une sécrétion accrue de l'IL-17A dans les granulomes de sarcoïdose, indique l'implication des Th17 dans l'induction et/ou le maintien du granulome. Il a été montré que la protéines mycobactériennes ESAT-6 et mKatG peuvent induire la production d'IL-17 dans les cellules du LBA de patients atteints du syndrome de Löfgren, la forme aiguë de sarcoïdose connue pour avoir un pronostic particulièrement bon (Ostadkarampour et al., 2014). Les Th17 produisent également de nombreuses autres cytokines ou chimiokines telles que l'IL-17F, l'IL-22, l'IL-26, l'IFN- γ et le CCL20 (Boniface et al., 2008). Les Th17, stimulés par l'IL-1 β sécrétée par les macrophages activés, les monocytes et

les LT, produisent simultanément l'IL-17 et l'IFN- γ et co-expriment les facteurs de transcription ROR γ t et T-bet. Cette double expression combine le potentiel pro-inflammatoire des Th1 et Th17, d'où la nomenclature Th17.1. Il est de plus en plus établi que les cellules Th17.1 jouent un rôle central dans la sarcoïdose. En effet, une augmentation du nombre de cellules Th17.1 est observée dans le sang périphérique, le LBA et les ganglions lymphatiques médiastinaux des patients atteints de sarcoïdose (Broos et al., 2018; Richmond et al., 2013; Tøndell et al., 2014). Une étude a montré que les cellules Th17.1 (et non les cellules Th1) sont les producteurs prédominants d'IFN- γ dans le LBA des patients atteints de sarcoïdose, remettant en question l'hypothèse dominante du paradigme Th1 dans la pathogenèse de la sarcoïdose (Ramstein et al., 2016). De plus, il a été montré que la proportion des cellules Th17.1 est plus élevée dans le sang des patients atteints de sarcoïdose présentant une altération de la fonction pulmonaire définie par la réduction de la CVF ou de la DLCO (diffusion pulmonaire au monoxyde de carbone) absolue de 10 % ou 15 % (Arger et al., 2020). Cependant, une étude a rapporté qu'un nombre plus élevé de cellules Th17.1 est corrélé avec un pronostic plus favorable de la maladie (Kaiser et al., 2016). Des recherches plus approfondies sont nécessaires pour déterminer si le rôle des cellules Th17.1 dans le développement de la sarcoïdose est plutôt délétère ou protecteur.

Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) sont identifiés par leur expression de l'IL-2R (CD25) et du facteur de transcription FOXP3. Ils ont un rôle important dans la régulation négative de la réponse immunitaire. Le rôle des cellules Tregs dans la pathogenèse de la sarcoïdose reste controversé. Dans un modèle *in vitro* de formation de granulomes, des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) sont co-cultivées avec des billes recouvertes d'extraits de Bacille Calmette Guerin (BCG). L'épuisement des cellules Treg dans ce modèle accélère la formation de granulomes chez les individus sains et chez les patients atteints de sarcoïdose inactive, alors qu'il ne modifie pas la formation de granulomes chez les patients atteints de sarcoïdose active, indiquant une capacité suppressive altérée des cellules Treg dans la sarcoïdose active (Taflin et al., 2009). Le nombre de cellules Treg est diminué à la fois dans le sang et dans le LBA des patients atteints de sarcoïdose, avec une expression plus faible de FoxP3 dans les cellules LBA (Idali et al., 2008). À l'inverse, certaines études révèlent une proportion plus élevée de cellules Treg dans le sang périphérique et le LBA des patients atteints d'une sarcoïdose chronique mais avec une capacité de suppression altérée. La restauration de la fonction des cellules Treg semble être associée à une résolution clinique spontanée de la sarcoïdose. Les cellules Treg du LBA provenant de patients atteints de sarcoïdose subissent des

amplifications importantes et expriment fortement l'IL-4, avec une activité répressive altérée (Broos et al., 2015b; Oswald-Richter et al., 2013; Rappl et al., 2011). Jusqu'à présent, nous ignorons quels mécanismes sont responsables du dysfonctionnement des cellules Treg dans la sarcoïdose.

D'autres cellules immunitaires pourraient être impliquées dans le développement de la sarcoïdose comme une augmentation des lymphocytes T CD8+ exprimant la perforine et des granzymes, associée à des formes non résolutive ; les cellules dendritiques, les neutrophiles, les *natural killer T cell* (NKT), les *T follicular helper* (Tfh), ou les lymphocytes B. Néanmoins, les données concernant ces populations sont rares et peu claires au cours de la sarcoïdose (Zhou and Arce, 2020).

2.3.2 Formation du granulome

Le granulome sarcoïdien est un processus dynamique issu d'une réaction immunitaire cellulaire spécifique et exagérée dirigée contre un antigène encore inconnu, d'élimination lente chez des sujets prédisposés. Cette réaction immunitaire met en jeu des cellules présentatrices d'antigènes (principalement des monocytes et macrophages) et des lymphocytes recrutés grâce à de nombreuses chimiokines produites par les macrophages. Ces cellules immunitaires interagissent directement par des contacts membranaires et par le biais de nombreux médiateurs (Broos et al., 2013) (Figure 7). Il en résulte une amplification de la réponse immunitaire et un recrutement continu de nouveaux monocytes aux sites des lésions. Ces monocytes pénètrent en périphérie des granulomes où ils débutent leur maturation, puis migrent vers le follicule central et se différencient en macrophages qui à leur tour forment des cellules épithélioïdes et des cellules géantes multinucléées regroupées en sous unités centrées par des lymphocytes (Soler and Basset, 1976). Il faut souligner que la localisation centrale des macrophages dans l'agrégat épithélioïde soutient un rôle important dans la présentation de l'antigène au site de formation du granulome.

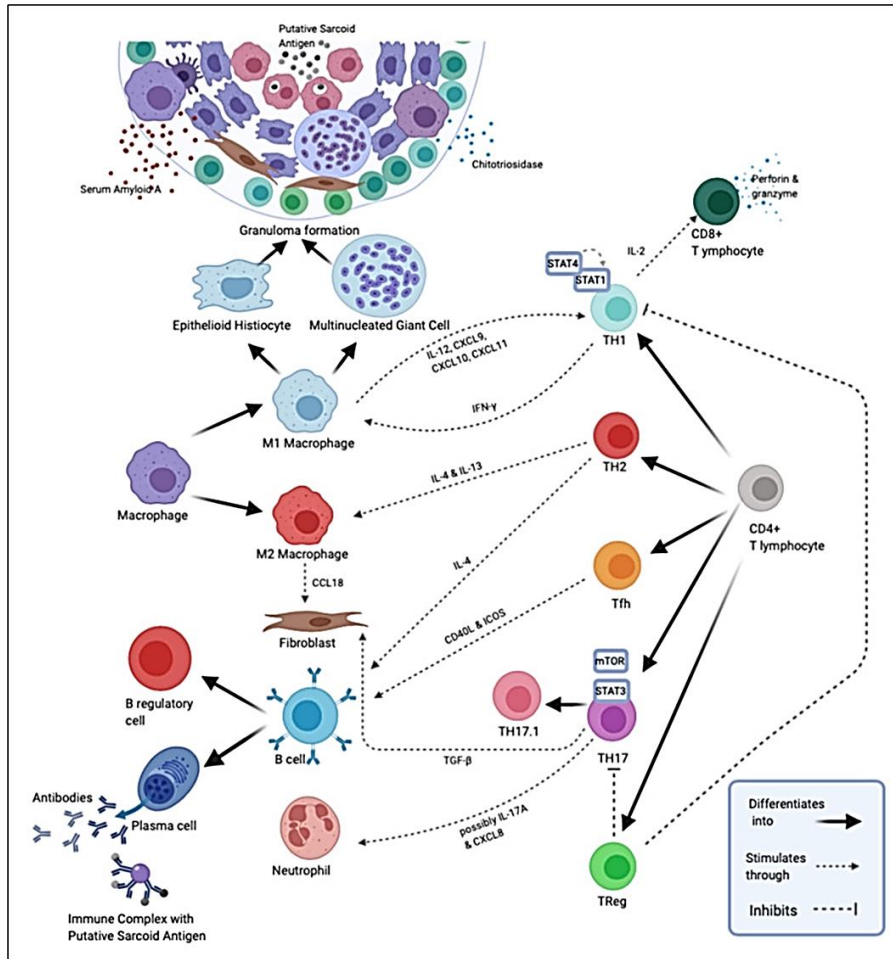


Figure 7 : Aperçu des biomarqueurs sériques et liquides du LBA, produits par les cellules immunitaires au cours du développement du granulome de sarcoïdose.

En fonction du microenvironnement cytokinique, les LT $CD4^+$ se différencient en Th1, Th2, Tfh, Th17, Th17.1 et Treg. Les Th1, Th17 et Th17.1 produisent des marqueurs inflammatoires (l'IFN- γ , l'IL-17A et l'IFN- γ /IL-17A, respectivement). Grâce à la production d'IL-2, le sous-type Th1 aide les LT $CD8^+$ à se différencier en effecteurs cytotoxiques qui produisent des biomarqueurs de l'inflammation (la perforine et le granzyme), tandis que les Th17 attire les neutrophiles via l'IL-17A et le CXCL8, contribuant davantage à la production de marqueurs inflammatoires. Les Th2 et Th17 peuvent sécréter respectivement l'IL-4/IL-13 et le TGF- β 1, qui sont des biomarqueurs de la fibrose. Grâce à l'expression de CD40L et d'ICOS (*inducible T cell costimulator*), les Tfh stimule les cellules B à se différencier en plasmocytes qui sécrètent des anticorps contre les antigènes. Les macrophages M1 libèrent des biomarqueurs inflammatoires (SAA (*serum amyloid A*), CTO, l'IL-12, CXCL9, CXCL10 et CXCL11), tandis que les macrophages M2 produisent des biomarqueurs de fibrose (CCL18 et le TGF- β 1). Adapté de (Zhou and Arce, 2020)

2.3.2.1 Installation de l'inflammatoire granulomateuse

L'inflammation chronique contribue à la formation et à la persistance du granulome. Il a été suggéré que les phases initiales de la formation du granulome sont soutenues par la

polarisation immunitaire Th1 / M1, qui est un état de TNF- α et INF- γ exagérés (Zissel and Müller-Quernheim, 2015). En effet, les cytokines inflammatoires TNF- α , INF- γ , *Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1 α* et IL-12 sont toutes élevées dans le liquide de LBA des patients atteints de sarcoïdose, indiquant un état pro-inflammatoire (Moller et al., 1996). De plus, des niveaux élevés de cellules CD40⁺, un marqueur des macrophages M1, ont été détectés dans le LBA des patients atteints de sarcoïdose (Wojtan et al., 2016). Les macrophages alvéolaires dans la sarcoïdose produisent abondamment plusieurs cytokines telles que l'INF- γ , MIP-1 α , *granulocyte-macrophages colony-stimulating factor (GM-CSF)*, ainsi que des chemokines CCL15, *macrophage stimulating protein (MSP)* (stimulant la phagocytose), *monocyte chemoattractive protein-1 (MCP-1)* ou *regulated on activation normal T cell expressed and secreted (RANTES)* (Arakelyan et al., 2009; Oltmanns et al., 2003; Petrek et al., 2002). Les monocytes et macrophages sécrètent également des chimiokines de type CXCL9, CXCL10, CXCL11 qui attirent les Th1. Les chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11 sont induites par l'INF- γ qui se lie au récepteur de chimiokine CXCR3, une molécule exprimée préférentiellement par les Th1. Les chimiokines CXCL9 et CXCL10 sont significativement élevés dans le LBA des patients atteints de sarcoïdose et les niveaux de ces deux chimiokines sont fortement corrélés à l'augmentation du nombre des Th1 dans les poumons enflammés. Les macrophages alvéolaires, les cellules géantes multinucléées et les histiocytes épithélioïdes dans les poumons de sarcoïdose sécrètent également les deux chimiokines indiquant un recrutement actif des cellules immunitaires dans le tissu inflammé (Nishioka et al., 2007). En retour, les lymphocytes, par la sécrétion d'INF- γ , diminuent l'apoptose des macrophages en augmentant l'expression de p21/Waf1 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1*), qui bloque le cycle cellulaire (Xaus et al., 2003). De plus, les macrophages participent à l'activation des lymphocytes et à la sécrétion des cytokines en modulant l'expression de leurs molécules HLA et récepteurs TLR, dont les polymorphismes peuvent être liés à des formes chroniques de la maladie (Grunewald and Eklund, 2009; Pabst et al., 2006; Sato et al., 2010). Des dérégulations des voies de signalisation du macrophage, telles que la voie mTOR, les voies de l'inflammasome, JAK /STAT, celle du *peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ)* ou *interleukin- 1 receptor-associated kinase 2 (IRAK2)* et *receptor-interacting serine/threonine-proteine kinase 2 (RIP2)* pourraient contribuer à l'inflammation chronique et à la persistance des granulomes (Culver et al., 2004; Huppertz et al., 2020; Linke et al., 2017; Talreja et al., 2016; Wang et al., 2020). Les macrophages alvéolaires des patients atteints de sarcoïdose montrent une déficience dans la voie de PPAR γ , facteur de transcription régulant les gènes de l'adipogénèse et induisant une réponse anti-inflammatoire (Culver et al., 2004). Une diminution de ABCG1 (transporteur

ABC du cholestérol régulé par PPAR γ) a également été observée dans les macrophages alvéolaires de patients, ce qui pourrait conduire à une accumulation de cholestérol intracellulaire et à une inflammation (Barna et al., 2016).

2.3.2.2 Mécanismes de pérennisation

Plusieurs études ont montré l'existence d'une importante relation entre les cellules Treg et Th17 dans la sarcoïdose. Le ratio Th17/Treg dans le sang et le LBA est élevé en cas de forme active, mais diminue en cas de traitement (Huang et al., 2013). Une élévation du ratio Th17/Treg dans le sang périphérique est liée aux rechutes de sarcoïdose après l'arrêt de la corticothérapie, tandis qu'une diminution de ce ratio indique une rémission (Liu et al., 2016). Le déséquilibre Th17/Treg pourrait résulter d'une augmentation de l'apoptose des Tregs dans les formes actives ou à des altérations de récepteurs de surface qui régulent l'activation des lymphocytes T comme CTLA4 ou ICOS. Le CTLA4 est exprimé par les lymphocytes T et transmet un signal inhibiteur. Une diminution de son expression a été observée sur les Th17 et les Tregs dans les ganglions de patients atteints de sarcoïdose (Broos et al., 2015a). La diminution de CTLA4 sur les Th17 pourrait augmenter leur prolifération et réduire l'effet suppresseur des Tregs, car CTLA4 est crucial pour leur fonction répressive (Walker and Sansom, 2011). D'autre part, ICOS est une protéine de la membrane lymphocytaire qui favorise préférentiellement la production d'IL-10, augmentant ainsi l'efficacité des Tregs. Les patients atteints du syndrome de Löfgren ont montré des niveaux plus élevés de ICOS sur leurs Tregs (Sakthivel et al., 2016). Ces observations suggèrent que l'intégrité fonctionnelle des Tregs est indispensable pour résoudre l'inflammation granulomateuse.

La persistance du granulome pourrait être associée à une réponse immunitaire inefficace, caractérisée par un épuisement de la réponse T. Une présentation antigénique défectueuse, une stimulation inadéquate des lymphocytes ou leur dysfonction, peuvent entraver la génération des clones T efficaces. Cela entraîne une absence de dégradation de l'antigène, favorisant ainsi la poursuite de la croissance des granulomes. Dans les formes persistantes de la maladie, contrairement aux formes résolutive, il a été observé un « épuisement » des lymphocytes TCD4⁺ dans le LBA et le sang. Cet épuisement se caractérise par une diminution de la prolifération des LT, une augmentation de leur apoptose et une augmentation de l'expression de PD-1 et de CTLA4. La stimulation du TCR dans les formes persistantes entraîne une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , ou IL2) par rapport aux formes résolutive (Hawkins et al., 2017; Lee et al., 2011b; Oswald-Richter et al., 2013). Cette

diminution de la réponse est associée à une diminution de la *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase* (Lck), de la protéine kinase C- θ et de NF- κ B, médiateurs clefs de la transcription de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-2 (Oswald-Richter et al., 2013). De même, la diminution de la sous unité p65 de NF- κ B sur les lymphocytes T a été retrouvée dans des formes fibrosantes pulmonaires et associée à des atteintes chroniques actives. L'interaction de CD40L, exprimé sur les LTCD4+, et CD40, présent sur les macrophages, stimule l'activation du LTCD4+, induit la production d'IL-12, ainsi que la différenciation Th1. Chez les patients présentant une forme chronique, les LT présentent une faible expression de CD40L, possiblement en raison de faibles niveaux du *Nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) (Lee et al., 2011b).

Il a été suggéré qu'une transition d'une signature de cytokine Th1 à une signature de cytokine Th2 pourrait se produire dans la sarcoïdose chronique, probablement en réponse à une inflammation persistante (Teirstein and Morgenthau, 2009). Il a été montré dans le sang périphérique des patients atteints de sarcoïdose une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'*IL-13*, qui est l'une des cytokines clés des cellules Th2 (Hauber et al., 2003). D'autres études ont montré une association entre la surproduction de cytokines sécrétées par les Th2 (IL-4 et IL-13) et l'activation et la différenciation des macrophages tissulaires préférentiellement en cellules M2 (Locke et al., 2019; Shamaei et al., 2018). Ces cellules contribuent au développement et au maintien des sites d'inflammation chronique et au processus fibrotique (Pechkovsky et al., 2010).

2.3.3 Évolution fibrosante

Le processus fibrotique résulte d'une activation et d'une prolifération des fibroblastes, entraînant la production des composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène. Les mécanismes conduisant au développement de la fibrose dans la sarcoïdose sont très peu étudiés, les études étant principalement axées sur la compréhension des mécanismes des phases précoces ou ceux de la pérennisation du granulome. Le processus fibrotique est présumé être la conséquence d'une inflammation granulomateuse chronique. Cependant, seul un petit nombre de patients atteints de sarcoïdose développent une fibrose, ce qui suggère que des mécanismes autres que ceux sous-jacents à l'inflammation granulomateuse sont impliqués dans son développement.

Dans la sarcoïdose, les macrophages et les cellules qui en dérivent (les cellules épithélioïdes et les cellules géantes), sont impliquées dans le développement du processus fibrotique. Les facteurs produits par ces cellules attirent les fibroblastes, augmentent leur prolifération et la production de collagène. Ces facteurs incluent des cytokines telles que l'IL8, le TGF- β 1, l'IL4, l'IL-13 et d'autres cytokines alimentant la voie TGF- β 1 : l'IL-1 β , l'IL-17A, l'IFN- γ et éventuellement le TNF- α (Marshall et al., 1996). Alors qu'au début de la maladie, le TGF- β 1 produit par les lymphocytes T semble favoriser la résolution du granulome, plus tard dans l'évolution de la maladie, la production de TGF- β par les cellules géantes peut favoriser la fibrose (Limper et al., 1994; Zissel et al., 1996). Dans une étude portant sur des patients atteints de sarcoïdose pulmonaire, le taux de TGF- β dans le LBA a augmenté chez les patients atteints de sarcoïdose active ayant subi une rémission spontanée dans les 6 mois, mais se situait dans la plage normale chez les patients présentant une maladie active persistante (Ziegenhagen et al., 2002). Dans une autre étude, le taux de TGF- β était augmenté dans le LBA des patients atteints de sarcoïdose pulmonaire présentant une fonction pulmonaire altérée par rapport à ceux qui avaient une fonction pulmonaire normale. Alors que les polymorphismes de TGF- β 1 sont associés avec des formes de bon pronostic, des polymorphismes de l'isoforme TGF- β 3 sont associés à des formes fibrosantes (Kruit et al., 2006; Pabst et al., 2011). Il existe également des polymorphismes de *GREM1* associés aux formes fibrosantes de sarcoïdose. *GREM1* code pour *Gremlin1* une protéine inhibitrice de *bone morphogenic protein* BMP2 et BMP4 régulateurs de la régénération tissulaire et inhibiteurs des effet profibrotiques de TGF- β (Heron et al., 2011).

Les macrophages activés produisent plus de fibronectine ainsi qu'une chimiokine particulière CCL18, qui stimule la surproduction des composants de la matrice extracellulaire notamment le collagène par les fibroblastes pulmonaires. La surproduction du collagène stimule en retour la production du CCL18 créant un rétrocontrôle positif (Prasse et al., 2006). Des niveaux élevés de facteur 1 α inductible par l'hypoxie (HIF1 α), de PDGF et de VEGF ont également été rapportés dans la sarcoïdose fibreuse, indiquant que certaines voies profibrotiques sont similaires entre la sarcoïdose et la fibrose pulmonaire idiopathique (Tuleta et al., 2018; Tzouvelekis et al., 2012). Des travaux dans notre laboratoire ont détecté HIF1 α et sa cible PAI-1 dans les cellules épithélioïdes des granulomes pulmonaires sarcoïdiens. De plus, ils ont mis en évidence que la réponse pro-inflammatoire (TNF α , IL-1 β , IL-18, CXCL8) et pro-fibrosante (TGF β 1, PDGF-BB, PAI-1, VEGF-A) des macrophages dérivés des monocytes sanguins de patients atteints de sarcoïdose pulmonaire, particulièrement dans les formes actives, est exacerbée en réponse à l'hypoxie. Cette réponse s'accompagne d'une augmentation de

l'activité de HIF1 α (Jeny et al., 2021). Par ailleurs, l'hypoxie semble favoriser la formation des granulomes et la progression vers la fibrose dans des modèles in vivo de granulomatose induite par l'instillation intratrachéale de nanotubes de carbone (Jeny, 2021).

3 La voie de signalisation JAK/STAT

Chez les mammifères, **la voie canonique** *Janus kinases (JAK)/ signal transducers and activators of transcription (STAT)* est l'un des mécanismes de signalisation pour un large éventail de cytokines et de facteurs de croissance. Les protéines JAKs représentent une famille de quatre tyrosine kinase non réceptrices, dont trois kinases ubiquitaires, JAK1, JAK2 et TYK2, et une kinase JAK3 dont l'expression est restreinte aux tissus lymphoïdes et myéloïdes, ainsi que dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires (Gurniak and Berg, 1996; Verbsky et al., 1996). Les facteurs de transcription STAT comprennent sept protéines structurellement et fonctionnellement apparentées (STAT 1 à 4, 5a, 5b et 6). L'identification des protéines STATs comme substrats naturels des JAKs est le résultat de recherches portant sur un crible génétique qui visait à élucider les voies de transmission du signal des interférons α / β et γ . En plus de la voie canonique, il existe **des voies non canoniques** qui incluent une localisation nucléaire des JAKs, ainsi que des mécanismes d'activation des STATs impliquant d'autres kinases en dehors des JAKs (Dawson et al., 2009; Kisseleva et al., 2002; Lobie et al., 1996; Moulin et al., 2003; Rui et al., 2016; Vadivel et al., 2021).

3.1 Cytokines et leurs récepteurs

Plus de 50 cytokines activent la voie JAK/STAT en se liant à leurs récepteurs spécifiques. Contrairement aux récepteurs de facteurs de croissance dotés d'une activité tyrosine kinase, les récepteurs de cytokines n'ont pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque. Selon leur structure, les récepteurs de cytokines sont classés en plusieurs groupes. Les cytokines de type I et II sont celles qui signalent via la voie JAK/STAT (Figure 8). Les cytokines de type II englobent les interférons (IFN α , β , γ , λ , ϵ , κ , ω) et les cytokines de la famille IL-10. Les cytokines de type I incluent un large éventail d'interleukines, d'hématopoïétines et de facteurs de croissance. Il existe trois principales chaînes partagées utilisées par les cytokines de classe I. Il s'agit de la gp130, bêta commune et gamma commune, utilisées respectivement par les cytokines des familles IL-6, IL-3 et IL-2. En plus de celles-ci, il existe deux autres chaînes partagées utilisées

par les cytokines des sous-groupes IL4/13 et IL-12/23. Enfin, il existe les récepteurs homodimères, constitués de deux chaînes identiques telles que celles utilisées par l'EPO, la TPO, la GH, la PRL, la Leptine et le G-CSF.

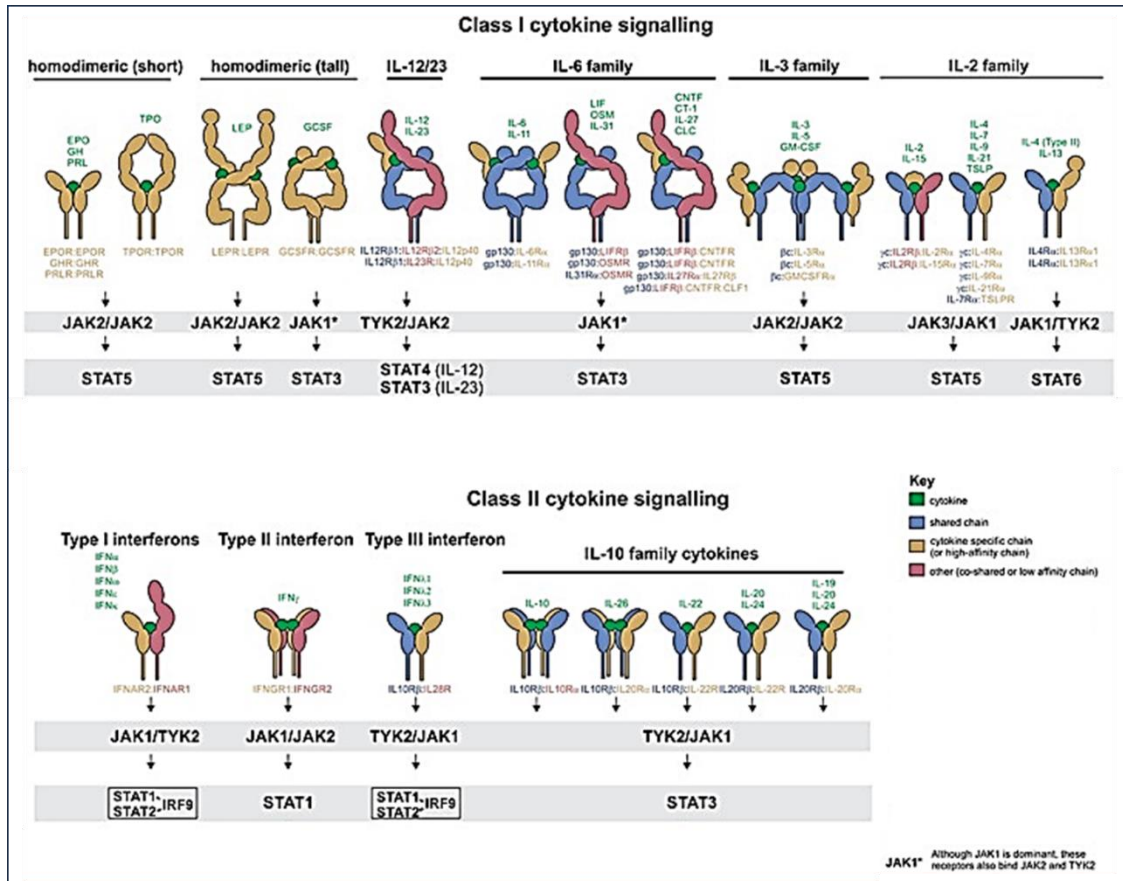


Figure 8 : Représentation schématisée des cytokines activant la voie JAK/STAT.

Les quatre JAKs (JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2) sont sélectivement liés : chaque récepteur est capable de recruter spécifiquement un complexe de deux ou trois JAKs, en majorité des hétérodimères (JAK1-JAK2, JAK1-JAK3, JAK1-TYK2, JAK2-TYK2), mais il peut également exister des homodimères JAK2-JAK2 et des hétérotrimères JAK1-JAK2-TYK2. Adapté de (Morris et al., 2018)

3.2 Les Janus kinases (Jaks)

3.2.1 Structure

Les kinases JAKs sont des protéines de tailles importantes composées de 1000 à 1200 acides aminés et un poids moléculaire de 120 à 130 kDa. La structure de base de tous les JAKs se compose de quatre domaines structuraux composés de sept régions homologues [JH (JAK

homology)1–7] dont l'activité biologique n'a pas été entièrement élucidée (Figure 9). JH1 constitue le domaine kinase fonctionnel et la cible des inhibiteurs de JAKs développés jusqu'à présent, qui entrent en compétition avec l'adénosine triphosphate (ATP) au niveau du site catalytique. Le domaine pseudokinase JH2 est impliqué principalement dans la régulation du domaine JH1. Le domaine *Src Homology 2* (SH2) joue un rôle dans la stabilisation de la conformation structurelle de l'enzyme, tandis le domaine *Four-point-one /Ezrin /Radixin /Moesin* (FERM) est essentielle à l'association des JAKs avec leurs récepteurs apparentés (Hu et al., 2021).

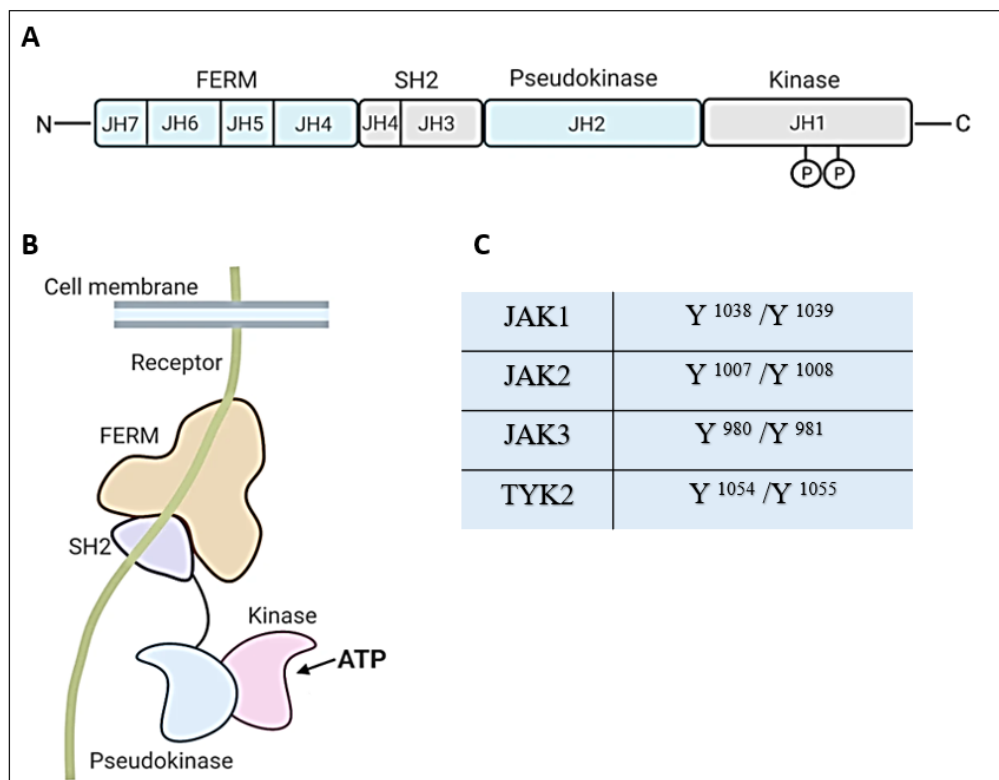


Figure 9 : Structure des Janus kinase (JAK).

Structure linéaire montrant les structures et sites de phosphorylation pour les quatre membres de la famille JAK : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Chacun est composé de sept domaines d'homologie (JH) : le domaine kinase JH1 constitue du site d'activité catalytique et d'inhibition par les inhibiteurs de JAKs ; le domaine pseudokinase JH2 ; le domaine SH2 est composé des domaines JH3 et JH4 ; le domaine FERM est composé des domaines JH5, JH6 et d'une partie du domaine JH4 (A). Représentation schématique de la position de chaque domaine par rapport au récepteur (B). Les sites de phosphorylation de la tyrosine conservés dans JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2 (C). Adapté de (Hu et al., 2021)

Domaine kinase (JH1)

Le domaine kinase JH1 possède les mêmes caractéristiques retrouvées dans toutes les autres protéines tyrosine kinase (PTK) (Hubbard and Till, 2000). L'activité catalytique comprend : la liaison de l'ATP, la régulation de l'activité catalytique par phosphorylation des tyrosines conservées constituant la boucle d'activation (Y1038/Y1039 dans JAK1, Y1007/Y1008 dans JAK2, Y980/Y981 dans JAK3, Y1054/Y1055 dans Tyk2). La boucle d'activation empêche l'accès du substrat au site actif de l'enzyme. À la suite de la phosphorylation des résidus tyrosine catalytiques, un changement de conformation déplaçant la boucle d'activation permettrait l'accessibilité du substrat au site actif. La mutation des résidus tyrosine de la boucle d'activation des JAK engendre différents effets sur leur l'activité catalytique (Leonard and O'Shea, 1998). Par exemple, la mutation de la tyrosine 1007 en phénylalanine de JAK2 inhibe son activité kinase (Feng et al., 1997). Cependant la mutation des tyrosines 1054 et 1055 de la boucle de l'activation de TYK2 engendre seulement une diminution de l'activité catalytique, de même pour la kinase Y980 de JAK3, alors que celle du résidu Y981 l'augmente (Gauzzi et al., 1996). Les mutations dans la boucle d'activation ou dans le site de liaison de l'ATP réduisent la signalisation, mais ne l'abolissent pas complètement. Cependant, les mutations affectant les deux sites simultanément sont nécessaires pour abolir complètement la signalisation (Leonard and O'Shea, 1998).

Domaine pseudo-kinase (JH2)

La présence d'un domaine pseudokinase distingue les JAKs des autres protéines tyrosine kinases. Ce domaine de type kinase possède toutes les caractéristiques structurelles d'une véritable tyrosine kinase, avec la particularité de présenter des altérations au niveau de certains motifs nécessaires à la fonction catalytique. En effet, le motif canonique GXGXXG (présent dans 95% des protéines interagissant avec des nucléotides) du sous-domaine I du domaine JH2 ne possède pas la glycine, ainsi que le résidu acide aspartique situé au niveau de la boucle d'activation, et qui sert d'accepteur de protons dans la réaction catalytique. Le domaine JH2 est aussi dépourvu d'un résidu phénylalanine conservé dans le motif Asp-Phe-Glu du sous-domaine VII, et qui est important pour la liaison avec l'adénine de l'ATP (Frank et al., 1995; Velazquez et al., 1995; Wilks et al., 1991). Bien que son rôle ne soit pas clair, il y a de plus en plus de preuves qu'il régule l'activité du domaine kinase JH1. Par exemple, la délétion de ce domaine entraîne une activation constitutive de JAK2. Cependant, la même mutation chez JAK3 et TYK2 ne conduit pas à une hyperactivation de ces deux kinases (Candotti et al., 1997;

Luo et al., 1997; Yeh et al., 2000). En effet, dans les cas de Polycythaemia vera, il y a présence de tumeurs présentant la mutation V617F dans le domaine JH2 de JAK2 chez plus de 80% des patients atteints. Cette mutation engendre une phosphorylation constitutive des tyrosines catalytiques de JAK2 (James et al., 2005a). De plus, il semble que cette mutation spécifique ait été retrouvée dans d'autres types de désordres myéloprolifératifs. D'autre part, il a été montré que le domaine JH2 de JAK2 est capable de phosphoryler le domaine kinase JH1 sur les résidus Ser523 et Tyr570. La phosphorylation de ces résidus permet la régulation du domaine kinase JH1 en conservant un niveau d'activation basal, ainsi empêchant une activation aberrante en l'absence de cytokines (Argetsinger et al., 2004; Mazurkiewicz-Munoz et al., 2006).

La région N-Terminale (JH3-JH7)

La région N-terminale des JAK comprend les domaines d'homologie (JH) 3 à 7, est composée de 550 acides aminés et est relativement variable entre les différents membres de cette famille de protéines (Kisseleva et al., 2002). Le domaine N-terminal a été impliqué dans l'association aux récepteurs et semble jouer un rôle important dans la détermination de la spécificité de cette liaison (Leonard and O'Shea, 1998). Des études sur des protéines recombinantes des parties N-terminales ont montré que pour JAK2 et JAK3, seules les domaines JH6 et JH7 étaient nécessaires pour lier leurs récepteurs respectifs (Chen et al., 1997; Kohlhuber et al., 1997). La fixation de TYK2 sur l'IFNAR1 nécessite les domaines JH5-7 (domaine FERM) (Yan et al., 1998). Toute la région N-terminale, JH3-7 (SH2-like et FERM), est impliqué pour l'interaction entre JAK1 et le récepteur à l'interféron gamma (Kohlhuber et al., 1997). Ces données de liaison ont mis en évidence la « non-exclusivité » des interactions entre les JAKs et les récepteurs aux cytokines.

3.2.2 Fonction

La voie JAK/STAT est impliquée dans plusieurs processus biologiques, principalement dans la régulation du système immunitaire (Owen et al., 2019). Un dysfonctionnement de cette voie de signalisation peut engendrer des maladies inflammatoires, une érythrocytose, un gigantisme et un éventail de leucémies. Classiquement, les données sur les souris knock-out ont été cruciales pour définir les fonctions de chaque kinase JAK (Tableau 2).

3.2.2.1 TYK2

Tyk2 a été le premier membre découvert de la famille JAK. Cette kinase est impliquée dans la signalisation de l'IFN- α/β , l'IL-6, l'IL-10, l'IL-12, l'IL-13, et l'IL-23 (Bacon et al., 1995; Finbloom and Winestock, 1995; Stahl et al., 1994; Velazquez et al., 1995; Watford and O'Shea, 2006; Welham et al., 1995). La déficience en TYK2 entraîne des conséquences différentes chez l'Homme et chez la souris. En effet, les souris *knock-out Tyk2* ont montré des défauts partiels dans la transduction du signal en réponse à l'IFN- α , l'IFN- β et l'IL-12 (Karaghiosoff et al., 2000). L'augmentation de la concentration de l'IFN- α a restauré la signalisation indépendamment de TYK2. Cependant, chez les patients déficients en TYK2, l'ajout de concentrations élevées d'IFN- α n'a pas amélioré l'activation des STATs. Ces patients développent des phénotypes allergiques sévères (Minegishi et al., 2006). Une étude *in vivo* a suggéré le rôle de TYK2 dans la régulation négative de l'inflammation allergique médiée par les Th2, et le maintien de l'équilibre Th1/Th2 (Seto et al., 2003).

Des humains présentant des mutations en TYK2 ont été rapportés dans la littérature et leurs phénotypes varient. Ils sont caractérisés par une forte susceptibilité aux infections provenant de divers micro-organismes, notamment des virus, des champignons et des mycobactéries. Les mutations de TYK2 engendrent une réponse défectueuse à l'IFN- α , l'IL-12, l'IL-10 et l'IL-23 (Minegishi et al., 2006). Cependant, des expériences utilisant un panel d'antagonistes de TYK2 avec divers degrés de sélectivité contre d'autres kinases JAKs confirment que TYK2 est essentiel pour la signalisation de l'IL-12 et de l'IL-23, alors qu'il n'est pas requis pour l'IFN de type I, l'IL-6 et l'IL-10. L'absence de réponse dans les cellules déficientes en TYK2 pourrait également être due à une expression défectueuse des récepteurs des cytokines (Sohn et al., 2013). En effet, le rôle de TYK2 en tant que protéine d'échafaudage pour stabiliser le récepteur de l'IFN α a été décrit dans des études antérieures (Pellegrini et al., 1989; Velazquez et al., 1992). De plus, les patients déficients en TYK2 ont montré une régulation négative de l'IFN- α R1, de l'IL-10R2 et de l'IL-12R β 1, à la surface cellulaire (Kreins et al., 2015). Ces observations suggèrent que TYK2 joue un rôle crucial dans l'expression des récepteurs de surface, ce qui expliquerait l'absence de réponse aux cytokines de liaison aux IFN de type I, à l'IL-10R et à l'IL-12R (Garrido-Trigo and Salas, 2020).

3.2.2.2 *JAK1*

L'expression de JAK1 est partagée par de nombreux types de cellules, car elle s'associe à un grand nombre de chaînes de récepteurs de cytokines, à savoir : les récepteurs de cytokines avec la sous-unité du récepteur γ_c , le récepteur de l'IL-2, le récepteur de l'IL-4, le récepteur de l'IL-7, le récepteur de l'IL-9 et le récepteur de l'IL-15 ; les récepteurs de cytokines de classe II comprennent le récepteur IFN α/β , le récepteur IFN- γ et les récepteurs de cytokines de la famille IL-10 ; et les récepteurs avec une sous-unité gp130, y compris le récepteur de l'IL-6, le récepteur de l'IL-11, le récepteur du facteur neurotrophique ciliaire (CNTF), le récepteur de l'oncostatine M (OSM), le récepteur du facteur inhibiteur de la leucémie (LIF) et le récepteur de la cardiotrophine-1 (CT-1) (Rodig et al., 1998). L'inactivation de *Jak1* chez la souris entraîne une létalité périnatale, une réponse aberrante aux cytokines activant les récepteurs liant JAK1, et une réduction considérable du nombre de thymocytes, de cellules pré-B et de lymphocytes T et B matures (Rodig et al., 1998). Cette lymphopénie a été attribuée à des réponses défectueuses à l'IL-7, cytokine importante dans le développement précoce des lymphocytes (von Freeden-Jeffry et al., 1995).

Un rapport de 2016 décrivait un patient présentant un déficit immunitaire avec susceptibilité aux infections mycobactériennes et ayant développé un cancer avancé de la vessie. Ce patient s'est avéré porteur de deux mutations germinales faux-sens homozygotes dans le domaine pseudokinase JAK1 qui ont altéré la phosphorylation de JAK1 et STAT, entraînant une réponse significativement réduite aux IFN de type I et de type II (Eletto et al., 2016). Néanmoins, l'impact de cette mutation sur d'autres cytokines dépendantes de JAK1, notamment les familles IL-2, IL-6 et IL-10, n'a pas été exploré dans cette étude. Cependant, des réponses altérées à l'IL-2, à l'IL-7 et à l'IL-15 [utilisant toutes le γ_c qui interagit avec JAK1] peuvent avoir contribué à la lymphopénie T progressive observée chez ce patient et altéré le développement des cellules NK et T cytolytiques (Garrido-Trigo and Salas, 2020). En effet, des mutations somatiques de JAK1 ont été identifiées dans plusieurs types de tumeurs. Les mutations susceptibles de provoquer une perte de fonction de JAK1 sont associées à une expression réduite des gènes associés à l'IFN dans différents types de tumeurs, soulignant le rôle clé des réponses médiées par JAK1 dans la surveillance des tumeurs (Albacker et al., 2017; Flex et al., 2008; Ren et al., 2013). De plus, JAK1 est largement impliqué dans les réponses microbiennes [c.-à-d. IL-6, IFN, OSM] et les signaux homéostatiques régulateurs [c'est-à-dire IL-10, IL-22] (Garrido-Trigo and Salas, 2020).

3.2.2.3 JAK2

Semblable à JAK1, JAK2 est impliquée dans la signalisation des membres de la famille des récepteurs gp130, de la famille des récepteurs de cytokines de classe II, de la famille des récepteurs de l'IL-3 (récepteurs IL-3R, IL-5R et GM-CSF) et des récepteurs à chaîne unique (tel que le récepteur de l'EPO, de la GH, de la PRL et de la TPO) (Hu et al., 2021). Les souris knock-out *Jak2* meurent à environ 12 jours de gestation, principalement en raison d'anomalies cardiaque et d'une altération de l'érythropoïèse médiée par l'EPO (Neubauer et al., 1998). De plus, les réponses à d'autres cytokines importantes pour l'hématopoïèse [c'est-à-dire GM-CSF, Tpo, IL-5 et IL-3] sont également altérées. JAK2 est également impliquée dans la signalisation médiée par l'IFN γ et l'IL-12, cette dernière étant une cytokine clé induisant la différenciation Th1. Les fibroblastes de souris *Jak2*^{-/-} étaient défectueux dans la signalisation IFN γ , alors que la signalisation via les récepteurs IFN de type I restait intacte (Bacon et al., 1995).

Alors que l'absence de mutations de fonction ou de délétion n'a pas été rapportée, les mutations de gain de fonction de JAK2 ont été largement documentées et liées aux maladies myéloprolifératives. Des mutations JAK2 ont été identifiées dans la leucémie lymphoïde aiguë (LAL), la leucémie myéloïde chronique (LMC), la néoplasie myéloproliférative (MPN), les lymphomes et les myélomes, mais également dans des cancers solides du sein, de la prostate, de la tête et du cou (Garrido-Trigo and Salas, 2020; Gnanasambandan and Sayeski, 2011). La plupart des mutations JAK2 identifiées à ce jour se produisent dans le domaine pseudokinase, qui participe à la régulation du domaine kinase (Gnanasambandan and Sayeski, 2011). La mutation la plus courante au sein du gène JAK2 est JAK2-V617F, qui conduit à l'activation constitutive de la kinase. Cette mutation est trouvée chez 80 % des patients atteints de polycythémie vraie, un trouble myéloprolifératif acquis associé à une thrombocytose, une leucocytose et une splénomégalie (Garrido-Trigo and Salas, 2020; James et al., 2005b).

3.2.2.4 JAK3

JAK3 était le quatrième et dernier membre de la famille JAK à être découvert. L'expression de JAK3 est limitée aux cellules hématopoïétiques, ainsi son rôle est plutôt limité dans la régulation de la maturation, la survie, l'activation et la différenciation des lymphocytes. JAK3 s'associe exclusivement aux récepteurs γ C, ce qui veut dire qu'elle est impliquée dans la signalisation de l'IL-2R, l'IL-4R, l'IL-7R, l'IL-9R, l'IL-15R et l'IL-21R

(Leonard and O’Shea, 1998). Les souris knock-out *Jak3* présentent une lymphopénie sévère et une dérégulation dans la sélection négative des LT auto-réactifs dû à une réponse déficiente à l’IL-2, à l’IL-4 et à l’IL-7. Par conséquent ces souris sont atteintes d’une immunodéficience combinée sévère (SCID), un groupe de troubles génétiques caractérisés par une déficience sévère du système immunitaire. Cette affection potentiellement mortelle est généralement présentée au cours des premiers mois de la vie par une combinaison d’infections opportunistes. Actuellement, la seule thérapie disponible pour le SCID est la greffe de cellules souches hématopoïétiques (Park et al., 1995; Saijo et al., 1997).

Chez l’Homme, les mutations de JAK3 sont la deuxième forme la plus courante d’immunodéficience sévère chez l’homme. Cette mutation partage le phénotype avec le déficit en IL2RG [γ c], connu sous le nom d’immunodéficience combinée sévère liée à l’X [X-SCID]. JAK3-SCID est une forme autosomique récessive de SCID caractérisée par l’absence de lymphocytes périphériques T et NK (Macchi et al., 1995; Notarangelo et al., 2000; O’Shea et al., 2004). Malgré un nombre normal de lymphocytes B, JAK3- et X-SCID présentent des réponses humorales compromises, avec une activation, une maturation et une commutation de classe d’anticorps altérées des lymphocytes B. Cela peut s’expliquer en partie par l’absence des T-helper, bien que cela provienne également du dysfonctionnement intrinsèque des cellules B causé par des réponses déficientes à d’autres cytokines γ c/JAK3 [IL-4 et IL-21] qui sont d’importants régulateurs de B prolifération cellulaire et changement de classe d’immunoglobuline (Garrido-Trigo and Salas, 2020).

Tableau 2. Résumé des phénotypes engendrés à la suite de l’inactivation des gènes codant pour les kinases JAKs

<i>Knock-out</i>	Phénotype
<i>Tyk2</i>	Souris vivantes, perte de la signalisation de l’IL-12
<i>Jak1</i>	Létalité périnatale, perte de la signalisation des IFNs de type I et II
<i>Jak2</i>	Létalité embryonnaire, déficit érythropoïétique et cardiaque
<i>Jak3</i>	Souris vivantes, immunodéficience combinée sévère (SCID)

3.3 Les STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*)

3.3.1 Structure

Les sept protéines STATs, identifiées chez les mammifères, ont une taille qui varie entre 750 et 850 acides aminés et un poids moléculaire de 90 à 115 kDa. Les STATs partagent des domaines structurels et fonctionnels conservés, ce qui pourrait s'expliquer par le fait qu'ils sont tous issus du même gène primaire. Au cours de l'évolution, la duplication de ce gène, probablement due à un besoin accru de communication cellulaire, aurait rendu possible la formation des autres gènes. Les STATs possèdent plusieurs domaines : le domaine N-terminal, le domaine *coiled-coil* (CCD), le domaine de liaison à l'ADN (DBD), le domaine d'activation transcriptionnelle (TAD) situé en C-terminal, le domaine SH2 et finalement le domaine *linker*.

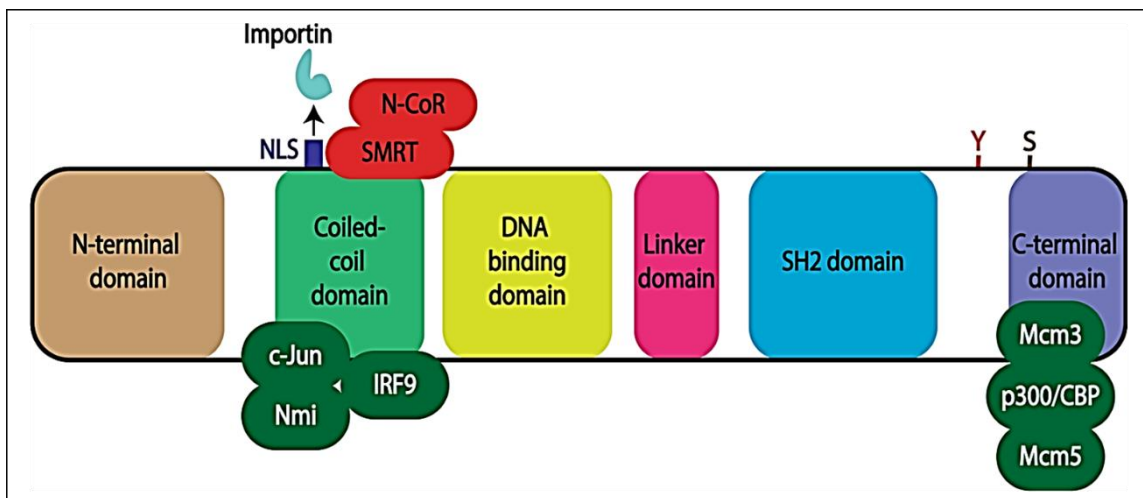


Figure 10 : Structure des protéines STAT.

Illustration schématique des six domaines fonctionnels conservés : *N-terminal*, *coiled-coil*, *DNA-binding*, *linker*, *Src-homology 2* et *C-terminal*. Les positions d'un signal de localisation nucléaire (NLS) et de résidus tyrosine (Y) et sérine (S) phosphorylés en réponse à des stimuli extracellulaires sont indiquées, ainsi que les sites d'interaction de divers co-activateurs transcriptionnels (vert) et co-répresseurs (rouge). Adapté de (Awasthi et al., 2021)

Le domaine N-terminal

Le domaine N-terminal comprend environ 130 acides aminés, constitué de plusieurs hélices alpha formant une structure en crochet (Vinkemeier et al., 1998). Ce domaine médie les interactions entre les molécules STATs facilitant la dimérisation même en l'absence de phosphorylation (Strehlow and Schindler, 1998). Des expériences utilisant des protéines

STATs recombinantes ont révélé un défaut dans la translocation nucléaire et la transcription des gènes. Ces résultats suggèrent que la dimérisation N-terminale favorise la liaison aux éléments GAS, ainsi aux co-activateurs transcriptionnel (Vinkemeier et al., 1996; Xu et al., 1996).

Le domaine coiled-coil (CCD)

Le domaine *coiled-coil* (CCD) est composé de quatre hélices alpha d'environ 135-315 acides aminés (Chen et al., 1998). Il facilite la liaison à d'autres facteurs de transcription et co-activateurs tels que le facteur régulateur p48/interféron 9 (IRF9) et l'interacteur N-Myc et STAT (Nmi), mais aussi aux co-répresseurs tels que le médiateur de silence pour le récepteur de l'acide rétinoïque et le récepteur de l'hormone thyroïdienne (SMART) et le co-répresseur du récepteur nucléaire (N-CoR) (Nakajima et al., 2001; Zhu et al., 1999). Ce domaine est également impliqué dans la translocation nucléaire via un motif de signal de localisation nucléaire (NLS) qui interagit avec les protéines importines pour faciliter l'entrée nucléaire (Brown et al., 2003).

Le domaine de liaison à l'ADN (DBD)

Le domaine de liaison à l'ADN, appelé DBD pour *DNA binding domain*, est formé d'environ 320-480 d'acides aminés. Il est composé de feuillets bêtas enroulés en forme de structures cylindriques similaires à celles des immunoglobulines (Chen et al., 1998). Ce domaine assure la reconnaissance et la liaison à des séquences cibles spécifiques d'ADN (Horvath et al., 1995). GAS est une séquence consensus palindromique TTCN₃-₄ GAA disposés en tandem (environ 6-10 paires de bases de distance) dans les promoteurs de gènes cibles des STATs, permettant ainsi une différence de sélectivité de liaison (Decker et al., 1997).

Le domaine Linker

Le domaine *linker* relie le domaine de liaison à l'ADN, DBD au domaine de dimérisation SH2 (Chen et al., 1998). Il semble que ce domaine ne joue pas un rôle direct sur la translocation nucléaire ou l'activation de la transcription, mais une étude a suggéré son rôle comme étant un support structurel lors de la liaison et l'activation de l'ADN, et sert donc de point de contact lors de la formation de complexes transcriptionnels (Yang et al., 1999).

Le domaine SH2

Le domaine *Src homology2* (SH2) composé d'environ 100 acides aminés, est le domaine le plus hautement conservé au travers des STATs. Il est composé d'un feuillet bêta anti-parallèle, flanqué de deux hélices alpha, qui forment une poche comprenant une arginine conservée. Cette arginine a pour rôle d'interagir avec des motifs phosphotyrosines spécifiques, permettant ainsi de médier les interactions protéine-protéine (Kisseleva et al., 2002; K. D. Liu et al., 1998). En effet, en plus de servir à la dimérisation des STATs par l'interaction entre un domaine SH2 d'un monomère et la phosphotyrosine située à proximité du domaine SH2 de l'autre monomère, il permet également le recrutement des STATs aux différents récepteurs des cytokines, ainsi que leur interaction avec les JAKs activées (Shuai et al., 1993).

Le domaine d'activation transcriptionnelle (TAD)

Le domaine d'activation de la transcription, ou TAD (*transcriptional activation domain*), se trouve en C-terminal des STATs et est très peu conservé. Cette caractéristique explique la possibilité de chacun des membres de réguler différentes réponses transcriptionnelles. Le TAD interagit avec de nombreux co-activateurs transcriptionnels tels que les acétyltransférases *p300/CREB-binding protein* (CBP) et *general control non-repressed protein 5* (GCN5), qui modifient les histones, ainsi qu'avec le facteur de remodelage de la chromatine Brahma (BRM) impliqué dans la modification de la position des nucléosomes, afin de permettre l'accessibilité des facteurs de transcription aux sites de liaison sur l'ADN et régule ainsi l'expression des gènes (Bhattacharya et al., 1996; Huang et al., 2002; Paulson et al., 2002; Shuai, 2000). Un résidu sérine présent dans ce domaine subit une phosphorylation indépendante de celle de la tyrosine dans le but d'augmenter la transcription (Copeland et al., 1995).

3.3.2 Fonction

3.3.2.1 *STAT1*

STAT1 est principalement activé par l'IFN. D'autres cytokines, notamment l'IL-2, l'IL-6, le PDGF, l'EGF, le HGF (*hepatocyte growth factor*), le TNF et l'angiotensine II peuvent également activer STAT1 (Hu et al., 2021). L'une des fonctions biologiques de STAT1 a été révélée en utilisant un modèle de souris déficientes pour *Stat1*. Ces souris présentaient une

sensibilité aux infections malgré un taux normal de leucocytes, ce qui témoigne du rôle essentiel de STAT1 dans la réponse immunitaire. De plus, ces souris étaient plus susceptibles à développer des tumeurs, ce qui illustre également le rôle anti-tumoral de STAT1. Ce dernier rôle est possible grâce à l'implication de STAT1 dans l'apoptose, l'inhibition du cycle cellulaire et la surveillance immunitaire anti-tumorale en agissant sur la présentation antigénique. En effet, STAT1 interagit avec le facteur de transcription et le régulateur majeur de l'apoptose p53, et participe donc à augmenter le niveau d'expression de plusieurs gènes pro-apoptotiques dont ceux codant *Bcl2-associated X protein* (Bax), *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1* (Noxa) et *Fas cell surface death receptor* (Fas) (Stephanou et al., 2000; Xu et al., 1998). STAT1 intervient à plusieurs niveaux dans la régulation du cycle cellulaire. Dans les cellules myéloïdes, en réponse à la trétinoïne (la forme acide de la vitamine A), STAT1 favorise la régulation négative des cyclines A, B, D2, D3 et E, et simultanément la régulation positive des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines P21 et P27, associée à un arrêt dans la phase G0/G1 du cycle cellulaire (Dimberg et al., 2003). En réponse à l'IFN γ , STAT1 participe au processus de présentation antigénique dépendants du CMH, en augmentant l'expression du *Transporter in Ag processing-1* (TAP-1), le CMH I et le CMH II (Chatterjee-Kishore et al., 1998). Dans les LTs, l'activation de STAT1 par l'IFN γ augmente l'expression du facteur de transcription de T-bet, contribuant ainsi à l'orientation d'une différenciation Th1 (Ma et al., 2010).

3.3.2.2 STAT2

STAT2 est activé par les IFNs de type I (y compris l'IFN- α et l'IFN- β). Un modèle de souris déficient pour *Stat2* a révélé un défaut dans la réponse immunitaire face aux infections virales, et une perte de boucle d'activation autocrine/paracrine d'IFN de type I. Ces observations indiquent le rôle essentiel de STAT2 dans la régulation de la réponse immunitaire (Park et al., 2000). STAT2 est impliqué dans la tumorigenèse, comme en témoigne son expression élevée dans le cancer de l'ovaire, ainsi que son association avec une faible survie globale chez les patients atteints de cancers de l'ovaire et du poumon (Zoya Qureshy et al., 2020).

3.3.2.3 STAT3

Le facteur de transcription STAT3 est activé par les membres de la famille IL-6 (IL-6, IL-11, IL-31, LIF, CNTF, CT-1, OSM, etc.), les membres de la famille IL-10 (IL-10, IL-19,

IL-20, IL-22, IL-24 et IL-26), et IL-21, IL-27, G-CSF, leptine et l'IFN-I (Darnell et al., 1994; Zhong et al., 1994). La délétion de *Stat3* chez la souris induit la mort de l'embryon avant la gastrulation (Takeda et al., 1997). L'activation de STAT3 au cours de la gestation induit la prolifération et l'invasion du tissu utérin maternel par les cellules trophoblastiques, cellules à l'origine du placenta permettant les échanges entre le tissu maternel et l'embryon (Poehlmann et al., 2005). STAT3 présente une grande diversité de fonctions biologiques. Il est principalement impliqué dans la différenciation cellulaire, la croissance cellulaire, l'apoptose, ainsi que la régulation de la réponse immunitaire et l'apparition de tumeurs et de métastases. Il a été montré dans les LT, qu'un déficit en STAT3, a altéré l'expression de ROR γ t et a conduit à une expression élevée de T-bet et de Foxp3. Ceci indique que STAT3 favorise la différenciation des cellules Th17 (Chaudhry et al., 2009). Une autre fonction de STAT3 est sa capacité à activer l'expression des régulateurs de l'apoptose et de la croissance cellulaire, c-fos et c-myc, mais également des gènes activant la transition G1-S comme la cycline D1 ou cdc25A (Jenab and Morris, 1998; Kiuchi et al., 1999; Leslie et al., 2006). De plus, des preuves indiquent qu'une activité anormale de STAT3 favorise la tumorigenèse en partie en régulant positivement l'expression de protéines anti-apoptotiques, telles que Bcl-xL/Bcl-2 et Mcl-1 (Siddiquee and Turkson, 2008). STAT3 est constitutivement activé dans les cellules immunitaires infiltrant les tumeurs. La déplétion de STAT3 des cellules hématopoïétiques déclenche une surveillance immunitaire intrinsèque, qui entrave la croissance tumorale et la formation de métastases (Kortylewski et al., 2005).

3.3.2.4 *STAT4*

Les cytokines qui activent STAT4 comprennent principalement l'IFN de type I, l'IL-12 et l'IL-23. Contrairement aux autres STATs, STAT4 est associé à certaines cellules du système immunitaire, en particulier celles impliquées dans la réponse immunitaire de type Th1, à savoir les LT, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules NK (Miyagi et al., 2007; Thieu et al., 2008). Des études ont montré grâce au modèle de souris knock-out le rôle critique de STAT4 dans la signalisation de l'IL-12. En effet, en réponse à des infections bactériennes et virales, STAT4 est activé dans les LT CD4⁺ principalement en réponse à l'IL-12, induisant l'expression de l'IFN- γ , et favorisant ainsi la polarisation des cellules Th1 (Kaplan et al., 1996b; Thierfelder et al., 1996).

3.3.2.5 STAT5

Les cytokines qui activent STAT5 comprennent principalement l'IL-3, la prolactine et la famille des cytokines IL-2 (y compris l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9 et l'IL-15). De plus, l'EGF, l'EPO, le GM-CSF, la TPO, la GH et les facteurs de croissance dérivés des plaquettes peuvent également activer efficacement STAT5 (Mui et al., 1995; Murray, 2007; Wakao et al., 1995). STAT5 intervient dans la régulation de plusieurs fonctions biologiques, à savoir : la croissance et le développement, le système immunitaire, l'apoptose, et la tumorigenèse. STAT5a était à l'origine appelé facteur de glande mammaire induit par la prolactine. Les souris *Stat5a*^{-/-} présentaient de graves défauts dans le développement des glandes mammaires et la sécrétion du lait (Liu et al., 1997), alors que, les souris *Stat5b*^{-/-} présentaient des défauts dans la production de GH. Les dimères STAT5 sont essentiels à la survie. Les souris déficientes en STAT5a et STAT5b présentaient de graves défauts de développement lymphatique et une létalité périnatale. Cependant, les souris déficientes en tétramères sont viables, alors qu'elles présentaient moins de LT, de cellules NK, une capacité de prolifération altérée des lymphocytes T CD8⁺ et un dysfonctionnement des LTreg (Lin et al., 2017, 2012). Une étude a montré que l'activation de STAT5 induite par l'IL-2 a entraîné une augmentation de FasL, indiquant que l'activation de STAT5 est impliquée dans la mort cellulaire induite médiée par l'IL-2 (Refaeli et al., 1998). Après inoculation de tumeurs à des souris immunodéprimées, les niveaux de STAT5a et STAT5b des LT et LB ont été significativement réduits, indiquant que les niveaux de STAT5 sont liés à la progression tumorale (Pericle et al., 1997). Par ailleurs, STAT5 est impliqué dans la tumorigenèse du sein, et participe principalement au développement précoce du cancer du sein (Shao et al., 2020).

3.3.2.6 STAT6

STAT6 est principalement impliqué dans la transduction des signaux IL-4 et IL-13 (Duetsch et al., 2002). Il est impliqué dans la régulation de l'immunité en favorisant la différenciation Th2. En effet, le modèle de souris *Stat6*^{-/-} présentait de défauts dans la différenciation Th2. Ce défaut était plus important chez les souris *Stat6*^{-/-}, que chez les souris *Il-4*^{-/-}, en raison de la perte supplémentaire de la signalisation IL-13. Les souris *Stat6*^{-/-} stimulées par l'IL-4 ne parviennent pas également à médier l'expression du CMHII, de l'IL-4R, et des IgE (Kaplan et al., 1996a; Shimoda et al., 1996; Takeda et al., 1996). STAT6 induit également l'expression de gènes liés au chimiotactisme des cellules immunitaires. Par exemple, le dimère STAT6 induit l'expression de CCL2, pour le recrutement des cellules T, des macrophages et

des monocytes ; CCL26 pour le recrutement des éosinophiles/granulocytes basiques et des cellules NK ; et CCR6 pour le recrutement des cellules dendritiques, des cellules B, des cellules T (Hu et al., 2021). De plus, l'activation de STAT6 induite par l'IL-4 dans les cellules T peut également inhiber l'expression de $\alpha 4\text{-}\beta 1$ *integrin* (VAL-4), un membre de la famille des molécules d'adhésion des intégrines, inhibant ainsi l'infiltration des cellules T CD8+ dans les tumeurs (Sasaki et al., 2008).

Tableau 3. Résumé des phénotypes engendrés à la suite de l'inactivation des STATs, ainsi que les fonctions biologiques générées par leurs activations

Types de STAT	Cytokines et facteurs de croissance	Phénotypes knock-out	Fonctions biologiques
STAT1	Tous les IFNs, IL-2, IL-6, PDGF, EGF, HGF, TNF, angiotensine II	Souris vivantes, perte de la signalisation des IFNs	- Participer à la réponse antivirale médiée par l'IFN ; - Inhiber la croissance et la différenciation cellulaire ; - Favoriser l'apoptose cellulaire ; - Participer à la surveillance immunitaire anti-tumorale ; - participer au processus de présentation antigénique.
STAT2	IFNI	Souris vivantes, perte de la signalisation des IFNs	- Participer à la réponse antivirale médiée par l'IFNI ; - Impliquer dans la tumorigenèse.
STAT3	Famille IL-6 (IL-6, IL-11, IL-31, LIF, CNTF, CT-1, OSM, CLCF1) Famille IL-10 (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26) IL-21, IL-27, G-CSF, Leptine et IFNI	Létalité embryonnaire	- Favoriser la différenciation Th17 ; - Réguler la croissance cellulaire et l'apoptose ; - Impliquer dans la tumorigenèse.
STAT4	IFNI, IL-12, IL-23	Souris vivantes, perte de la signalisation de l'IL-4	- Favoriser la différenciation Th1.
STAT5a	IL-3, Prolactine, famille de cytokines IL-2 (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 et IL-15)	Souris vivantes, dysfonctionnement des glandes mammaires	- Participer au développement des glandes mammaires ; - Réguler la production de la GH
STAT5b	EGF, EPO, GM-CSF, TPO, GH et PDGF, IL-5	Souris vivantes, perte de la signalisation de la GH	- Favoriser l'apoptose cellulaire ; - Réguler la production de cellules immunitaires ; - Impliquer dans la tumorigenèse.
STAT6	IL-4, IL-13	Souris vivantes, perte de la signalisation de l'IL-4	- Favoriser la différenciation Th2 ; - Induire l'expression des gènes liés au chimiotactisme ; - Induire l'expression du CMHII et des IgE ; - Inhiber la tumorigenèse.

3.4 La voie JAK/STAT dans les cellules immunitaires

Comme cité précédemment, la voie de signalisation JAK/STAT joue un rôle crucial dans la régulation de multiples processus biologiques au sein de diverses cellules immunitaires, notamment des lymphocytes et des macrophages, qui sont essentiels dans la réponse immunitaire (Tableau 4).

Dans les lymphocytes T, la signature TYK2, JAK2 et STAT4 médiée par l'IL-12 est importante pour la différenciation des cellules Th1. En plus de STAT4, STAT1 et STAT5a favorise l'expression de T-bet (O'Shea and Murray, 2008). Les IFNs de type I peuvent également activer STAT4, ce qui implique qu'ils pourraient également réguler la polarisation des cellules Th1 (Crouse et al., 2015). Cependant, leur impact est faible par rapport à l'IL-12, en raison de l'activation transitoire de STAT4 par les IFN de type I. D'autre part, la signature JAK1, JAK3 et STAT6 médiée par l'IL-4 entraîne la différenciation des cellules Th2 (O'Shea and Murray, 2008). Malgré les études mettant uniquement l'accent sur le rôle de STAT6 dans la différenciation des cellules Th2, il est désormais connu que cette polarisation nécessite davantage d'interactions de STAT3 et STAT5A/B en plus de STAT6 (O'Shea and Plenge, 2012). L'IL-2 via l'activation de STAT5a et STAT5b régule positivement l'expression de GATA3 et le récepteur de l'IL-4, favorisant ainsi la polarisation Th2 (Paul, 2010). Concernant les Th17, STAT5A et STAT5B sont d'importants régulateurs négatifs de la différenciation Th17 (Laurence et al., 2007), alors que STAT5b favorise l'expression de FOXP3, et induit donc la différenciation Treg (O'Shea and Plenge, 2012).

Dans les macrophages, la polarisation M2 nécessite l'activation de STAT6 par JAK1, JAK3 médiée par l'IL-4 et par JAK3, TYK2 médiée par l'IL-13. STAT6 favorise à son tour la transcription des gènes liés à M2 tels que *Mrc1*, *Arg1* et *IL-10* (Li et al., 2023; Souza et al., 2013). La polarisation M2 nécessite également l'activation de STAT3 par JAK1 médiée par l'IL-6 (Wang and Sun, 2014). STAT3 est aussi activé par la signature IL-10, JAK1 et TYK2, qui active les gènes liés à M2 et inhibe la production d'IL-6, d'IL-8 et de TNF- α (Jung et al., 2017; Saxton et al., 2021). La polarisation des macrophages M2 est favorisée par les IFNs. L'IFN γ via JAK 1 et JAK2 active STAT1. De plus, l'IFN- α et l'IFN- β , favorisent la formation STAT1-STAT2. Ces STATs activent l'expression des ISGs en se liant à ISRE pour favoriser la polarisation M1 des macrophages (Ivashkiv and Donlin, 2014; Platanias, 2005). De plus, le GM-CSF déclenche la polarisation des macrophages M1 et la production de médiateurs pro-inflammatoires (le TNF- α , l'IL-6, l'IL-12 et l'IL-23) principalement via la voie de signalisation JAK2-STAT5 (Hamilton, 2019).

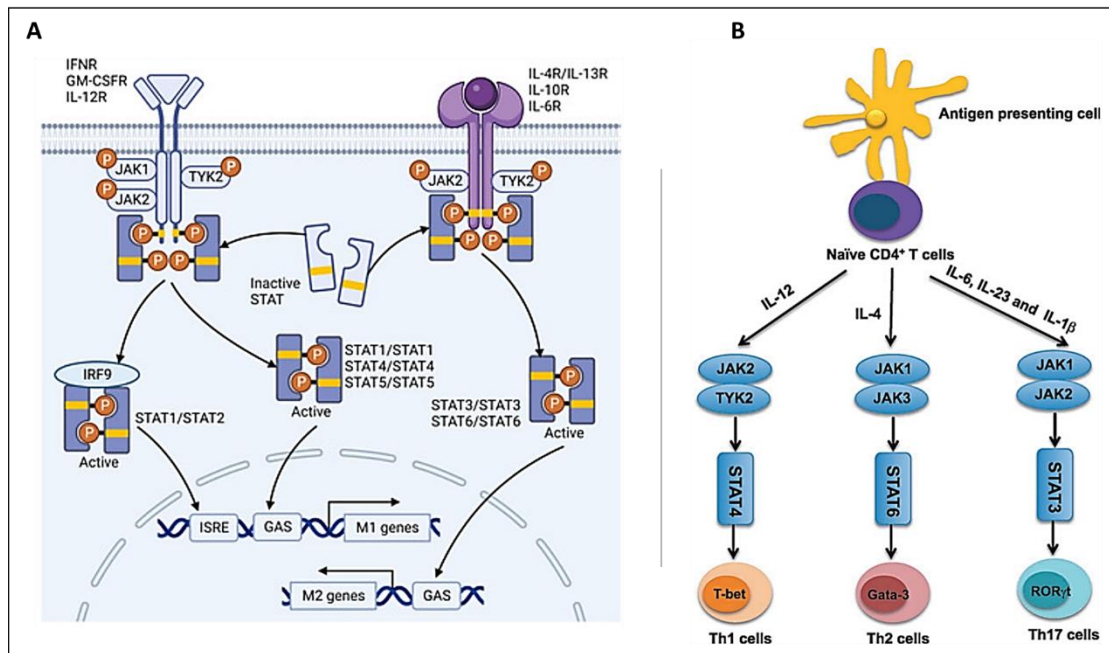


Figure 11 : Signatures JAK/STAT impliquées dans la différenciation des macrophages et des LT helper.

Activation de la voie de signalisation JAK-STAT dans les macrophages. Diverses cytokines telles que IFN- γ , GM-CSF et l'IL-12 favorisent une polarisation M1 via l'activation de JAK1/2 et STAT1/2/4/5 ; tandis que l'IL-4, l'IL-13, l'IL-6 et l'IL-10 favorisent une polarisation M2 via l'activation de JAK1/3/TYK2 et STAT3/6 (A). La différenciation des LT CD4+ en cellules Th1 est induite par l'IL12 via l'activation de JAK2/TYK2 et STAT4 ; la différenciation en cellules Th2 est induite par l'IL-4 via l'activation de de JAK1/3 et STAT6 ; la différenciation des cellules Th17 nécessite l'IL-6 et l'IL-23, qui signalent via JAK1/2 et STAT3 (B). Adapté de (Benveniste et al., 2014; Li et al., 2023)

Tableau 4 : Rôles de la voie JAK/STAT dans les cellules immunitaires

Adapté de (Sarapultsev et al., 2023)

Type de cellule immunitaire	Expression des JAKs	Fonctions
Lymphocytes T (LT)	JAK1, JAK3 (dans une moindre mesure : JAK2, TYK2)	- Impliquées dans la signalisation du TCR ; - Médient la différenciation des LT : Th1 (STAT1/4), Th2 (STAT5/6), Th17 (STAT3/5) et Treg (STAT3/5).
Lymphocytes B (LB)	JAK1, JAK3	- Impliquées dans la signalisation du BCR ; - Favorisent le développement et la maturation des LB.
Cellules Natural Killer (NK)	JAK1, JAK3 (également : JAK2, TYK2 pour le développement NK)	- Impliquées dans la signalisation des récepteurs de l'IL-2 et l'IL-15 ; - Favorisent l'activation, le développement, la survie et la cytotoxicité des cellules NK.
Neutrophiles	Expression des JAKs moins explorée	- Impliquées dans la sécrétion des cytokines ; - Participent à la réponse pro-inflammatoire.
Monocytes	JAK1, JAK2	- Impliquées dans la signalisation des cytokines (IL-6, GM-CSF...) et des facteurs de croissance ; - Régulent l'activation, la différenciation et les réponses immunitaires des monocytes.
Macrophages	JAK1-3, TYK2	- Médient la différenciation des macrophages : M1 (STAT1, NF- κ B), M2a (STAT3/6), M2b (NF- κ B) et M-reg (STAT3).
Cellules dendritiques (CD)	JAK1, JAK2, JAK3	- Pilotent la maturation des CD, la présentation des antigènes et la production de cytokines.

3.5 Activation de la voie canonique JAK/STAT

L'activation de la voie de signalisation JAK/STAT se produit à la suite de la liaison de ligands extracellulaires sur des récepteurs membranaires, induisant l'oligomérisation des sous-unités du récepteur. Pour certains ligands, comme l'érythropoïétine et l'hormone de croissance, les sous-unités réceptrices sont liées sous forme d'homodimères tandis que pour d'autres, comme les interférons et les interleukines, les sous-unités réceptrices sont des hétérodimères.

Les JAKs, via leur domaine N-terminal, sont associés de manière constitutive à un domaine membranaire proximal riche en proline de ces récepteurs de cytokines. L'oligomérisation du récepteur, qui suit la fixation de son ligand, permet trans/auto-phosphorylation des JAKs, qui à leur tour phosphorylent les résidus tyrosine dans les queues intracellulaires des chaînes réceptrices. Ces résidus tyrosine phosphorylés servent ensuite de sites d'accueil pour les protéines STAT, qui se lient via leurs domaines SH2. Les protéines STAT non activées existent sous forme de monomères dans la cellule. Leur activation par phosphorylation de résidus tyrosine conduit à leur dimérisation, sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères. L'interaction en trans entre le domaine SH2 d'un premier monomère STAT et la tyrosine phosphorylée d'un autre monomère STAT permet la formation des dimères STAT:STAT. Ces dimères migrent dans le noyau où ils se fixent sur des séquences cis régulatrices de promoteurs de gènes dont ils contribuent à stimuler la transcription. Ces dimères migrent dans le noyau par un mécanisme qui dépend de l'importine α -5 (également appelée interacteur nucléoprotéique 1) et de la voie d'importation nucléaire de Ran (*Ras-related nuclear protein*). Une fois dans le noyau, les dimères STATs, seuls ou en association à d'autres protéines (comme IRF9 dans la voie de signalisation des interférons de type 1) s'insèrent sur des régions promotrices afin d'induire la transcription de gènes cibles.

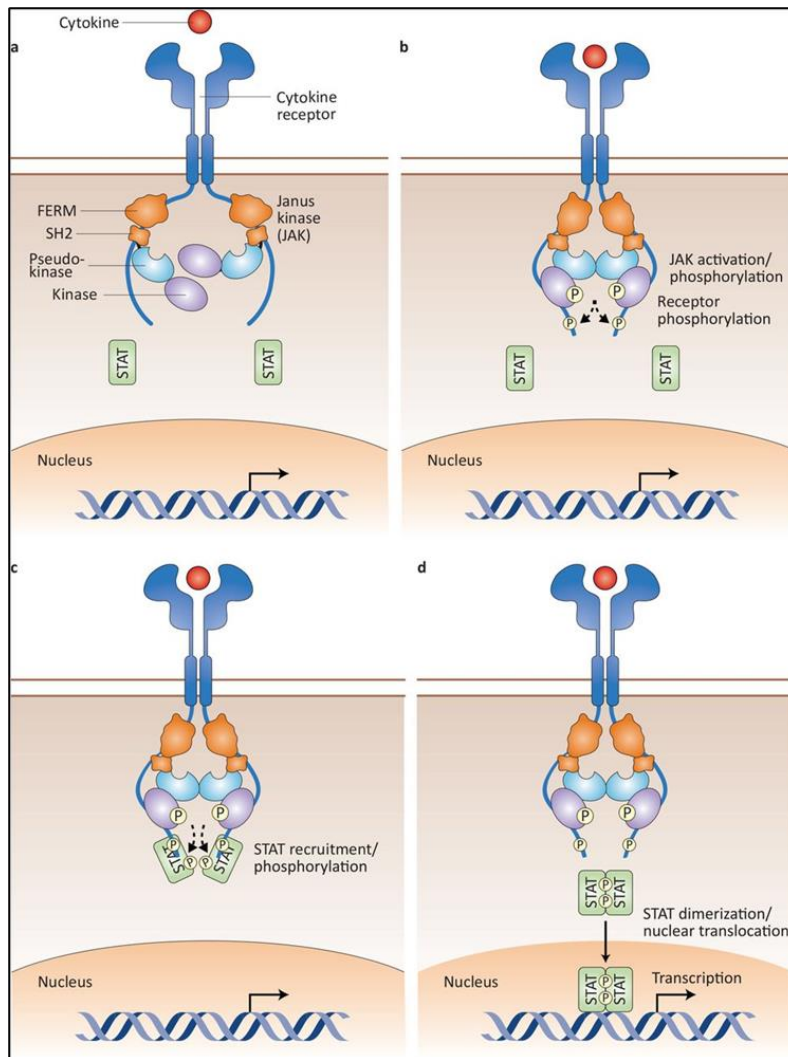


Figure 12 : Activation canonique de la voie de signalisation JAK/STAT.

Les JAKs sont associés de manière constitutive à leurs récepteurs spécifiques via leurs domaines FERM et SH2 (a). Lors de l'engagement des cytokines, les JAK s'activent et se phosphorylent les uns les autres, ainsi que les queues intracellulaires de leurs récepteurs (b). La phosphorylation des chaînes de récepteurs génère des sites d'accueil pour les STAT, qui peuvent se lier au domaine cytoplasmique du récepteur, facilitant la phosphorylation de STAT médiée par JAK (c). Les STAT phosphorylés se dimérisent, se déplacent vers le noyau et se lient à l'ADN, régulant ainsi la transcription des gènes (d). Adapté de (Bonelli et al., 2024)

3.6 Régulation négative de la voie canonique JAK/STAT

La régulation de la voie de signalisation JAK/STAT nécessite l'intervention de différents niveaux de contrôle, et une perte de régulation peut favoriser la tumorigenèse et l'inflammation chronique. Il existe trois principaux types de régulation négative de la voie de signalisation JAK/STAT : les membres de la famille SOCS (*suppressor of cytokine signaling*) /CIS

(*cytokine-inducible SH2 containing protein*), les PTP (protein tyrosine phosphatases) et les PIAS (*protein inhibitor of activated STAT*) (Figure 13).

La famille de protéines SOCS comprend 8 membres soit, SOCS-1 à SOCS-7 ainsi que CIS. Les SOCS sont des inhibiteurs de JAKs phosphorylés et de leurs récepteurs. Ils sont induits par les STATs activés, et forment donc une boucle de rétro-inhibition. Les SOCS peuvent inhiber la voie JAK/STAT par différents moyens. (1) Les protéines SOCS peuvent se lier aux résidus tyrosine phosphorylés des récepteurs ou aux protéines JAKs activées par le biais du domaine SH2. Par conséquent, les protéines SOCS interviennent soit en empêchant la fixation des facteurs STATs aux motifs tyrosine phosphorylés du récepteur ou des JAKs, soit en inhibant directement l'activité catalytique des JAKs en bloquant les tyrosines de leur domaine kinase (Hu et al., 2021). Des expériences de mutagenèse dirigée ont démontré que le domaine SH2 de SOCS1 reconnaît spécifiquement la phosphotyrosine SH2 situé dans la boucle d'activation de JAK2. En plus du domaine SH2, le domaine KIR (*kinase inhibitory region*) qui est un analogue structurel de la boucle d'activation des protéines JAKs permet à la protéine SOCS1 d'agir en pseudo-substrat non phosphorylable en se logeant dans la boucle d'activation de la kinase JAK2, ce qui empêche l'arrivée de l'ATP et/ou des substrats au niveau du site catalytique de la protéine (Yasukawa et al., 1999). Une autre étude a montré que SOCS3 se lie simultanément à JAK et à son récepteur gp130. Une fois que le domaine SH2 de SOCS3 s'est lié au Tyr759 phosphorylé de la gp130, le domaine KIR de SOCS3 se lie au JAK fixé à la gp130, masquant le sillon de liaison au substrat de JAK (Kershaw et al., 2013). (2) Un autre domaine, le motif SOCS-box est également de la régulation négative des JAKs. En effet, ce domaine s'associe aux élongines B et C (impliquées dans le processus de transcription génique en facilitant l'élongation de l'ARNm pendant la transcription). Cette interaction permet le recrutement des éléments du complexe d'ubiquitine ligase E3 et l'ubiquitination des protéines associées, et par conséquent leur dégradation par la voie du protéasome (Okumura et al., 2016).

Les protéines tyrosines phosphatases (PTP) contiennent un domaine SH2, qui leur permet de s'associer aux tyrosines phosphorylées des récepteurs, des kinases JAKs et des facteurs de transcription STATs activés. Cette association entre domaine SH2 et résidus tyrosine phosphorylés induit l'activation enzymatique des PTP et la déphosphorylation des protéines associées grâce au domaine phosphatase (Neel et al., 2003). La protéine TC-PTP (*T cell protein tyrosin phosphatase*) est exprimée dans les cellules hématopoïétiques, reconnaît spécifiquement un motif centré sur un tandem de résidus tyrosine situé dans la boucle d'activation des kinases

JAK1 et JAK3 (Simoncic et al., 2002). La protéine TC45, une isoforme nucléaire de TC-PTP, est chargée de la déphosphorylation des facteurs STAT1, STAT3 et STAT5 dans le noyau cellulaire (ten Hoeve et al., 2002).

Chez les mammifères, la famille PIAS compte 4 membres : PIAS1 (également connu sous le nom de PIASx), PIAS2, PIAS3 et PIAS4 (également connu sous le nom de PIASy). Les protéines PIAS possèdent un domaine SAP (*scaffold attachment factor A/B, acinus, and PIAS*), une structure en doigt de zinc appelée RING pour *really interesting new gene-finger* et une région C-terminale riche en sérine et thréonine. Les PIAS ne se lient qu'aux formes activées des protéines STATs, et présentent une certaine sélectivité de reconnaissance des protéines STATs. Ainsi, les protéines PIAS1 et PIAS4 sont capables d'interagir spécifiquement avec STAT1 et STAT4, alors que PIAS3 interagit uniquement avec STAT3 (Chung et al., 1997; B. Liu et al., 1998). Pour inhiber la voie JAK/STAT, les protéines PIAS utilisent différents mécanismes. (1) Le Blocage de l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription. Par exemple, les protéines PIAS1 et PIAS3 se lient respectivement aux dimères de STAT1 et de STAT3 activés, et inhibent leur fixation à l'ADN (Sonnenblick et al., 2004). (2) Le recrutement des co-suppresseurs de la transcription comme les histones désacétylases, qui modifient la structure de la chromatine, empêchant donc la fixation des STATs sur l'ADN (Tussié-Luna et al., 2002). (3) La chélation des co-activateurs de la transcription (Sachdev et al., 2001). (4) Grâce au domaine RING, les protéines PIAS sont dotées d'une activité E3 SUMO-ligase (*small ubiquitin-related modifier*). Bien qu'il existe des preuves que les STAT peuvent être modifiés par sumoylation, la fonction de cette modification dans la régulation négative n'est pas encore connue (Rogers et al., 2003).

Des modifications chimiques supplémentaires des STAT comprennent l'acétylation, la méthylation et la sumoylation (Stark and Darnell, 2012). Ceux-ci peuvent être globalement divisés en deux catégories : ceux qui favorisent la fonction STAT et ceux qui limitent la fonction STAT. L'acétylation de la lysine 685 et la méthylation de l'arginine 31 peuvent être rangées dans la première catégorie ; il a été démontré que le premier favorise la fonction STAT par des effets sur la dimérisation et l'activité transcriptionnelle, et que le second bloque l'association avec les protéines PIAS (Meissner et al., 2004; O'Shea et al., 2005). Il est généralement admis que la méthylation de la lysine joue un rôle important dans la fonction STAT, bien qu'il y ait un certain désaccord quant à savoir s'il s'agit d'un événement régulateur positif ou négatif (Kim et al., 2013; Yang et al., 2010). La sumoylation a été exclusivement

considérée comme un régulateur négatif, car il a été démontré qu'elle limite la fonction de STAT1 et STAT5 (Begitt et al., 2011; Van Nguyen et al., 2012).

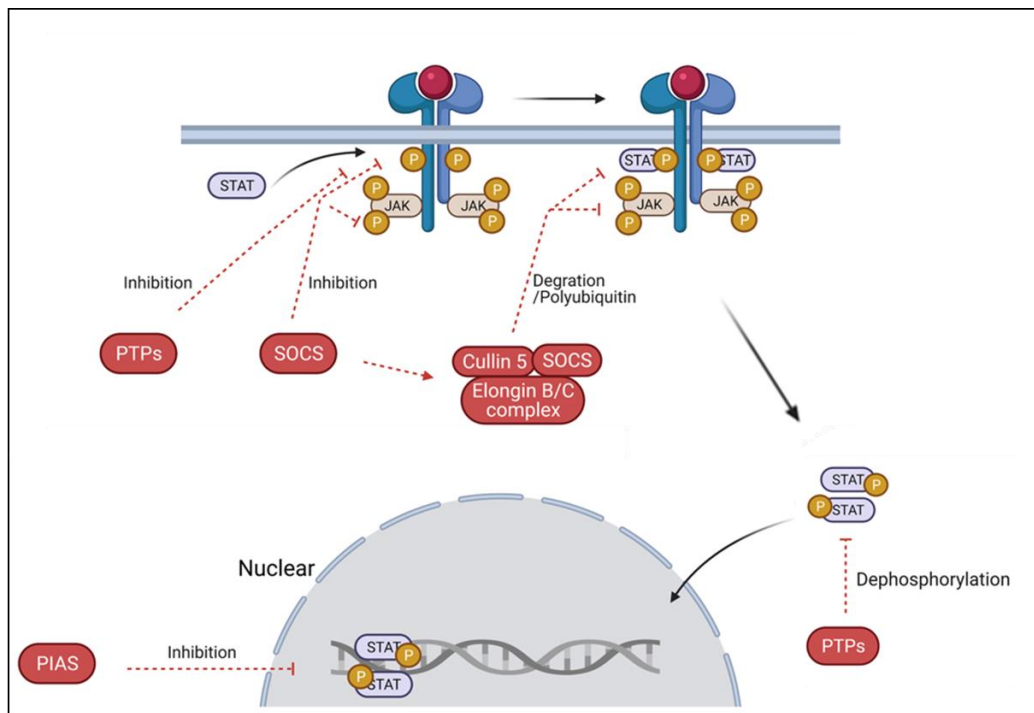


Figure 13 : Régulation négative de la voie de signalisation JAK/STAT.

Les flèches noires indiquent le processus d'activation. Les flèches en pointillés rouges indiquent une régulation négative. Il existe trois principaux types de protéines impliquées dans la régulation négative de la voie de signalisation JAK/STAT : la famille PIAS (inhibiteur de protéine de STAT activé), CIS/SOCS (suppresseur de signalisation des cytokines) et PTP (protéine tyrosine phosphatase). PIAS interagit principalement avec les dimères STAT pour inhiber la liaison de STAT à l'ADN, bloquant ainsi la transduction du signal JAK/STAT. La famille CIS/SOCS régule négativement la voie JAK/STAT de trois manières : (1) en se liant à un récepteur de tyrosine kinase pour bloquer le recrutement de STAT ; (2) se lier directement à JAK pour inhiber son activité kinase ; (3) former un complexe élongine B/C-cullin5 qui dégrade JAK ou STAT lié à la protéine SOCS par polyubiquitination et dégradation du protéasome. Les PTP inhibent la voie JAK/STAT en interagissant avec JAK, STAT, ou des récepteurs pour (1) déphosphoryler le dimère STAT ; (2) interagir avec le récepteur pour déphosphoryler le JAK associé ; et (3) dans le cas du CD45 (un PTP transmembranaire), inhibe la phosphorylation de JAK. Adapté de (Hu et al., 2021)

3.7 La voie non canonique

3.7.1 La voie non canonique pour les JAKs

3.7.1.1 Les preuves de la localisation nucléaire des JAKs

Les JAKs résident principalement dans le cytoplasme. Cependant, des études ont révélé la localisation nucléaire des JAKs dans différents types cellulaires. Des premières études avaient rapporté la localisation nucléaire de JAK2 dans les îlots pancréatiques, les hépatocytes de rat, les cellules COS-7 (cellules de rein de singe), les ovocytes et embryons de souris (Ito et al., 2004; Lee and Duhé, 2006; Ram and Waxman, 1997; Sorenson and Stout, 1995). Une étude a rapporté une localisation nucléocytoplasmique de JAK1 et JAK2 dans les cellules CHO (une lignée cellulaire issue d'ovaire de hamster de chine) et les hépatocytes de rat, ce qui indique leur présence à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme. La stimulation par la GH n'a pas engendré une augmentation du pool nucléaire de JAK1 et JAK2. Cependant, elle a provoqué l'apparition de JAK2 phosphorylé dans le noyau. Cette étude a suggéré que la signalisation de la GH – impliquant habituellement la voie canonique JAK/STAT - entraîne l'activation et la translocation de JAK2 vers le noyau et donc l'activation de JAK2 est nécessaire à son accumulation nucléaire (Lobie et al., 1996).

Les JAKs nucléaires sont impliquées dans divers processus pathologiques. En effet, JAK2 nucléaire a été rapporté dans les cellules hématopoïétiques des patients atteints de néoplasie myéloproliférative présentant la mutation JAK2 V617F. Une corrélation a été notée entre la présence nucléaire de JAK2 et l'expression de l'oncogène *lmo2* (*LIM domain only 2*), du fait que JAK2 est un régulateur positif de *lmo2*. L'inhibiteur sélectif de JAK2 (AG490) inhibe la croissance cellulaire des cellules leucémiques humaines en normalisant les niveaux de *lmo2* et restaurant la localisation cytoplasmique de JAK2. La régulation de la phosphorylation de JAK2 pourrait être l'une des modifications qui contrôlent sa translocation nucléaire, de même que pour les STATs. Le blocage de la translocation nucléaire de JAK2 pourrait ainsi constituer une nouvelle stratégie thérapeutique des néoplasies myéloprolifératives présentant une mutation JAK2 (Rinaldi et al., 2010). Une étude récente a rapporté la localisation nucléaire de pJAK2 dans les biopsies pulmonaires des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) et de PR : la plupart des patients (13/20) atteints de FPI ont exprimé JAK2 activé dans le cytoplasme, et 6 patients ont exprimé JAK2 activé dans le noyau. Tous Les patients (5/5) atteints de PR ont tous exprimé JAK2 activé dans le noyau. Plus précisément, pJAK2 nucléaire a été détecté dans les noyaux des cellules épithéliales, des cellules endothéliales, des fibroblastes dans les biopsies pulmonaires et des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques (Wang et al., 2022). La localisation nucléaire de JAK1 a été détecté dans le lymphome à grandes cellules B (Rui et al., 2016), alors que JAK3 nucléaire a été détecté dans le lymphome cutané

à cellules T (LCT) et dans les cellules T malignes primaires chez les patients atteints du syndrome de Sézary, une variante leucémique du LCT (Vadivel et al., 2021).

3.7.1.2 La translocation nucléaire des JAKs

En général, les mécanismes et les déclencheurs provoquant la translocation nucléaire des JAKs sont mal compris et largement non identifiés. Étant trop volumineux (120-140 kDa) pour simplement diffuser librement entre le cytosol et le noyau, les JAKs nécessiteraient l'implication de la machinerie d'importation nucléaire et par conséquent une séquence NLS. En fait, la localisation nucléaire de JAK1, JAK2 et Tyk2 a été attribuée à un motif de type NLS riche en arginine (Ragimbeau et al., 2001). Cependant, aucune analyse mutationnelle définissant l'importance de la séquence NLS pour la translocation nucléaire des JAKs n'a été rapportée. Un autre partenaire d'association possible pour les JAK est SOCS1, qui lie et inhibe JAK1 et JAK2 et qui contient une séquence NLS (Sakamoto et al., 2000).

La translocation nucléaire des récepteurs de surface cellulaire, avec ou sans ligand lié, offre une autre explication de la présence de JAK dans le noyau. Il a été démontré qu'un certain nombre de récepteurs qui lient JAK1 et/ou JAK2 sur leur région cytoplasmique sont capables de transloquer dans le noyau. Il s'agit notamment des récepteurs de la GH, de la PRL, de l'insuline, de l'EGF, de l'angiotensine II de type 1 (AT1), ainsi que le récepteur de l'IFN γ (Figure 14) (Clevenger et al., 1990; Gual et al., 1998; Johnson et al., 2011; Lobie et al., 1994; Marrero et al., 1995; Olayioye et al., 1999).

D'autres associations possibles pourraient également expliquer la localisation nucléaire des JAKs. Il a été démontré que JAK2 interagit avec Hsp70 (*heat shock 70kDa protein*)/Hsc70 (*heat shock cognate 70kDa protein*) (Sarkar et al., 2001), qui fait la navette entre les noyaux et le cytoplasme (Kodiha et al. 2005). Enfin, une autre étude a montré que l'anoxie peut constituer un facteur déclencheur de la translocation nucléaire de JAK2/STAT5 dans les cellules endothéliales capillaires rétiniennes bovines (Dudley et al., 2005).

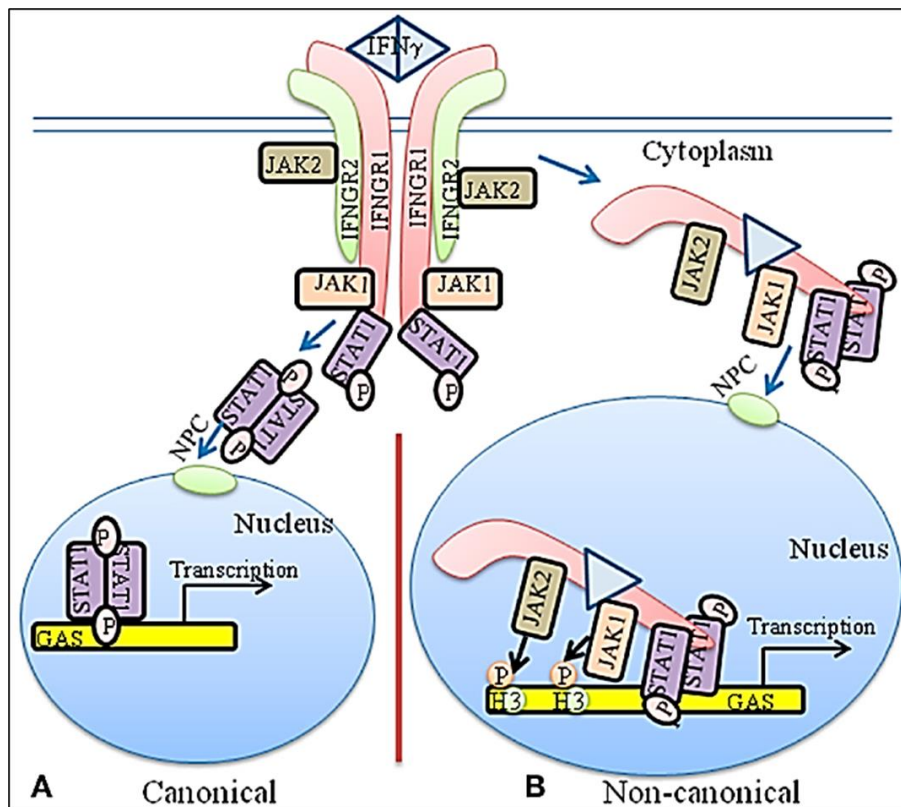


Figure 14 : Voies canonique et non canonique de la signalisation de l'IFN γ .

Dans le modèle canonique la fixation de l'IFN γ sur le récepteur IFNGR, entraîne un changement conformationnel des sous unités IFNGR1 et IFNGR2, permettant le rapprochement et la transphosphorylation des JAKs (JAK1 et JAK2), qui phosphorylent à leur tour le domaine cytoplasmique de l'IFNGR1, constituant les sites de recrutement de STAT1. Le dimère STAT1 formé se dissocie du récepteur et transloque dans le noyau grâce au motif NLS intrinsèque. Une fois dans le noyau, il active les gènes ayant un promoteur GAS (A). Le modèle non canonique implique la translocation nucléaire du complexe IFNGR1/STAT1 α /JAK1/JAK2. L'IFNGR1 joue un rôle de co-facteur transcriptionnel, alors que JAK1 et JAK2 jouent un rôle dans la régulation épigénétique (B). Adapté de (Johnson et al., 2013)

3.7.1.3 Les rôles des JAKs dans le noyau

Plusieurs études ont révélé l'implication des JAKs nucléaires dans la régulation épigénétique. Dans un premier temps, il a été constaté que JAK2 nucléaire phosphorylait l'histone H3 sur Y41 dans les cellules hématopoïétiques. La phosphorylation de H3Y41 empêche la liaison de la protéine d'hétérochromatine 1 α (HP1 α), qui fonctionne dans la répression des gènes hétérochromatiques (Dawson et al., 2009). Les kinases mutantes JAK2 oncogènes peuvent exercer des actions épigénétiques sur la structure de la chromatine dans les néoplasmes myéloprolifératifs en phosphorylant l'arginine méthyltransférase PRMT5 (Liu et al., 2011). Les néoplasmes myéloprolifératifs sont des troubles des cellules souches dans

lesquels la plupart des patients expriment la tyrosine kinase JAK2V617F (ou moins fréquemment les mutations exon12) activée de manière constitutive. JAK2 muté phosphorylait la méthyltransférase PRMT5 dans les cellules HEL, empêchant la protéine 50 du méthylosome (MEP50) d'améliorer l'activité enzymatique de PRMT5 entraînant une diminution de la méthylation globale de l'histone H2A/H4 R3 (Liu et al., 2011).

D'autres études ont montré que les JAKs (principalement JAK2) affectent l'expression des gènes en activant les facteurs de transcription (Helmer et al., 2010; Nilsson et al., 2006). Nilsson et al. ont observé que la PRL induit l'activation de JAK2 dans les noyaux des cellules épithéliales mammaires. JAK2 activé induit la phosphorylation du facteur de transcription NF1-C2 (neurofibromine 1 domaine C-terminal 2). De façon intéressante, l'absence de JAK2 activé dans le noyau engendre la dégradation de NF1-C2 par le protéasome (Nilsson et al., 2006). De plus, JAK2 joue un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire en phosphorylant l'inhibiteur de la kinase cycline-dépendante $p27^{Kip1}$, altérant sa capacité à inhiber les kinases cycline-dépendantes et initiant une cascade d'événements aboutissant à sa dégradation protéasomique (Jäkel et al., 2011). Une exploration approfondie est nécessaire pour comprendre pleinement la signification fonctionnelle de la localisation des JAKs dans les processus cellulaires et les scénarios pathologiques.

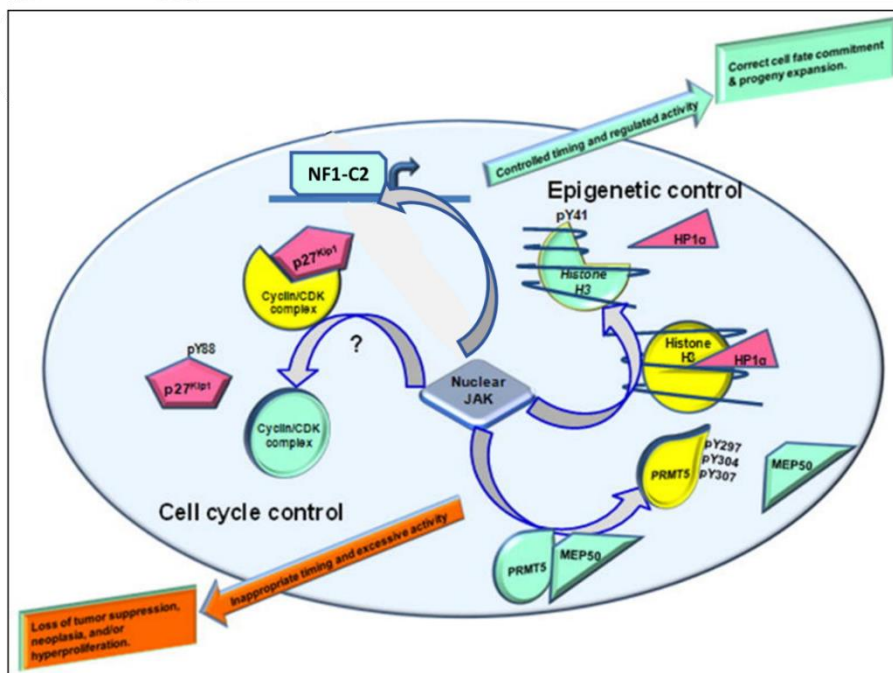


Figure 15 : Rôles des JAKs dans le noyau.

Les JAKs peuvent phosphoryler des substrats nucléaires jouant un rôle central dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire et de l'épigénétique : la PRMT5 (altérant ainsi la liaison avec de son partenaire MEP50), l'histone H3 (afin de déplacer la protéine hétérochromatine répresseur transcriptionnel 1 α (HP1 α)) et l'inhibiteur de la kinase dépendant de la cycline p27^{Kip1}. Les JAKs nucléaires sont capables de phosphoryler des facteurs, notamment le NF1-C2. Une hyperactivité prolongée de JAK dans le noyau, peut induire des dysfonctionnements hyperprolifératifs, des événements de transformation néoplasiques, ainsi que la progression tumorale.

3.7.2 La voie non canonique pour les STATs

Indépendamment des JAKs, les STAT peuvent être impliqués dans d'autres voies de signalisation impliquant l'activation par phosphorylation d'un motif tyrosine (p-Tyr) ou sérine (p-Ser). En effet p-Tyr est activé au niveau de STAT6 par le capteur d'acide nucléique STING (*stimulator of interferon genes*), suscitant ainsi des réponses antivirales. P-Tyr est également activé au niveau de STAT3 par le pyruvate kinase M2 en réponse à des signaux métaboliques (Dawson et al., 2009), alors que p-Ser est activé par les MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), les kinases dépendantes de la cycline et IKK (*I κ B kinase*), entre autres (Kisseleva et al., 2002). De plus, il a été montré que STAT3 peut se localiser dans la mitochondrie, où il favorise la phosphorylation oxydative et la perméabilité membranaire. Cet effet dépend de la sérine, mais pas de la tyrosine, de la phosphorylation et on pense qu'il est pertinent dans les contextes où la respiration cellulaire est altérée, comme le stress cellulaire et le cancer. Tous les autres STAT (à l'exception de STAT4) ont été détectés dans la mitochondrie, mais leur fonction au sein de cet organelle n'a pas été rigoureusement évaluée (Baetz et al., 2008). Certaines récepteurs tyrosine kinases (par exemple, Flt3R) peuvent déclencher l'activation de STAT5 sans impliquer les JAKs (Moulin et al., 2003).

3.8 Inhibiteurs de la voie JAK/STAT

L'inhibition de la voie de signalisation JAK/STAT connaît aujourd'hui un intérêt croissant et constitue une nouvelle stratégie pour le traitement des maladies inflammatoires et auto-immunes. De plus, les patients porteurs de mutations impliquant la voie JAK/STAT présentent très peu (voire pas) de manifestations autres que le déficit immunitaire, ce qui renforce l'intérêt des inhibiteurs de la voie JAK/STAT en tant que médicament. Les médicaments qui ciblent la voie JAK/STAT peuvent être classés en trois types : (1) anticorps contre les cytokines ou les récepteurs, (2) inhibiteurs de JAK, (3) inhibiteurs de STAT (Figure 16).

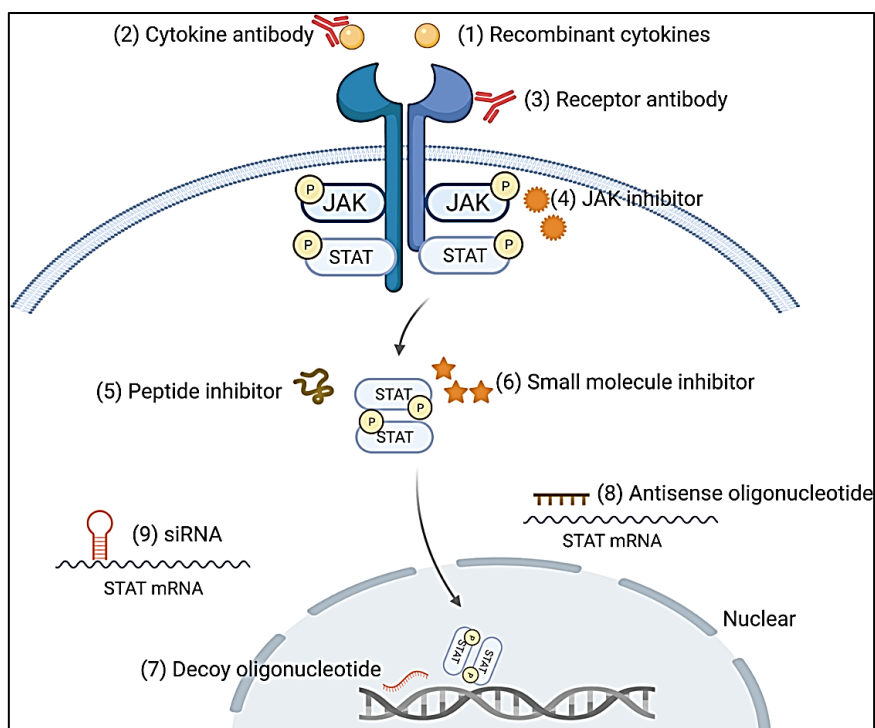


Figure 16 : Cibles thérapeutiques de la voie de signalisation JAK/STAT.

(1) Les cytokines recombinantes, (2) les anticorps contre les cytokines et (3) les anticorps contre les récepteurs sont conçus pour cibler les cytokines ou les récepteurs ; (4) Les inhibiteurs de JAK sont conçus pour cibler les JAK ; et (5) des inhibiteurs peptidiques, (6) des inhibiteurs de petites molécules, (7) des oligonucléotides leurres (ODN), (8) des oligonucléotides antisens (ASO) et (9) des siRNA ciblent les STAT. Adapté de (Hu et al., 2021)

3.8.1 Cytokines recombinantes et anticorps anti-cytokines ou récepteurs

Les cytokines recombinantes sont conçues pour imiter les structures des cytokines natives, dans le but d'amplifier ou inhiber leurs signalisations. Par exemple, dans le contexte des maladies inflammatoires, les cytokines recombinantes peuvent réduire l'inflammation en inhibant les voies produisant les cytokines pro-inflammatoires ou en favorisant la production des cytokines anti-inflammatoires. Les cytokines recombinantes constituent une des méthodes utilisées pour l'inhibition de la voie JAK/STAT dans certaines maladies. En effet, l'IL-2 recombinante est approuvée pour traiter le mélanome métastatique et le carcinome rénal, les IFN de type 1 recombinants sont utilisés pour le traitement du virus de l'hépatite C et le TNF recombinant est un traitement du cancer.

Le blocage des cytokines et de leurs récepteurs par les anticorps a été utilisé avec succès pour traiter des maladies inflammatoires chroniques telles que la PR, la maladie inflammatoire de l'intestin (MII) et le psoriasis. Certains de ces anticorps sont approuvés sur le marché,

comme les anti-IL-2R α , les anti-IL-6R, les anti-IL-5, les anti-IL-6, les anti-IL-12 et les anti-IL-23 (Villarino et al., 2017). L'anticorps anti-IL-2R α , également connu sous le nom de daclizumab, a nettement inhibé la phosphorylation de JAK1, JAK3 et STAT5a/b, réduisant ainsi considérablement le rejet de greffe (Tkaczuk et al., 2002).

Le siltuximab est un anticorps anti-IL-6 et a été approuvé pour le traitement de la maladie de Castleman multicentrique idiopathique (iMCD). Le tocilizumab, un anticorps humanisé anti-IL-6R, a été approuvé pour le traitement de la PR, du syndrome de libération des cytokines et de l'iMCD. Le mépolizumab et le reslizumab anticorps anti-IL-5 et benralizumab anticorps anti-IL-5R sont utilisés dans des maladies telles que l'asthme à éosinophiles, l'œsophagite à éosinophiles, le syndrome hyperéosinophile et la granulomatose à éosinophiles avec polyangéite (Hassani and Koenderman, 2018).

3.8.2 Inhibiteurs de JAK

Un grand nombre d'inhibiteurs de JAKs sont des compétiteurs de l'ATP. La structure des sites de liaison à l'ATP est hautement conservée. Ainsi, ces inhibiteurs ciblent plusieurs membres de JAK (Ferraro and Lupardus, 2017). Néanmoins, il existe certains inhibiteurs (tels que le deucravacitinib) qui ciblent le domaine JH2 de JAK (Burke et al., 2019). **Le ruxolitinib** est le premier inhibiteur de JAKs approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*). Dans un premier temps pour le traitement de myélofibrose (MF) en 2011 (Mascarenhas and Hoffman, 2012). Par la suite, pour le traitement de la polyglobulie vraie, la maladie du greffon contre l'hôte aiguë et chronique (Raedler, 2015; Yang et al., 2021) Le ruxolitinib présente une activité inhibitrice caractérisée par des valeurs IC₅₀ comprise entre 2,8 et 428 nM. Il inhibe préférentiellement JAK1 (IC₅₀ = 3,3 nM) et JAK2 (IC₅₀ = 2,8 nM) (Quintás-Cardama et al., 2010). Un an après l'approbation du ruxolitinib, la FDA a approuvée **le tofacitinib** pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde en 2012 (Coricello et al., 2020). Il a également été approuvé pour le traitement du rhumatisme psoriasique et de la colite ulcéreuse, de l'arthrite juvénile idiopathique, spondylarthrite ankylosante active (Ayala-Aguilera et al., 2022; Kostik et al., 2022; Mohanakrishnan et al., 2022). L'activité inhibitrice du tofacitinib est caractérisée par des valeurs IC₅₀ comprises entre 1,1 et 42 nM, où l'activité inhibitrice la plus élevée était contre JAK3 (IC₅₀ = 1,1 nM). De plus, le tofacitinib a inhibé JAK1 (IC₅₀ = 2,9 nM) et JAK2 (IC₅₀ = 1,2 nM) (Noji et al., 2020). Une autre étude a noté d'autres d'IC₅₀: 15,1 nM, 77,4 nM et 55nM pour JAK1, JAK2 et JAK3, respectivement (Clark et al., 2014). Ces résultats indiquent que le tofacitinb inhibe à la fois JAK1, JAK2 et JAK3. D'autres inhibiteurs de JAKs ont été

développé dans le but d'améliorer la spécificité, minimisant ainsi les effets secondaires indésirables. Bien qu'un nombre restreint soit approuvé pour des applications cliniques (Tableau 5), un grand nombre fait l'objet d'essais cliniques de phase II et III (Shawky et al., 2022).

Les événements indésirables graves sont toujours une préoccupation lorsque les inhibiteurs de JAKs sont envisagés pour un traitement. Ces effets secondaires comprennent des maladies cardiovasculaires, des caillots sanguins, le cancer et des infections graves. En 2023, l'EMA (*European Medicines Agency*) a déclaré que ces médicaments peuvent être utilisés chez les patients suivants uniquement si aucune alternative thérapeutique appropriée n'est disponible : les personnes âgées de 65 ans ou plus, les personnes présentant un risque accru de problèmes cardiovasculaires majeurs (tels qu'une crise cardiaque ou un accident vasculaire cérébral), les individus ayant une longue histoire de tabagisme, et ceux qui courent un risque accru de cancer.

Tableau 5. Inhibiteurs de JAKs approuvés, leurs cibles et applications cliniques

Médicament	Sélectivité	Indications approuvées par FDA/EMA/UEA/Japon
Abrocitinib	JAK1, JAK2	La dermatite atopique
Baricitinib	JAK1, JAK2	Polyarthrite rhumatoïde, COVID 19
Delgocitinib	JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2	La dermatite atopique
Fédératinib	JAK2	Myélofibrose
Filgotinib	JAK1	Polyarthrite rhumatoïde
Pacritinib	JAK2	Myélofibrose
Péficitinib	JAK1, JAK3	Polyarthrite rhumatoïde
Ruxolitinib	JAK1, JAK2	Myélofibrose, Polyglobulie vraie, Maladie du greffon contre l'hôte aiguë et chronique
Tofacitinib	JAK1, JAK2, JAK3	Polyarthrite rhumatoïde, Arthrite psoriasique, Rectocolite hémorragique, Arthrite idiopathique juvénile, Spondylarthrite ankylosante
Upadacitinib	JAK1	Polyarthrite rhumatoïde, Arthrite psoriasique, La dermatite atopique, Rectocolite hémorragique

3.8.3 Inhibiteurs de STATs

Les inhibiteurs des JAKs empêchent la phosphorylation et l'activation des STATs. Cependant, d'autres voies de signalisation peuvent également être inhibées engendrant

des événements indésirables. Ainsi, les inhibiteurs de STAT semblent plus spécifiques et entraînent moins d'effets indésirables. La plupart des inhibiteurs de STAT empêchent la phosphorylation et/ou de la dimérisation de STAT par des approches peptidomimétiques (Figure 16). Parmi les sept STAT, les inhibiteurs ciblant STAT3 et STAT5 ont été les plus étudiés (Turkson et al., 2004). Cependant, la plupart des études sur les inhibiteurs des STAT sont en phase précliniques, et peu font l'objet d'essais cliniques ou approuvés sur le marché, car des concentrations élevées sont nécessaires pour qu'ils soient efficaces.

4 La voie JAK/STAT dans la sarcoïdose

4.1 Preuves de l'implication de la voie JAK/STAT dans la sarcoïdose

Une étude transcriptomique sur des PBMC provenant de témoins sains et de patients atteints de sarcoïdose a mis en évidence une signature moléculaire composée de 17 gènes (*ADORA3*, *ATP10A*, *CBLB*, *EFHA2*, *ERCC6L2*, *FIGNL1*, *GALNT12*, *IL6ST*, *ITGA6*, *MBTPS1*, *MTERFD2*, *SATB1*, *SORCS3*, *STAT4*, *TMEM263*, *UR11*, *ZFYVE9*) potentiellement régulés par 8 miARN (miR-23a, miR-23b, miR-30c, miR-93, miR-185, miR-143, miR-196a et miR-223) connu pour être lié à l'hypertension pulmonaire, au cancer du poumon et potentiellement à la sévérité de la sarcoïdose. Les 17 gènes identifiés sont associés à la voie JAK/STAT, dont l'expression est corrélée avec la gravité de la maladie (Zhou et al., 2017). Il est important de noter qu'aucun gène parmi les 17 gènes identifiés n'a été retrouvés dans les précédents études du criblage du génome entier des PBMC de patients atteints de sarcoïdose (Koth et al., 2011; Zhou et al., 2012). D'autres études transcriptomiques réalisées sur les PBMC, des poumons et des ganglions lymphatiques ont identifiés *STAT1*, ainsi que les gènes codants pour les chimiokines qu'il régule (*IL-5*, *IL-7*, *IL-15*, *CCR5*, *CXCL9*, *CXCL10* et *CXCL11*), comme des acteurs inflammatoires majeurs dans la sarcoïdose (Crouser et al., 2009; Rosenbaum et al., 2009). Une récente étude a révélé que la voie JAK/STAT, particulièrement *JAK2* et *STAT1*, est significativement régulée à la hausse dans les PBMC, les biopsies pulmonaires, cutanées, de l'orbite antérieure et de la glande lacrymale, ainsi que dans les ganglions lymphatiques des patients atteints de sarcoïdose (Lindquist et al., 2023).

Au niveau histologique Damsky et al. ont montré une activation de *STAT1* et *STAT3* significativement élevée au niveau des granulomes de biopsies cutanées de patients atteints de sarcoïdose par rapport à celles de sujets sains ou des patients atteints de xanthélasma, un autre

trouble granulomateux cutané. De plus, l'analyse transcriptomique d'autres biopsies cutanées de patients atteints de sarcoïdose a révélé l'activation de la signalisation de l'IFN- γ et de l'IL-6, en plus TNF- α , et de mTORC1 (indépendants de la voie JAK/STAT). En revanche, ces voies ne semblaient pas activées chez les sujets sains (Damsky et al., 2018). Cette étude soutient l'hypothèse suivante : les lymphocytes sécrètent de l'IFN- γ , qui conduit à l'activation de STAT1 dans les macrophages. Après activation, les macrophages produisent l'IL-6, qui active STAT3 dans les LT (Wang et al., 2020).

4.2 Inhibiteurs de JAKs dans la sarcoïdose

Plusieurs cas cliniques ont rapporté l'efficacité majeure des inhibiteurs de JAK dans des formes de sarcoïdose chroniques résistantes à plusieurs lignes de traitement immunosuppresseurs. Rotenberg et al. ont rapporté une réponse rapide et spectaculaire du ruxolitinib (inhibiteur de JAK1 et JAK2) sur un cas de sarcoïdose sévère multiviscérale réfractaire aux traitements. Après 3 mois de traitement, il a été noté une disparition des lésions granulomateuses pulmonaires et cutanées avec amélioration de la fonction respiratoire. Ce traitement est initialement administré dans le cadre de la maladie de Vaquez (un syndrome myéloprolifératif dû à la mutation V617F de JAK2) (Rotenberg et al., 2018). Deux autres études ont souligné l'efficacité du ruxolutinib sur deux autres cas de sarcoïdose (Levrant et al., 2019; Wei et al., 2019).

Un résultat similaire a été obtenu avec un autre inhibiteur de JAK, le tofacitinib (inhibiteur de JAK1, JAK2 et JAK3) (Damsky et al., 2020). Chez des patients atteints d'une sarcoïdose cutanée, le tofacitinib a entraîné la disparition des granulomes et une régression de l'infiltrat inflammatoire associé à une diminution de l'immunomarquage des formes phosphorylées STAT1 et STAT3 (Figure 17) ainsi que le taux d'ARNm d'IFN- γ , du TNF- α , de l'IL-6. De plus, avant le traitement par le tofacitinib, il a été observé une activation des voies de signalisation dépendantes de JAK/STAT (interféron- γ et interleukine-6) mais aussi de la voie du TNF α et mTORC1. Ces mêmes voies ont été régulées négativement chez les patients traités avec du tofacitinib. D'autres transcrits pro-inflammatoires impliqués dans la pathogenèse de la sarcoïdose, y compris *TLR2*, *TLR8*, *IL1B*, *IL12B*, *IL18*, *IL27*, *CXCL9* et *CXCL10*, ont été réduits pendant le traitement par tofacitinib (Damsky et al., 2018).

Bien que la voie JAK/STAT ait été détectée au niveau transcriptomique et histologique dans la sarcoïdose, aucune étude n'a encore examiné de manière exhaustive l'expression de tous les membres de cette voie dans le granulome sarcoïdien. L'identification précise des signatures JAK/STAT et de leurs localisations cellulaires spécifiques au sein du granulome permettrait d'améliorer la compréhension de l'implication de cette voie de signalisation dans la physiopathologie de la sarcoïdose.

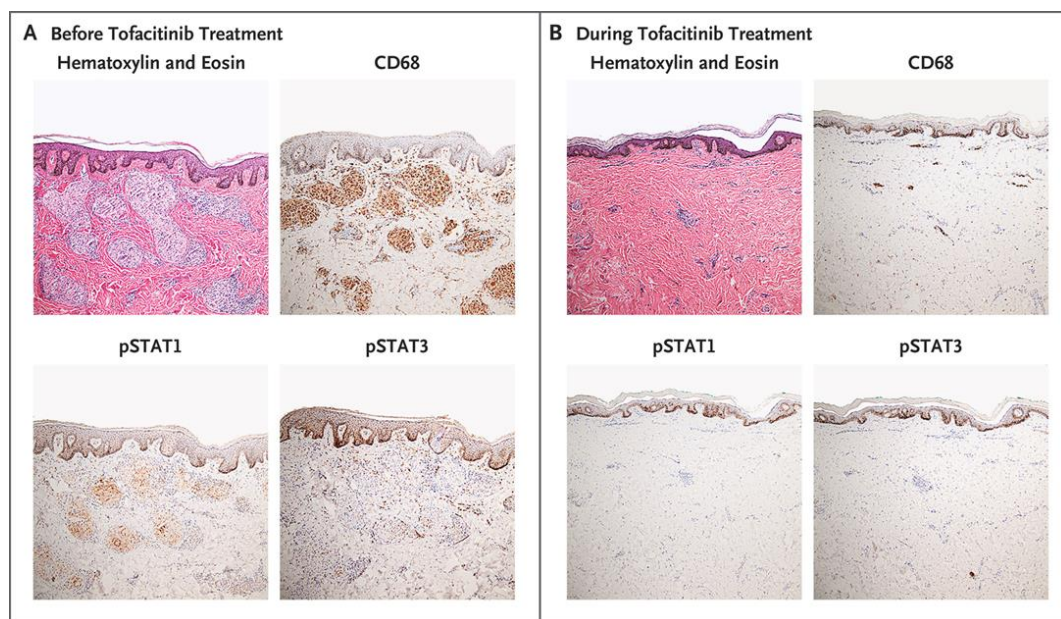


Figure 17 : Rémission histologique de la sarcoïdose après traitement par le tofacitinib

Avant traitement, la coloration à l'hématoxyline éosine a montré des granulomes bien organisés non caséux dans le derme d'une coupe de biopsie cutanée. Les marquages immunohistochimique CD68 (pour les macrophages), pSTAT1 et pSTAT3 détectés au niveau des lésions cutanées (A). Après traitement, disparition des granulomes, avec l'absence de détection des marquages CD68, pSTAT1 et pSTAT3 (B). Adapté de (Damsky et al., 2018)

Hypothèse et objectifs généraux du travail de thèse

Mon travail de thèse a porté sur l'étude de l'implication de la voie de signalisation JAK/STAT dans la sarcoïdose. Cette maladie systémique d'étiologie inconnue est caractérisée par la formation de granulomes immuns dans différents organes. La sarcoïdose se caractérise par une présentation clinique et une évolution variable. Près de la moitié des patients nécessiteront un traitement prolongé par corticoïdes, et 10% progresseront malgré ce traitement. Plusieurs études transcriptomiques ont révélé l'expression de la voie JAK/STAT dans les PBMC de patients atteints de sarcoïdose, et son association avec la sévérité de la maladie. De plus, plusieurs cas cliniques ont montré l'efficacité des inhibiteurs de la voie JAK/STAT dans la sarcoïdose. Cependant, l'expression **spatiale et temporelle** des membres de la voie JAK/STAT dans le granulome est encore mal connue.

À partir des données du laboratoire et de la littérature, nous émettons l'hypothèse que l'activation de la voie JAK/STAT dans les granulomes de la sarcoïdose induit **la formation et/ou la persistance** du granulome de la sarcoïdose.

Afin de tester cette hypothèse nous nous sommes fixé les objectifs suivants :

- Réaliser une cartographie de l'expression des membres de la voie JAK/STAT dans le granulome et le « péri-granulome », et identifier les populations cellulaires positives pour chaque membre sur des biopsies de patients atteints de sarcoïdose ;
- Analyser et comparer l'activation de la voie JAK/STAT dans les différents organes principalement affectés par la sarcoïdose, dans le but de rechercher l'existence de signatures distinctes selon les organes atteints ;
- Etudier la relation entre la voie JAK/STAT et la sévérité de la maladie en utilisant deux approches distinctes : (i) en associant les niveaux d'expression des protéines détectées dans les granulomes aux caractéristiques cliniques des patients et (ii) en examinant leur relation avec les stades d'évolution des granulomes.
- Etudier l'activation de la voie JAK/STAT *in vitro* dans des cultures de lymphocytes circulants de patients atteints de sarcoïdose et de témoins.

1 Considérations éthiques et réglementaires

1.1 Biopsies humaines

Cette étude monocentrique rétrospective a été menée dans le service de pneumologie de l'hôpital universitaire Avicenne, APHP, qui est centre de référence pour les maladies pulmonaires rares de l'adulte (CRMOR ORPHALUNG) et *centre of excellence for sarcoidosis* (selon le WASOG). Les patients inclus étaient âgés de plus de 18 ans et avaient un diagnostic certain de sarcoïdose selon ATS/ERS/WASOG ("Statement on Sarcoidosis," 1999). Les patients inclus dans l'étude devaient avoir un dossier médical suffisamment détaillé, et un suivi médical dans le service d'au moins 5 ans après la date de la biopsie. Les dossiers médicaux de tous les patients ont été examinés et les données concernant les caractéristiques démographiques, les stades radiographiques, les tests de la fonction pulmonaire (VEMS et DLCO), le scanner thoracique \pm 18FFDG PET-CT et les atteintes des organes extra-pulmonaires (selon les données cliniques et tomодensitométriques) ont été enregistrées au moment de la biopsie. Trois scores d'évaluation de la gravité ont été établis pour tous les patients. Le CTAS (*computed tomography activity score*) ou score de Benamore, sur une échelle de 0 à 4, qui permet d'évaluer l'activité de la maladie sur la base des résultats de l'imagerie médicale, comme la tomодensitométrie axiale (CT) du thorax (Benamore et al., 2016). L'outil *extrapulmonary physician organ severity tool* (ePOST), sur une échelle de 0 à 6, mesure le degré de gravité des organes (Judson et al., 2008). Le COS (*clinical outcome status*), sur une échelle de 0 à 9, tient compte de la nécessité d'un traitement systémique et de l'activité de la maladie (Baughman et al., 2011). A l'exception du COS, qui a été calculé 5 ans après la biopsie, les deux autres scores ont été calculés au moment de la biopsie. Les patients ont été sélectionnés au hasard afin d'avoir au moins 10 patients par organe biopsié (biobanque du service d'anatomopathologie de l'hôpital Avicenne). La biopsie la plus récente devait être datée de 2015 afin d'avoir une perspective suffisante sur l'évolution de la maladie. Au total, 58 patients ont été sélectionnés, et 7 patients ont été exclus car il n'y avait pas de granulomes dans leurs biopsies. Les organes biopsiés étaient le poumon (par biopsies transthoraciques ou chirurgicales) (n=10), la peau (n=13), les ganglions lymphatiques (n=12), le foie (n=9), les

glandes salivaires (n=8) et le rein (n=9). De plus, neuf patients ont subi des prélèvements multiples, incluant huit biopsie transbronchique et une biopsie des voies aériennes supérieures. Deux d'entre eux ont également eu une biopsie de glandes salivaires, deux une biopsie hépatique, quatre une biopsie cutanée et un une biopsie de ganglions lymphatiques. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique (CLEA-2019-100 ; réf CPP-CNRIIPH 20088-66111). Le protocole de l'étude est enregistré sur clinicaltrials.gov (identifiant NCT04751279) (Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, 2022). Le consentement éclairé pour tous les participants a été obtenu pour les investigations biologiques.

1.2 Prélèvements sanguins humains

Le travail sur les lymphocytes sanguins est une étude prospective monocentrique menée dans le service de pneumologie du CHU Avicenne, Grand Paris, France entre 2020 et 2024 et ayant reçu l'approbation du comité d'examen institutionnel (CPP Ile-de-France XI 20088-66111) selon la législation française. Le consentement éclairé écrit de tous les participants a été obtenu pour les investigations biologiques. Les patients atteints de sarcoïdose ont été inclus s'ils étaient âgés d'au moins 18 ans et présentaient un diagnostic de sarcoïdose pulmonaire selon les critères (ATS/ERS/WASOG, 1999). Des volontaires sains âgés de ≥ 18 ans, sans antécédent de sarcoïdose ont été évalués comme sujets témoins et appariés pour l'âge (± 5 ans), le sexe et le tabagisme avec les patients atteints de sarcoïdose. Nous avons sélectionné 7 patients et 3 sujets sains pour l'étude. Les dossiers médicaux de tous les patients ont été examinés (Dr Florence Jeny). Les données démographiques, les stades radiographiques selon Scadding, la fonction pulmonaire (spirométrie et DLCO), le scanner thoracique, et la présence d'atteintes extra thoraciques étaient concomitantes au prélèvement sanguin.

2 Etude histologique et immunochimique

2.1 Préparation des échantillons

2.1.1 Culture des lymphocytes circulants

Pour fixer les cellules, les culots cellulaires ont été resuspendus dans du PBS (*phosphate buffered saline*) pH 7.4 contenant 4% PFA (*paraformaldehyde*) et incubés 15 min à TA (température ambiante). Après 2 lavages par centrifugation (400G, 5 min) et élimination du

surnageant, les culots sont resuspendus dans du PBS (densité : 10^6 cellules/mL). Une densité de 10^5 cellules a été projeté sur une lame de verre à l'aide d'un montage lame / papier buvard / chambre inséré dans le cytopspin pendant 5 min à 300G. Après séchage une nuit à TA, les lames ont été post fixées 15 min à l'acétone froid puis séchées 15 min à TA sous hôte aspirante, puis conservées à -20°C en attendant d'être utilisées.

2.1.2 Tissus humains

Les échantillons humains (déjà inclus en paraffine) nous ont été fournis par le service d'anatomopathologie (Dr Marianne Kambouchner) de l'Hôpital Avicenne. Les blocs inclus en paraffine ont ensuite été coupés en sections sériées de $4\ \mu\text{m}$ d'épaisseur à la plateforme d'histologie TisCell3.

2.2 Colorations histologiques

2.2.1 Déparaffinage et réhydratation des coupes histologiques

Avant coloration ou immunomarquage des coupes histologiques, une étape de déparaffinage/réhydratation était effectuée : les lames étaient traitées dans 3 bains successifs de xylène (3x 10min), puis réhydratées dans un gradient décroissant d'éthanol : éthanol 100% (2x 5 min), éthanol 95% (2x 5 min), éthanol 70% (1x 5 min) suivie par une réhydratation finale (eau déionisée, 5min). Les lames contenant les spots de cellules destinés à l'immunomarquage ont été décongelées 5 min à TA.

2.2.2 Coloration Hématoxyline Eosine (HE)

Des colorations HE ont été effectuées pour étudier l'histologie générale des tissus murins, en particulier observer la présence d'infiltrats inflammatoires éventuels. Après déparaffinage/réhydratation, les coupes histologiques ont été colorées à l'hématoxyline de Harris pendant 4 min, puis rincées à l'eau ionisée pendant 5min. Après passage dans un bain d'éthanol 95%, les lames étaient colorées à l'éosine alcoolique (2 min). Après un rinçage rapide 100 dans d'éthanol 95%, les lames étaient passées en xylène pour un montage en milieu non-aqueux.

2.2.3 Coloration Trichrome de Masson

Les colorations trichromiques de Masson ont été effectuées pour évaluer la présence de dépôt de collagène. Après déparaffinage et réhydratation, les coupes histologiques étaient colorées en présence d'hématoxyline de Weigert (10min), et rincées avec de l'eau ionisée pendant 5 min. Puis les lames étaient colorées avec la fuschine acide de Biebrich scarlet (5min), et rincées dans de l'eau déionisée (5min). Elles étaient ensuite traitées dans une solution d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique (5min), colorées avec une solution d'aniline bleue (5min) et enfin fixées dans un bain d'acide acétique (2min). Après rinçage à l'eau distillée, les lames étaient déshydratées dans un gradient croissant d'éthanol, passées en xylène pour un montage des lames en milieu non-aqueux.

2.3 Immuno-histochimie/cytochimie

Après déparaffinage-réhydratation, un démasquage des sites antigéniques a été réalisé par incubation dans un tampon citrate pH6, ou dans un tampon Tris-EDTA pH9, selon les anticorps, chauffé à 95°C. L'inhibition des peroxydases endogènes a été réalisée par incubation dans une solution de peroxyde d'hydrogène 3% diluée dans du méthanol. Le blocage des sites non-spécifiques était effectué par incubation des lames dans du PBS pH7.2 contenant 2% sérum de cheval (Vector Laboratories, USA). Les coupes histologiques étaient ensuite incubées à 4°C, toute une nuit en chambre humide, en présence de l'anticorps primaire dilué dans du PBS contenant 2% sérum de cheval. Après lavage au PBS-T (tampon PBS contenant 0.1% de Tween), les coupes histologiques étaient incubées à température ambiante, pendant 30 min en chambre humide, en présence de l'anticorps secondaire biotinylé (Vector Laboratories, USA) dirigé contre l'espèce de l'anticorps primaire. La révélation des complexes anticorps primaires/secondaires a été réalisée en incubant à température ambiante, pendant 30 min en chambre humide, les coupes histologiques avec le kit Vectastain ABC (Vector Laboratories, USA). La mise en évidence des complexes a été réalisée en présence de DAB (3,3'diaminobenzidine), substrat de la peroxidase couplée aux complexes anticorps primaires/secondaires. Le signal DAB est amplifié par l'addition d'un complexe Nickel/Cobalt qui donne un précipité noir. Finalement, les lames sont contre-colorées au nuclear Fast Red. Après déshydratation et passage en xylène, un montage en milieu non-aqueux a été réalisé.

Pour l'immunohistofluorescence, les coupes ont été incubées avec un anticorps secondaire conjugué à l'Alexa Fluor pendant 60 minutes. Après rinçage, les sections ont été fixées avec un milieu de montage contenant du DAPI (VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with

DAPI ; Vector Laboratories). La fluorescence a été observée en utilisant un microscope à fluorescence Zeiss Axioskop.

2.4 Hyperion

Des coupes de poumon et de peau en paraffine (5 µm) ont été utilisées pour l'imagerie en cytométrie de masse. Le démasquage antigénique (tampon Tris-EDTA pH 9) a été réalisé pour tous les anticorps, suivi d'un blocage dans 2 % de BSA pendant 45 minutes. Les anticorps conjugués aux métaux ont été incubés toute la nuit à +4 °C dans 2 % de BSA (tableau). Les lames ont été lavées trois fois avec 0,2% de Triton X-100 dans du PBS avant d'être incubées avec l'intercalateur Cell-ID-Ir (1 : 800, 201192A, Standard Biotoools) pendant 30 minutes à température ambiante pour visualiser l'ADN. Après avoir été lavées deux fois dans de l'H₂O doublement distillée, les lames ont séché avant l'imagerie. Les images ont été acquises à l'aide d'un cytomètre de masse à temps de vol Helios (CyTOF) couplé à un système d'imagerie Hyperion (Standard Biotoools). Avant l'ablation au laser, des images optiques de lames (appelées panorama) ont été acquises à l'aide du logiciel Hyperion et les zones à ablation ont été sélectionnées comme décrit ci-dessous. L'ablation laser a été réalisée à une résolution d'environ 1 µm et à une fréquence de 200 Hz. Lors de la coloration, une région d'environ 1 mm x 1 mm a été analysée à partir d'une coupe de tissu à l'aide du système Hyperion (Standard Biotoools).

3 Etude morphométrique

3.1 Classification des granulomes

Pour la classification des granulomes, nous nous sommes basés sur le suivi histologique réalisé lors du test de Kveim (Figure 18). Ce test de diagnostic consistait à injecter par voie intradermique au patient suspecté de sarcoïdose un broyat de tissu provenant d'un patient atteint de sarcoïdose. Le développement d'un granulome, histologiquement prouvé au site d'injection était considéré comme un argument de diagnostic important en faveur de la sarcoïdose (Rogers and Haserick, 1954). Bien que le test de Kveim ait été largement utilisé dans le passé, il est désormais moins courant en raison de problèmes de standardisation, de faible spécificité, de risques de transmission de maladies et de l'émergence de meilleures alternatives diagnostiques, telles que l'imagerie médicale et les analyses sanguines.

Nous avons classé les divers granulomes observés dans les biopsies de différents organes chez les patients atteints de sarcoïdose en 4 stades d'évolution. **(i) granulomes naissant** constitués d'agrégats inflammatoires non emballés principalement lymphocytaires avec quelques macrophages montrant des critères cytologiques de différenciation des cellules épithélioïdes, **(ii) granulomes florides** constitués de cellules épithélioïdes encore peu compactes mélangées à des lymphocytes avec des lymphocytes entourés d'un infiltrat lymphocytaire marqué, **(iii) granulomes « naked »** constitués de cellules épithélioïdes tassées avec peu ou pas de lymphocytes sans infiltrat lymphocytaire, **(iv) granulomes fibreux** composés de cellules épithélioïdes tassées avec peu ou pas de lymphocytes sans infiltrat lymphocytaire, enveloppées d'une couronne collagène dense d'épaisseur variable. Des cellules géantes multinucléaires peuvent être rencontrées dans les différents stades.

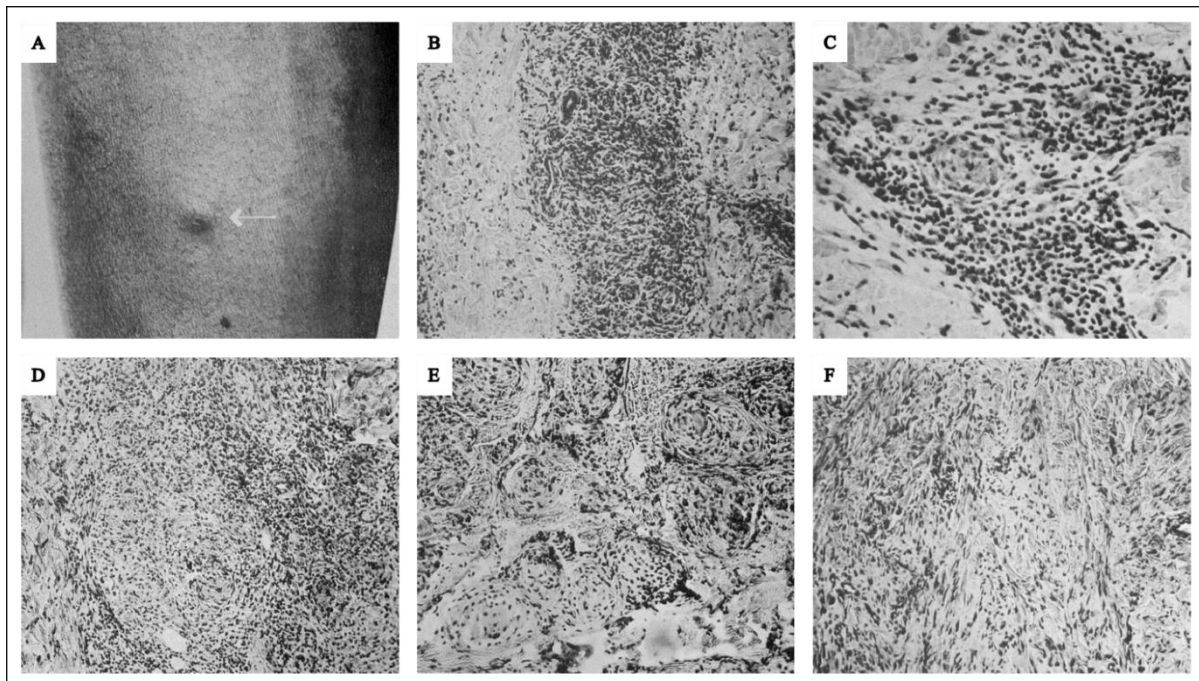


Figure 18 : Suivi histologique du test de Kveim.

Papule à l'endroit où le test de Kveim a été positif pendant 6 semaines (A). 6 jours d'un test de Kveim positif, un infiltrat périvasculaire dense composé de grands histiocytes et de leucocytes mononucléaires et de cellules atypiques pléomorphes difficiles à classer, x125 (B). 13 jours d'un test de Kveim positif, L'infiltrat périvasculaire dense est principalement constitué de lymphocytes entourant des cellules épithélioïdes. Les cellules atypiques sont moins nombreuses x270 (C). 25 jours d'un test Kveim positif, un agrégat de cellules épithélioïdes important entouré de très peu de lymphocytes x100 (D). Un amas de granulomes « Naked » après 9 mois d'un test de Kveim positif, x110 (E). La formation d'un tissu fibreux après 6 semaines de l'injection de gammaglobulines de patient x110 (F). Adapté de (Rogers and Haserick, 1954)

3.2 Quantifications

3.2.1 Distribution des stades de granulomes

Nous avons analysé la distribution des quatre stades de développement des granulomes de la sarcoïdose (naissant, floride, « naked » et fibreux) dans les cinq organes, à savoir : le poumon, la peau, les ganglions lymphatiques, le foie et les glandes salivaires. Pour chaque biopsie, nous avons calculé le nombre de granulomes d'un stade donné par rapport au nombre total de granulomes de la sarcoïdose.

3.2.2 Niveau d'expression

Tout d'abord, nous avons déterminé le pourcentage de patients positifs pour pJAK2, pSTAT1, pSTAT3 et pSTAT5 séparément. Nous avons considéré qu'un patient était positif s'il avait au moins un granulome marqué dans sa biopsie. Ensuite, pour chaque biopsie positive, nous avons déterminé le niveau d'expression des quatre protéines activées séparément. Il s'agit du rapport entre le nombre de granulomes positifs pour chaque protéine et le nombre total de granulomes. Nous avons considéré qu'un granulome était positif s'il présentait au moins une cellule marquée pour l'une des protéines.

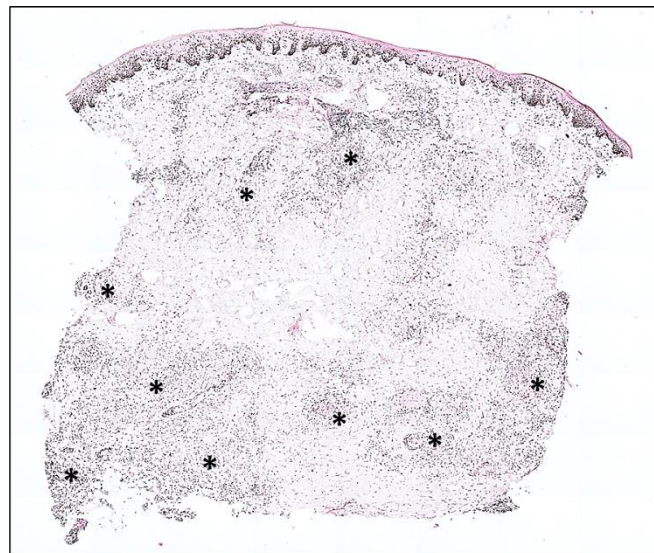


Figure 19 : Cartographie d'une coupe de biopsie cutanée d'un patient atteint de sarcoïdose.

Le niveau d'expression d'une protéine correspond au nombre de granulome positifs par rapport au nombre de granulome totaux. Les zones désignées par (*) correspondent aux granulomes marqués (dans ce cas-là tous les granulomes étaient marqués pour pJAK2).

3.2.3 Scores d'expression

Les scores d'expression ont été déterminés en fonction du pourcentage de cellules positives dans les granulomes, utilisant une échelle de 0 à 3. Le pourcentage de cellules positives pour un marquage donné a été classé comme suit : 0 (aucune cellule marquée), 1 (0-30%), 2 (30-70%) et 3 (>70%).

4 **Culture cellulaire**

4.1 Isolement des lymphocytes

Quarante mL de sang total prélevés dans des tubes EDTA pour une analyse hématologique de routine ont été collectés. Les PBMC ont été isolées en utilisant une séparation par gradient de densité Ficoll-Paque™ plus (GE Healthcare # 17- 1440-03) (densité 1,077 g /ml). Les lymphocytes T CD3+ ont été purifiés à partir de PBMC par sélection positive en utilisant le kit CD3 MicroBeads human (130-097-043, Miltenyi Biotec, France) selon les instructions du fabricant. Ils ont ensuite étéensemencés à une densité 1×10^6 and 2×10^5 par puits dans des plaques 6 puits ou 12 puits, dans un milieu *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI) 1640 GlutaMAX™ contenant 2 mM de glutamine, 25 mM d'HEPES (Gibco # 72400021), 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco # 10270), pénicilline / streptomycine (Gibco # 15140-122), à 37°C pendant une nuit.

4.2 Stimulation

Les lymphocytes ont été stimulés avec 250ng/mL d'IFN γ (R&D Systems # 285-IF-100) pendant 5, 10, 30 min et 1h à 37°C. Immédiatement après la stimulation, les cellules ont été récoltées, transférées dans des tubes et centrifugées à 400G, 4°C pendant 5 min afin d'éliminer le surnageant. Une partie des cellules étaient destinées à l'immunomarquage, et le reste à l'analyse protéique par western blot.

5 **Etudes protéiques**

5.1 Préparation des échantillons

Une fois les culots cellulaires récupérés, les cellules ont été lysées par resuspension dans 100 µl de tampon de lyse cytosolique (10mM Hepes, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 1% NP-40) contenant du cocktail inhibiteur de protéases 1X (Active Motif # 100510) et incubation sur glace pendant 45 min. Après centrifugation (3300G, 15min, 4°C), le surnageant correspondant aux extraits cytosoliques a été transféré dans un autre tube. Les culots cellulaires ont été lavés au PBS puis resuspendus dans 50µL de tampon de lyse nucléaire (20mM Hepes, 1.5mM MgCl₂, 300mM KCl, 0.2mM EDTA, 25% glycérol) contenant du cocktail inhibiteur de protéases 1X et incubés 30 min sur glace. Après centrifugation (25000G, 30min, 4°C), le surnageant correspondant aux extraits nucléaires a été transféré dans un autre tube. La teneur en protéines des lysats cytosoliques et nucléaires a été déterminée à l'aide du kit de dosage de protéines Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific, France # 23225). Les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

5.2 Western blot

Une quantité de protéines fixe (10 à 40 ug) de chaque échantillon cytoplasmique a été mélangée au volume de tampon Laemmli (50 mM Tris pH = 6.8, 10% glycerol, 1% SDS, 0.02% bromophenol blue, 1% β-mercaptoéthanol), puis chauffés 5 min à 95 °C et gardés sur glace. Les lysats ont été séparés par SDS-PAGE 7.2% à 90 V pendant 2h30 dans du tampon de migration (4.8 mM Tris-Base pH 9.2, 3.9 mM Glycine, 0.1% SDS). Les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose par transfert humide pendant 2h à 90V avec une limite de 0.3A max dans du tampon de transfert (4.8 mM Tris-Base pH 9.2, 3.9 mM Glycine, 20% Méthanol). La membrane a été colorée au rouge ponceau et imagée (poire western blot), coupée, puis rincée au *Tris-buffered saline* (TBS)-0.1% Tween (TBST). Après 1h de blocage à TA au TBST contenant 3% de lait, la membrane est incubée sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (bas de la membrane : ANTI-B-ACTIN Merck # A5316, haut de la membrane : JAK2, pJAK2, STAT1 ou pSTAT1). Le lendemain, après 3 lavages de 10 min au TBST, la membrane est incubée 2h avec l'anticorps secondaire (Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP # P0448 ou Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP # P0447), dilué 1:5000 dans TBST contenant 3% (p/v) lait. Après 3 lavages de 10 min, la membrane est révélée par chemiluminescence avec un des kits SuperSignal™ West Dura, Femto ou Atto Ultimate (Thermo Fisher Scientific # 34076 # 34096 # A38555) avec un système

d'imagerie (ChemiDoc MP, Bio-Rad). La membrane du haut a été incubée avec la solution de stripping (ReBlot Plus Mild Antibody Stripping Solution, Merck # 2502) 10 min à TA sous agitation, puis rincée au TBS-T. Elle a été ré-utilisée suivant les mêmes étapes (blocage, incubation anticorps primaire et secondaire, révélation) afin de révéler une autre protéine de la voie de signalisation étudiée.

6 Etude Statistiques

6.1 Analyses univariées

Les analyses univariées ont été réalisées à l'aide du logiciel Graphpad Prism 9. Les caractéristiques de la cohorte ont été examinées à l'aide de statistiques descriptives (pourcentages, moyennes, écart-type). Les comparaisons entre plusieurs groupes pour les variables quantitatives ont été effectuées à l'aide du test ANOVA de Friedman. Les associations entre les variables catégorielles ont été testées à l'aide des coefficients de corrélation de Spearman.

6.2 Analyse multivariée : la régression PLS

L'analyse multivariée a été réalisée à l'aide du logiciel MATLAB. La distribution des observations en fonction des variables a été testée à l'aide du test de régression PLS (partial least squares) multivarié et confirmée par l'analyse ROC (*Receiver Operating Characteristic*), la méthode de validation croisée et la méthode de correction de Bonferroni. Tous les tests étaient bilatéraux et une valeur p inférieure à 0,05 était considérée comme statistiquement significative.

Résultats

L'étude rétrospective sur l'expression des membres de la voie JAK/STAT dans les granulomes de différents organes atteints de sarcoïdose et leur lien avec la sévérité de la maladie sera présentée sous forme d'article. Par ailleurs, les résultats de l'étude prospective sur le lymphocyte du sang périphérique des patients seront présentés en tant que complément à l'article.

1 Article

Involvement of JAK2 and STAT-1/3/5 proteins in sarcoidosis

Thinhinane Iskounen¹, Florence Jeny^{1,2}, Raphael Hindre^{1,2}, Olivia Frenoy¹, Mohamed Nawfal Triba⁶, Jean-François Bernaudin^{1,3}, Dominique Valeyre^{1,2}, Marianne Kambouchner^{1,4}, Hilario Nunes^{1,2}, Carole Planès^{1,5#}, Valérie Besnard^{1#}

¹INSERM UMR 1272, Sorbonne Paris-Nord University, Bobigny, France

²AP-HP, Pulmonology Department, Avicenne Hospital, Bobigny, France

³Faculty of Medicine, Sorbonne University, Paris, France

⁴AP-HP, Pathology Department, Avicenne Hospital, Bobigny, France

⁵AP-HP, Physiology Department, Avicenne Hospital, Bobigny, France

⁶CNRS UMR 7244, Sorbonne Paris-Nord University, Bobigny, France

#, co-last authors

Abstract :

Sarcoidosis is a granulomatosis of unknown etiology, characterized by the formation of immune granulomas in various organs, principally the lung. The clinical presentation and evolution of sarcoidosis are variable. Genomic analysis of peripheral blood from sarcoidosis patients has shown that the JAK/STAT signaling pathway is significantly represented in sarcoidosis and is associated with disease severity. The aim of this study is to characterize the expression of different members of the JAK/STAT pathway during granuloma development in patients with different stages of pathology severity in different organs. The expression of activated forms of JAKs and STATs proteins is studied by immunodetection techniques on biopsies : lung (n=10), skin (n=13), lymph nodes (n=12), liver (n=9) and salivary glands (n=8). Among the activated

JAK kinases, only pJAK2 is detected, mainly in LTCD3⁺. Only nuclear localization of pJAK2 was observed, suggesting activation of a non-canonical JAK2 pathway. pJAK2 is mainly colocalized with histone H3K4me, associated with high transcriptional activity. On the other hand, only pSTAT1, pSTAT3 and pSTAT5 are detected in granulomas, mainly in myeloid lineage cells expressing CD68⁺. Expression of the 4 proteins is higher in lung (AUC=0.83) and skin (AUC=0.89) biopsies, and is on average associated with disease persistence (COS \geq 5, p<0.001). Two predominant signatures are identified in lymphocytes/myeloid cells : pJAK2 / pSTAT1-pSTAT5 in lung (AUC=0.84) and pJAK2 / pSTAT3-pSTAT5 in skin (AUC=0.80). Finally, we show a significant positive correlation between the expression of pSTAT1 (p<0.05), pSTAT3 (p<0.05), pSTAT5 (p<0.01) and the presence of the early "florid" stage.

Keywords : sarcoidosis, granuloma, JAK/STAT signaling, nuclear pJAK2, severity

Introduction :

Sarcoidosis is a systemic disease of an unknown etiology, characterized by the formation of immune granulomas in various organs, mainly the lungs, lymphatic system, skin, eye and heart (1). Nearly half of all patients will require prolonged treatment with corticosteroids, and only 10% will progress despite such treatment. Although sarcoidosis has a good prognosis overall, several studies demonstrated an excess mortality rate compared to the general population (2). In France, life expectancy has been reduced by almost 6 years (3). Pulmonary involvement, affecting over 90% of patients, is the leading cause of morbidity and mortality. It is mainly due to pulmonary fibrosis and/or pulmonary hypertension (4). The prevalence and incidence of the disease vary considerably according to age, gender, ethnic origin and geographical location (5). Sarcoid granuloma is an epithelioid, gigantocellular granuloma without caseous necrosis. It is a compact, more or less rounded structure consisting of macrophages, epithelioid cells, multinucleated giant cells (MGCs) surrounded by lymphocytes, mainly CD4⁺ T helper (Th) cells, but also rare CD8⁺ T cells and B cells. Epithelioid cells and MGCs are derived from macrophages that have differentiated after prolonged antigenic stimulation, acquiring greater cytokine secretion capacity at the expense of less effective phagocytosis. When the granuloma persists over the years, fibrosis lesions may appear from the periphery towards the center of the granuloma (6).

Recently, the JAK/STAT pathway has been implicated in the pathophysiology of sarcoidosis. The Janus kinase (JAK) proteins represent a family of four non-receptor tyrosine kinases, including three ubiquitous kinases, JAK1, JAK2 and TYK2, and one kinase whose expression

is restricted to lymphoid and myeloid tissues, JAK3. They are associated with the intracytoplasmic portion of class I and II cytokine receptors, receptors with tyrosine kinase (RTK) activity, and certain G protein-coupled receptors. The signal transducers and activators of transcription (STAT) comprise seven structurally and functionally related proteins (STAT 1-4, 5a, 5b and 6). Activation of the JAK/STAT signaling pathway occurs following binding of extracellular ligands to membrane receptors, inducing oligomerization of receptor subunits. Once phosphorylated, STAT proteins form homo- or hetero-dimers and migrate into the nucleus. They bind to the promoter regions of genes involved in hematopoiesis, inflammatory response and immune response, as well as proliferation and cell survival (7).

In a genomic analysis of peripheral blood cells, Zhou and al. have shown that the JAK/STAT signaling pathway was the most significantly represented in sarcoidosis, and was associated with a significant increase in severity score (8). In addition, Rotenberg and al. reported a rapid and dramatic response to ruxolitinib, a potent and selective inhibitor of JAK1 and JAK2 kinases, in a case of persistent sarcoidosis characterized by a multivisceral lesion and increasing corticosteroid requirements (Rotenberg and al., 2018). Damsky and al. have shown beneficial effects with tofacitinib, a JAK1, JAK3 and JAK2 kinase inhibitor, in patients whose refractory cutaneous sarcoidosis, with clinical and histological remission of skin lesions (10).

Based on these observations, we hypothesized that the JAK/STAT signaling pathway is involved in sarcoidosis granuloma formation and persistence. Our project aims to evaluate the activation of the JAK/STAT pathway in different organs targeted by sarcoidosis, particularly in the formation and maintenance of granulomas and their association with sarcoidosis severity and fibrogenesis.

Materials and methods

Patients

This monocentric study was conducted in the Pneumology Department of Avicenne University Hospital, APHP. Patients included were over 18 years old, had a diagnosis of sarcoidosis according to ATS/ERS/WASOG (11). The patients included in the study had to have a sufficiently detailed medical record and a medical follow-up in our center of at least 5 years after biopsy. The medical records of all patients were reviewed and data regarding demographics, radiographic stages, pulmonary function tests (FVC and DLCO), chest CT ± ¹⁸F FDG PET-CT scan and extra-pulmonary organ involvements (according to clinical and CT data) were recorded at the time of biopsy. Three severity assessment scores were established

for all patients. The CT Activity Score (CTAS) or Benamore score, on a scale of 0 to 4, which used to assess disease activity based on medical imaging findings, such as computed axial tomography (CT) scans of the thorax (12). The Extrapulmonary Physician Organ Severity Tool (ePOST), on a scale of 0 to 6, measures the degree of organ severity (13). The Clinical Outcome Status (COS), on a scale of 0 to 9, considers the requirement for systemic treatment and disease activity (2). Except for the COS, which was calculated 5 years after biopsy, the other two scores were calculated at the time of biopsy. Patients were randomly selected in order to have at least 10 patients per organ biopsied with sarcoidosis. The most recent biopsy should be dated 2015 in order to have sufficient perspective on the evolution of the disease. Patients were excluded if there were no granulomas in their biopsies. The organs biopsied were the lung (by trans-thoracic or surgical lung biopsies) (n=10), skin (n=13) lymph node (n=12), liver (n=9), and salivary glands (n=8). The study obtained approval from the Ethics Committee (CLEA-2019-100; ref CPP-CNRIIPH 20088-66111). The study protocol is registered at clinicaltrials.gov (identifier NCT04751279) (14). Written informed consent for all participants was obtained for biological investigations.

Immunodetection

Immunohistochemistry and immunohistofluorescence

Tissue sections were submitted to a microwave antigen retrieval technique for all antibodies or isotypes using either citrate buffer pH 6 or Tris-EDTA pH 9 buffer (tab. S1). Sections were pretreated with 3% H₂O₂ in methanol to inactivate endogenous peroxidase and then blocked in 4% normal horse serum for 1 hour before incubation with primary antibody overnight at 4°C. After rinsing, tissue sections were incubated with biotinylated secondary antibody for 30 minutes and detected with an avidin-biotin peroxidase complex detection kit (Vectastain Elite ABC Kit ; Vector Laboratories) using nickel diaminobenzidine as substrate. The precipitation reaction was enhanced with Tris-cobalt, and the sections were counterstained with 0.1% nuclear fast red.

For immunohistofluorescence, sections were incubated with Alexa Fluor-conjugated secondary antibody for 60 minutes. After rinsing, the sections were fixed with DAPI containing mounting medium (VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with DAPI ; Vector Laboratories).

Imaging mass cytometry

Staining: Paraffin lung and skin sections (5µm) were used for the IMC. Antigen retrieval (Tris-EDTA pH 9 buffer) was performed for all antibodies followed by blocking in 2 % BSA () for 45min. Metal conjugated antibodies were incubated overnight at +4°C in 2% BSA (Supplemental Table 1). Slides were washed three times with 0.2% Triton X-100 in PBS before incubation with Cell-ID intercalator-Ir (1:800, 201192A, Standard Biotools) for 30min at RT to visualize DNA. After washing twice in doubly distilled H₂O, slides were left to dry before imaging.

Imaging: Images were acquired using a Helios time-of-flight mass cytometer (CyTOF) coupled to a Hyperion Imaging System (Standard Biotools). Prior to laser ablation, optical images of slides (called panorama) were acquired using the Hyperion software, and the areas to ablate were selected as described below. Laser ablation was performed at a resolution of approximately 1 µm and a frequency of 200 Hz. Upon staining, approximately 1mm x1mm region was analyzed from tissue section by IMC using the Hyperion system (Standard Biotools).

Classification of sarcoid granulomas

According to data from consecutive biopsies of Kveim's test in sarcoidosis patients (15) we classified the various granulomas observed in biopsies from different organs in sarcoidosis patients in 4 groups that we hypothesized to be of 4 stages in their evolution : (i) Pregranulomas/nascent granulomas made of unpacked inflammatory aggregates mainly lymphocytic with few macrophages showing cytologic criteria of epithelioid cell differentiation, (ii) Florid granulomas made of still loosely packed epithelioid cells admixed with lymphocytes surrounded by a marked lymphocytic infiltrate, (iii) Naked granulomas made of packed epithelioid cells with few or any lymphocytes without a lymphocytic, (iv) Fibrotic granulomas composed of packed epithelioid cells wrapped by a dense collagenous wreath of various thickness (fig. S1). Multinuclear giant cells may be encountered in the various stages.

Morphometry

Expression quantification

First, we determined the percentage of patients positive for pJAK1, pSTAT1, pSTAT3 and pSTAT5 separately. We considered a patient positive if they had at least one granuloma positive in their biopsy. Then, for each positive biopsy, we determined the level of expression of the four activated proteins separately, which was expressed as the ratio of positive granulomas for

each protein to the total number of granulomas. We considered a granuloma positive if it had at least one cell stained for one of the proteins.

Granuloma stage distribution

We analyzed the distribution of the four stages of sarcoidosis granuloma development (nascent, florid, naked, and fibrotic) in the five organs. For each biopsy, we calculated the number of granulomas for a given stage in relation to the total number of granulomas.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Graphpad Prism 9 software and MATLAB. Cohort characteristics were examined using descriptive statistics (percentages, means, standard deviation). Comparisons between several groups for quantitative variables were made using Friedman's rank ANOVA test. Associations between categorical variables were tested using Spearman's correlation coefficients. Distribution of observations according to variables was tested using the multivariate PLS (partial least squares) regression test, and confirmed by ROC (Receiver Operating Characteristic) analysis, the cross-validation method and the Bonferroni correction method. All tests were two-tailed, and a p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Study population characteristics

Of the 58 patients selected, only 52 were included in the study. Of the 7 patients not retained, there was 1 patient diagnosed with tuberculosis and 6 patients without granulomas in their biopsies. For the majority of patients, a biopsy was performed at the time of diagnosis. Clinical data were collected at the time of the biopsy. Eleven out of 52 patients were treated at the time of biopsy. Patient characteristics, including demographic and clinical features, are listed in Table 1. In our cohort, 27 (51.9%) were female, 33 (63.5%) were Caucasian, 19 (36.5%) were African-Sub-Saharan. The mean age at diagnosis of sarcoidosis was 43.5 years. On average, patients had 3.5 affected organs concurrently, and an average ePOST of 6. After the biopsy, 41 patients received treatment with either corticosteroid therapy alone or a combination of two or more of the following agents : corticosteroids, methotrexate, hydroxychloroquine, azithromycin, and anti-TNF. More than half of the patients had lymphopenia and elevated ACE levels. Respiratory function parameters were reduced (FVC : 77.2 ± 18.5 ; DLCO : 65.3 ± 17). Regarding the evolution of the disease, patients had a mean COS of 6.1 5 years after biopsy

(corresponding to the persistence of the disease, untreated for more than one year). At the time of inclusion in 2020, 26 out of 52 patients still have persistent sarcoidosis, and 11 of them were resistant to treatment.

In order to determine whether distinct patient profiles could be identified based on their biopsied organ, a multivariate PLS regression analysis was performed (fig. 1). Patients who had liver biopsy were excluded from this study due to significant missing data in their clinical variables. From the multivariate analysis, we identified two distinct clusters of patients : those who had a lung biopsy (AUC = 0.84) and those who had a skin biopsy (AUC = 0.86). Patients who had lung biopsies were male, Caucasian, mean age 37.1, characterized by lower ACE, hypergammaglobulinemia and FVC, and higher calcium and lymphocyte counts ; higher radiological stage and Benamore score ; and lower ePOST and COS scores 5 years after biopsy, indicating less severe disease. By contrast, patients who had skin biopsies were female, of sub-Saharan origin, mean age 43, had higher ACE, hypergammaglobulinemia and FVC, and lower calcium and lymphocyte counts ; lower radiologic stage and Benamore scores ; and higher severity scores (ePOST and COS).

Detection of pJAK2 in sarcoid granuloma from different biopsies

To determine which members of the JAK/STAT pathway were expressed in sarcoidosis granulomas, we examined both activated and non-activated states for all members. Our analysis showed that JAK1, JAK3 et TYK2 were not detected in granulomas. JAK2 and its activated state, pJAK2 (we targeted Y1007 and Y1008, as their phosphorylation is required to activate the catalytic activity of JAK2 (16)) were detected in granulomas from lung, skin, lymph node, liver, and salivary gland biopsies, as well as in inflammatory clusters from kidney biopsies (fig. 2). Using the Hyperion imaging system, we co-localized pJAK2 with various markers of cell populations that form granulomas. pJAK2 was mainly detected in lymphocytes. Apart from regulatory T cells (Tregs), pJAK2 was detected in all lymphocytes subpopulations constituting granulomas : CD4+ T cells, LTh17, CD8+ T cells, and some B cells. However, the activated kinase pJAK2 was poorly expressed in CD68+ cells (fig. 3). In addition, pJAK2 was identified in the tissue surrounding the granuloma. It was detected in the alveolar epithelial cells of the lung as well as the epithelial cells of the epidermis and sweat glands, and fibroblasts of the skin dermis. In addition, it was found in serous acini and secretory ducts of the salivary glands, endothelial cells and Kupffer cells of the liver, and lymphocytes of the lymph nodes. Expression of pJAK2 was predominantly nuclear in all cases. interestingly total JAK2 was located at the plasmic membrane and cytoplasm of macrophages in sarcoid granulomas (fig. 2).

Sarcoid granuloma cells with pJAK2 nuclear expression display high transcriptional activity

We confirmed the nuclear localization of pJAK2 by co-localizing with DAPI and histone H3. Our findings showed that pJAK2 was exclusively nuclear in granuloma cells (fig. 4A-D). We then investigated whether nuclear pJAK2 expression was associated with significant transcriptional activity, by colocalizing it with lysine-4-methylated histone H3 (H3K4me). In granulomas, pJAK2 mainly colocalized with H3K4me, indicating that all pJAK2-expressing cells are transcriptionally active (fig. 4E-F). A previous study indicated that the nuclear translocation of pJAK2 was mediated by the formation of the interferon gamma (IFN- γ) and IFN- γ receptor G1 subunit (IFNG1) complex coupled to the activated kinase pJAK2 (17). In the present study, we detected IFN- γ and IFNG1 exclusively at the plasmic membrane (fig. S2), indicating that nuclear translocation of pJAK2 does not occur via the IFN- γ pathway.

Detection of pSTAT1, pSTAT3 and pSTAT5 in sarcoid granuloma from different biopsies

In parallel, we investigated whether there was activation of one or more STAT transcription factors. STAT4 et STAT6 were not detected in granulomas. STAT1, STAT3, and STAT5 with their active forms were found in granuloma cells from lung, skin, lymph node, and salivary gland biopsies (fig. 5). Interestingly, no STAT expression was detected in liver biopsy granulomas (fig. S3). We observed that pSTAT1 and pSTAT5 were expressed mainly in the central follicle, while pSTAT3 was expressed at the periphery and sometimes in the center of the granuloma. Using Hyperion, we determined that pSTAT1 and pSTAT5 were mainly detected in the CD68+ cells, while pSTAT3 was detected in lymphocytes peripheral to granulomas and occasionally in CD68+ cells within granulomas (fig. 6).

High expression of pJAK2, pSTAT1, pSTAT3 and pSTAT5 in sarcoid granulomas from lung and skin biopsies

To determine the degree of involvement of pJAK2, pSTAT1, pSTAT3 and pSTAT5 in sarcoidosis. We therefore investigated whether all patients and all their granulomas expressed pJAK2, pSTAT1, pSTAT3 and pSTAT5, regardless of the organ affected. Overall, 92.30% of patients had at least one pJAK2-positive granuloma in their biopsy. In these patients, we detected pJAK2 in 643 granulomas out of 878 total granulomas, 73.23% of the pJAK2-positive granulomas. 100% of lung, salivary gland and liver biopsies ; 92.30% of skin biopsies and 75% of lymph node biopsies were pJAK2 positive. In these biopsies, more than 50% of granulomas were pJAK2 positive. Concerning activated STATs, 50.98% of patients were pSTAT1 positive,

46% were pSTAT3 positive and 48% were pSTAT5 positive. These patients had expression levels below 50% of positive granulomas. Specifically, 46.15% of skin biopsies and over 50% of biopsies from other organs were pSTAT1 positive. Whereas 40% of lymph node biopsies and over 50% of other organ biopsies were separately pSTAT3 and pSTAT5 positive. Surprisingly no activated STATs were detected in liver biopsies.

To determine whether higher or lower pJAK2, pSTAT1, pSTAT3, and pSTAT5 expression was associated with a clinical profile or organ(s), we performed a new PLS regression analysis (fig. 7). This study identified three patient groups with high accuracy : those who had lung biopsy (AUC = 0.83), those who had skin biopsy (AUC = 0.89), and those who had lymph node biopsy (AUC = 0.93). On average, the lung and skin groups showed more significant expression of the four proteins : pJAK2, pSTAT1, pSTAT3, and pSTAT5. Interestingly, both these groups were characterized by high signs of activity (hypergammaglobulin, ACE, radiological stage, Benamore score, Epost) and a high COS ($COS \geq 5$) corresponding to persistent disease. Specifically, the expression of pJAK2 was slightly elevated in the lung group, whereas pSTATs, specifically pSTAT3, showed higher levels in the skin group.

Different organ signatures : pJAK2 / pSTAT1-pSTAT5 in lung and pJAK2 / pSTAT3-pSTAT5 in skin

We expanded our analysis to include organ-specific signatures, i.e. the presence of at least two of the detected proteins (pJAK2, pSTAT1, pSTAT3 and pSTAT5) in granulomas from the same biopsy (without necessarily expressing them in the same granulomas) (fig. 8). Two distinct groups were identified : the lung group (AUC=0.84) and the skin group (AUC=0.80). Both groups showed predominant signatures associated with a more severe profile. Indeed, lung biopsies displayed a higher expression of the pJAK2/pSTAT1-pSTAT5 signature, which was associated with a particularly high radiologic stage and Benamore score. In contrast, skin biopsies demonstrated a higher expression of the pJAK2/pSTAT3-pSTAT5 signature, which was also associated with a higher ePOST.

Activation of pSTAT1, pSTAT3 and pSTAT5 in sarcoid granuloma correlates with presence of florid stage

We approached severity in another way, to determine whether pJAK2, pSTAT1, pSTAT3 and pSTAT5 expression correlated with early or late stages of granuloma development, giving us insight into the involvement of these proteins in granuloma formation and/or persistence. First of all, we found no differences in the distribution of these stages in different organs (fig. S5).

Afterward, we independently correlated the expression of pJAK2, pSTAT1, pSTAT3, and pSTAT5 with the stages of development of sarcoidosis granulomas identified in the five biopsied organs (fig. 9). Firstly, we found that pJAK2 tends to be positively correlated with nascent granuloma, has no correlation with florid granuloma, tends to be negatively correlated with naked granuloma and significantly correlated with fibrotic granuloma ($r=-0.30$, $p<0.05$). Interestingly, pSTAT1, pSTAT3, and pSTAT5 show similar correlations with the developmental stages of sarcoid granuloma. There was no correlation between pSTAT1, pSTAT3, and pSTAT5 and nascent granuloma. However, there was a significant positive correlation with florid granuloma (pSTAT1($r=0.30$, $p<0.05$), pSTAT3 ($r=0.28$, $p<0.05$), pSTAT5 ($r=0.38$, $p<0.01$)) and a tendency to a negative correlation with naked stage. Additionally, except for pSTAT1, there was a tendency for pSTAT3 and pSTAT5 to negatively correlate with fibrous granuloma.

Discussion

In recent years, numerous studies have described the possible role for the JAK/STAT pathway in the pathogenesis of sarcoidosis. However, according to our knowledge, this is the largest immunohistochemical series investigating the expression of all members of the JAK/STAT pathway in different organs affected by sarcoidosis. In this work, we investigated the link between activation of the JAK/STAT pathway in the granuloma and the severity of sarcoidosis. Differences in JAK/STAT expression between organs, depending on disease activity or chronicity, could have a real clinical impact.

Among all members of the JAK/STAT pathway, only the activated forms pJAK2, pSTAT1, pSTAT3 and pSTAT5 were detected in the biopsies studied, namely lung, skin, lymph node and salivary gland biopsies, and only pJAK2 in liver biopsies. These activated proteins were detected not only in granulomas, but also in surrounding cells. Concerning pJAK2, our observations concur with those reported in a study of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and rheumatoid arthritis (RA) : pJAK2 was detected in the nuclei of epithelial cells, endothelial cells, fibroblasts in lung biopsies and lymphocytes in lymph nodes (18). These observations illustrate the establishment of a cytokine environment by the granuloma which affect the surrounding cells.

Interestingly, we detected a non-canonical pathway with pJAK2 activation at the nuclear level in granuloma cells. By contrast pJAK2 was cytoplasmic in lymph node T cells from healthy subjects. The percentage of pJAK2-positive patients was 92.30%, while the percentage of

pJAK2 expression (the number of positive granulomas in relation to the number of total granulomas) was 73.23%. pJAK2 was localized and detected mainly in lymphocytes, specifically LTCD4+, LTCD8+, LTh17, some LB and absent in Treg. The difference in expression between Treg and other lymphocyte subpopulations is probably due to the deregulated phenotype of Treg in sarcoidosis. Tregs have been shown to exhibit altered survival and increased susceptibility to CD95L-induced apoptosis, while nuclear JAK2 is associated with high cell turnover (19,20).

Observing pJAK2 in the nuclei, without detecting total JAK2 and activated STAT in the same cells, suggests that inactive JAK2 undergoes nuclear translocation, resulting in a conformational change, and is subsequently activated within the nucleus. The mechanism of translocation and the role of nuclear pJAK2 in granuloma remain to be elucidated.

In the granuloma, pJAK2-positive cells are characterized by high transcriptional activity (H3K4me-positive). Other studies have detected nuclear pJAK2 in hematopoietic cells, and its nuclear translocation has been associated with high cell turnover (20). In a pathological context, a recent study showed that in addition to the canonical pathway, a non-canonical pJAK2 pathway was detected in IPF and RA (21). It has been shown that nuclear pJAK2 can play a role in epigenetic control : by phosphorylating histone H3 on Tyrosine 41 (H3Y41) resulting in direct regulation of heterochromatin architecture and gene expression or by phosphorylating protein 1 alpha (HP1) in myeloproliferative disorders and myeloid malignancies (22,23).

Concerning STAT transcription factors, only pSTAT1, pSTAT3 and pSTAT5 were detected in sarcoid granuloma. At least one STAT is activated in biopsy granulomas, illustrating the essential role of the JAK/STAT pathway in sarcoidosis. 50.98% of patients were positive for pSTAT1 with 38.43% of granulomas labeled, 46% of patients were positive for pSTAT3 with 24.12% of granulomas labeled and 48% of patients were positive for pSTAT5 with 21.34% of granulomas labeled. A recent study showed quite similar observations : among 60 biopsies including lung, skin, lymph nodes, bone marrow and nasal turbinate, 50% were positive for pSTAT1 and pSTAT3. We detected pSTAT1 and pSTAT5 activation mainly in cells of the myeloid lineage, while pSTAT3, depending on the granuloma, was detected in cells of the myeloid lineage and/or in peripheral lymphocytes. Interestingly, pSTAT5 activation in granuloma has never been shown before, while pSTAT1 and pSTAT3 have been detected in other studies. Damsky et al. showed that all the biopsies analyzed (21 skin biopsies) were positive for pSTAT1 and pSTAT3. pSTAT1 was found in the center of the granuloma, mainly in macrophages, whereas pSTAT3 was found more in lymphocytes in the periphery of the

granuloma (24). This was confirmed by another recent study on different biopsied organs with sarcoidosis (25). Activation of pSTAT1, pSTAT3, pSTAT5 is probably the result of the canonical JAK2-mediated pathway detected in macrophages. The non-detection of pJAK2 at the cytoplasm/membrane level is probably due to the fact that the biopsy collection and fixation process potentially affected certain molecular characteristics of the sample, including the activation state of JAK2.

The variability of pJAK2, pSTAT1, pSTAT3 and pSTAT5 expression in our study cohort prompted us to ask whether it is related to disease severity. We found that patients with lung and skin biopsies had the highest severity parameters and scores : higher radiological stage and Benamore score for lung biopsies, and higher COS and ePOST for skin biopsies. These same patients had the highest percentages of pJAK2, pSTAT1, pSTAT3 and pSTAT5 expression, with higher pSTAT3 expression in patients with skin biopsies. In contrast, Kraaijvanger et al. have shown that high immunohistochemical scores of pSTAT1 and pSTAT3 are unrelated to COS and Scadding score and thus to disease severity (25). This may be explained by the fact that we used a different multivariate statistical approach taking into account organ variability.

Among all the signatures found in the organs analyzed, two predominant signatures were identified and associated with a rather severe profile : pJAK2/pSTAT1-pSTAT5 in lung biopsies and pJAK2/pSTAT3-pSTAT5 in skin biopsies. This result suggests that the molecular mechanisms activated during sarcoid granuloma formation are impacted by the affected organ. For example, fibroblasts are abundant cells in the skin, with the capacity to secrete several cytokines such as IL-6, IL-11, CNTF, OSM, IL-27, IL-22 activating STAT3 in an autocrine manner (26). The same cytokines were found in sarcoidosis lesions (27,28). This suggests that fibroblasts may promote STAT3 activation in cutaneous granulomas. It has been shown that activation of STAT3 in fibroblasts is associated with inflammatory diseases characterized by excessive tissue fibrosis such as systemic scleroderma or IPF (29,30). The variability of signatures depending on the organ affected, resulting from two different cytokine environments, could also explain the variable response to tofacitinb (JAK1, JAK3 and JAK2 inhibitor) observed in a patient with clinical and histological remission of skin involvement and no improvement in lung involvement (24). It has been shown that the effect of tofacitinib can be influenced by cytokine receptor specificity, cell types present, activating cytokines and pathological context (31).

We approached the evolution of sarcoidosis in another way by correlating the stages of granuloma development in all biopsies with the percentages of pJAK2, pSTAT1, pSTAT3 and

pSTAT5 expression. Interestingly, we found that pSTAT1, pSTAT3 and pSTAT5 expression levels correlated significantly with florid granulomas and inversely with naked and fibrous granulomas. This result suggests that activation of the canonical JAK/STAT pathway, and more specifically STAT1, STAT3 and STAT5, is involved in the mechanisms of granuloma formation rather than their persistence. STAT1 and STAT5 are known to be involved in M1 polarization, while STAT3 is involved in M2 polarization and Th2 and Th17 differentiation (32,33). These transcription factors are likely to mediate the M1/Th1 and M2/Th2 balance in sarcoid granuloma.

There are certain limitations in our study. Firstly, biopsy staining only gives information regarding one time point of the disease ; therefore, the following disease course cannot be visualized by this approach. Gathering information on the activity of JAK/STAT pathway members at different points in the disease course would provide more relevant information on the role of the canonical JAK/STAT pathway and non-canonical JAK2 in the pathogenesis of sarcoidosis. Secondly, the patient cohort, including the number of biopsies per organ is relatively small for multivariate testing, and therefore allows only predictive conclusions to be drawn.

Our results show the activation of a non-canonical JAK2 pathway in granuloma lymphocytes and potentially of the canonical pathway involving the activation of STAT1, STAT3 and STAT5 in myeloid cells. Both pathways are associated with the severity of the organs most affected, namely lung and skin. However, their expression is only correlated with granuloma development, with no apparent link to persistence and fibrotic stage. Further investigations are needed to confirm the presence of these two pathways and understand their roles in granuloma development.

References

1. Valeyre D, Prasse A, Nunes H, Uzunhan Y, Brillet PY, Müller-Quernheim J. Sarcoidosis. *Lancet*. 29 mars 2014;383(9923):1155-67.
2. Baughman RP, Nagai S, Balter M, Costabel U, Drent M, du Bois R, et al. Defining the clinical outcome status (COS) in sarcoidosis: results of WASOG Task Force. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. juill 2011;28(1):56-64.
3. Jamilloux Y, Maucort-Boulch D, Kerever S, Gerfaud-Valentin M, Broussolle C, Eb M, et al. Sarcoidosis-related mortality in France: a multiple-cause-of-death analysis. *European Respiratory Journal*. 1 déc 2016;48(6):1700-9.

4. Nardi A, Brillet PY, Letoumelin P, Girard F, Brauner M, Uzunhan Y, et al. Stage IV sarcoidosis: comparison of survival with the general population and causes of death. *Eur Respir J*. déc 2011;38(6):1368-73.
5. Duchemann B, Annesi-Maesano I, Jacobe de Naurois C, Sanyal S, Brillet PY, Brauner M, et al. Prevalence and incidence of interstitial lung diseases in a multi-ethnic county of Greater Paris. *Eur Respir J*. août 2017;50(2):1602419.
6. Broos CE, van Nimwegen M, Hoogsteden HC, Hendriks RW, Kool M, van den Blink B. Granuloma formation in pulmonary sarcoidosis. *Front Immunol*. 10 déc 2013;4:437.
7. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*. févr 2002;285(1-2):1-24.
8. Zhou T, Zhang W, Sweiss NJ, Chen ES, Moller DR, Knox KS, et al. Peripheral blood gene expression as a novel genomic biomarker in complicated sarcoidosis. *PLoS One*. 2012;7(9):e44818.
9. Rotenberg C, Besnard V, Brillet PY, Giraudier S, Nunes H, Valeyre D. Dramatic response of refractory sarcoidosis under ruxolitinib in a patient with associated JAK2-mutated polycythemia. *Eur Respir J*. déc 2018;52(6):1801482.
10. Damsky W, Thakral D, Emeagwali N, Galan A, King B. Tofacitinib Treatment and Molecular Analysis of Cutaneous Sarcoidosis. *N Engl J Med*. 27 déc 2018;379(26):2540-6.
11. Statement on Sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. août 1999;160(2):736-55.
12. Benamore R, Kendrick YR, Repapi E, Helm E, Cole SL, Taylor S, et al. CTAS: a CT score to quantify disease activity in pulmonary sarcoidosis. *Thorax*. déc 2016;71(12):1161-3.
13. Judson MA, Baughman RP, Costabel U, Flavin S, Lo KH, Kavuru MS, et al. Efficacy of infliximab in extrapulmonary sarcoidosis: results from a randomised trial. *Eur Respir J*. juin 2008;31(6):1189-96.
14. Assistance Publique - Hôpitaux de Paris. Expression and Role of the JAK/STAT Pathway in Sarcoidosis Granuloma Cells [Internet]. clinicaltrials.gov; 2022 oct [cité 25 sept 2023]. Report No.: NCT04751279. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04751279>
15. Rogers FJ, Haserick JR. Sarcoidosis and the Kveim Reaction¹. *Journal of Investigative Dermatology*. nov 1954;23(5):389-406.
16. Feng J, Witthuhn BA, Matsuda T, Kohlhuber F, Kerr IM, Ihle JN. Activation of Jak2 Catalytic Activity Requires Phosphorylation of Y1007 in the Kinase Activation Loop. *Molecular and Cellular Biology* [Internet]. 1 mai 1997 [cité 27 sept 2023]; Disponible sur: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1128/MCB.17.5.2497>
17. Noon-Song EN, Ahmed CM, Dabelic R, Canton J, Johnson HM. Controlling nuclear JAKs and STATs for specific gene activation by IFN γ . *Biochem Biophys Res Commun*. 8 juill 2011;410(3):648-53.

18. Wang S, Liu M, Li X, Zhang J, Wang F, Zhang C, et al. Canonical and noncanonical regulatory roles for JAK2 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *The FASEB Journal*. 2022;36(6):e22336.
19. Broos CE, van Nimwegen M, Kleinjan A, ten Berge B, Muskens F, in 't Veen JCCM, et al. Impaired survival of regulatory T cells in pulmonary sarcoidosis. *Respir Res*. 16 sept 2015;16(1):108.
20. Zouein FA, Duhé RJ, Booz GW. JAKs go nuclear: Emerging role of nuclear JAK1 and JAK2 in gene expression and cell growth. *Growth Factors*. déc 2011;29(6):245-52.
21. Wang S, Liu M, Li X, Zhang J, Wang F, Zhang C, et al. Canonical and noncanonical regulatory roles for JAK2 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *FASEB J*. juin 2022;36(6):e22336.
22. Dawson MA, Foster SD, Bannister AJ, Robson SC, Hannah R, Wang X, et al. Three Distinct Patterns of Histone H3Y41 Phosphorylation Mark Active Genes. *Cell Reports*. sept 2012;2(3):470-7.
23. Dawson MA, Bannister AJ, Göttgens B, Foster SD, Bartke T, Green AR, et al. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1 α from chromatin. *Nature*. oct 2009;461(7265):819-22.
24. Damsky W, Thakral D, Emeagwali N, Galan A, King B. Tofacitinib Treatment and Molecular Analysis of Cutaneous Sarcoidosis. *New England Journal of Medicine*. 27 déc 2018;379(26):2540-6.
25. Kraaijvanger R, Ambarus CA, Damen J, van der Vis JJ, Kazemier KM, Grutters JC, et al. Simultaneous Assessment of mTORC1, JAK/STAT, and NLRP3 Inflammasome Activation Pathways in Patients with Sarcoidosis. *Int J Mol Sci*. 14 août 2023;24(16):12792.
26. West NR. Coordination of Immune-Stroma Crosstalk by IL-6 Family Cytokines. *Front Immunol*. 15 mai 2019;10:1093.
27. Boleto G, Vieira M, Desbois AC, Saadoun D, Cacoub P. Emerging Molecular Targets for the Treatment of Refractory Sarcoidosis. *Frontiers in Medicine* [Internet]. 2020 [cité 1 févr 2024];7. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2020.594133>
28. Ringkowski S, Thomas PS, Herbert C. Interleukin-12 family cytokines and sarcoidosis. *Frontiers in Pharmacology* [Internet]. 2014 [cité 1 févr 2024];5. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2014.00233>
29. Chakraborty D, Šumová B, Mallano T, Chen CW, Distler A, Bergmann C, et al. Activation of STAT3 integrates common profibrotic pathways to promote fibroblast activation and tissue fibrosis. *Nat Commun*. 24 oct 2017;8(1):1130.
30. Milara J, Hernandez G, Ballester B, Morell A, Roger I, Montero P, et al. The JAK2 pathway is activated in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 6 févr 2018;19(1):24.
31. Palmroth M, Kuuliala K, Peltomaa R, Virtanen A, Kuuliala A, Kurttila A, et al. Tofacitinib Suppresses Several JAK-STAT Pathways in Rheumatoid Arthritis In Vivo and Baseline Signaling Profile Associates With Treatment Response. *Front Immunol*. 24 sept 2021;12:738481.

32. Benveniste E, Liu Y, McFarland B, Qin H. Involvement of the Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling Pathway in Multiple Sclerosis and the Animal Model of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 1 août 2014;34:577-88.
33. Li M, Wang M, Wen Y, Zhang H, Zhao G, Gao Q. Signaling pathways in macrophages: molecular mechanisms and therapeutic targets. *MedComm* (2020). 11 sept 2023;4(5):e349.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the cohort

General characteristics	Patients (n=52)	MD
Age-years (mean ± SD)	43.5 ± 11.7	
Female sex (n (%))	27 (51.9)	
Afro sub saharan (n (%))	19 (36.5)	
Caucasian (n (%))	33 (63.5)	
Affected organs (mean ± SD)	3.5± 1.8	
Lofgren syndrome (n(%))	5 (9.6)	
Treated (n (%))	45(86.5)	
Signs of activity		
Hypercalcemia (n (%))	3 (6.7)	7
Hypergammaglobulinemia (n (%))	15 (41.7)	16
Lymphopenia (n (%))	31 (81.6)	14
ACE (n (%))	29 (60.4)	4
FVC % (mean ± SD)	77.2 ± 18.5	6
DLCO % (mean ± SD)	65.3 ± 17	8
Radiological stage (n (%))		
0	7 (13.7)	
I	8 (15.7)	
II	23 (45)	1
III	5 (9.8)	
IV	8 (15.7)	
ePOST (mean ± SD)	6 ± 4.8	
Evolution		
Persistence (n (%))	26 (55.3)	5
Deaths (n (%))	8 (15.3)	
Treatment resistance (n (%))	11 (25.6)	2
COS (mean ± SD)	6.1 ± 3.25	

Data are expressed in mean ± SD or N (%) ; ACE, angiotensin converting enzyme ; FVC, forced vital capacity; DLCO, diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; ePOST, extrapulmonary physician organ severity tool (in our case, we included lung involvement) ; COS, clinical outcome status ; MD, missing data.

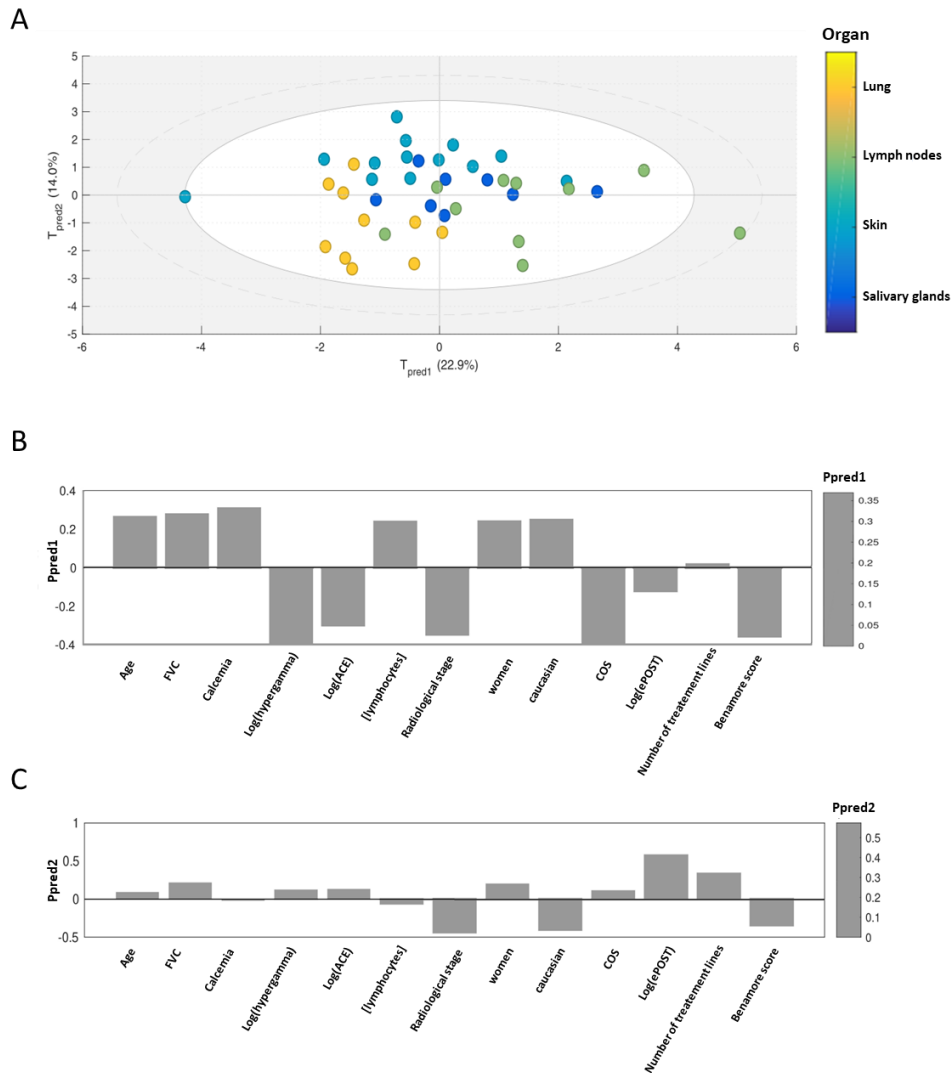


Figure 1. PLS regression between biopsied organs and patient characteristics. Score plot representing patients with lung biopsy as yellow dots (AUC = 0.84) and those with skin biopsy as cyan dots (AUC = 0.86) (A). The Pred1 loading plot shows all the significant variables that separate the lung and skin groups from the other two organs (lymph nodes and salivary glands) : Log (hypergamma), Log (ACE), radiological stage, COS, Log (ePOST), Benamore score (B). The Ppred2 loading plot shows the significant variables that separate the skin group from the lung group : FVC, Log (hypergamma), Log (ACE), women, COS, Log (ePOST) (C). The loading plot helps to identify which variables contribute most to the variability observed in the data ; each variable is represented by a histogram bar in this space, and the direction of that bar indicates the correlation between the variable and the main axis. Variables with similar bars are strongly related and tend to vary together. All significant variables have a $p < 0.001$.

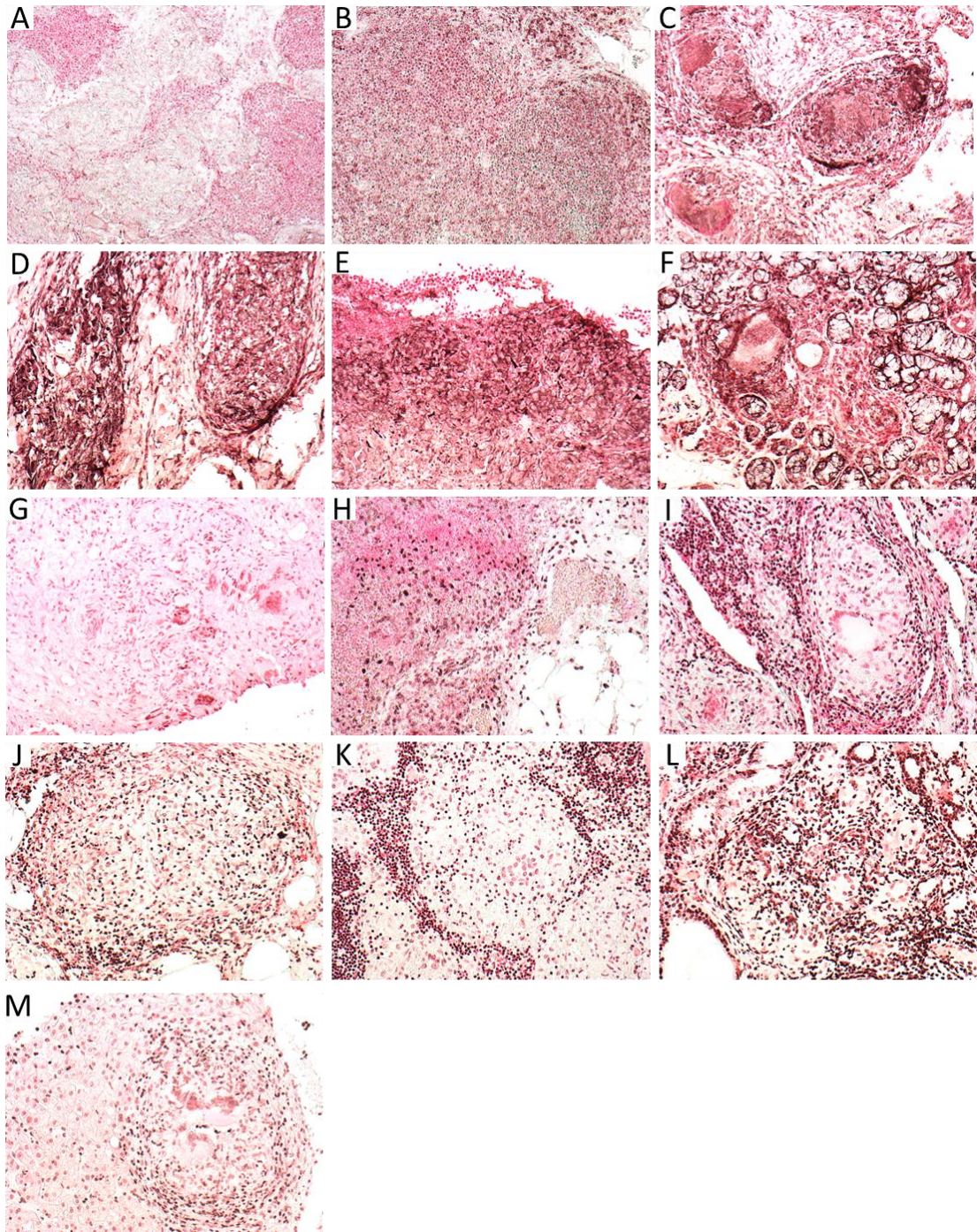


Figure 2. Immunohistochemical analysis of JAK2 and pJAK2 in sarcoïd granulomas from different biopsies. Isotype control (A). JAK2 in control (B). JAK2 detected in lung (C) skin (D) lymph node (E) salivary gland (F) undetected hepatic granuloma (G). pJAK2 in control (H). pJAK2 detected in lung (I) skin (J) lymph node (K) salivary gland (L) hepatic (M). Magnification x 200

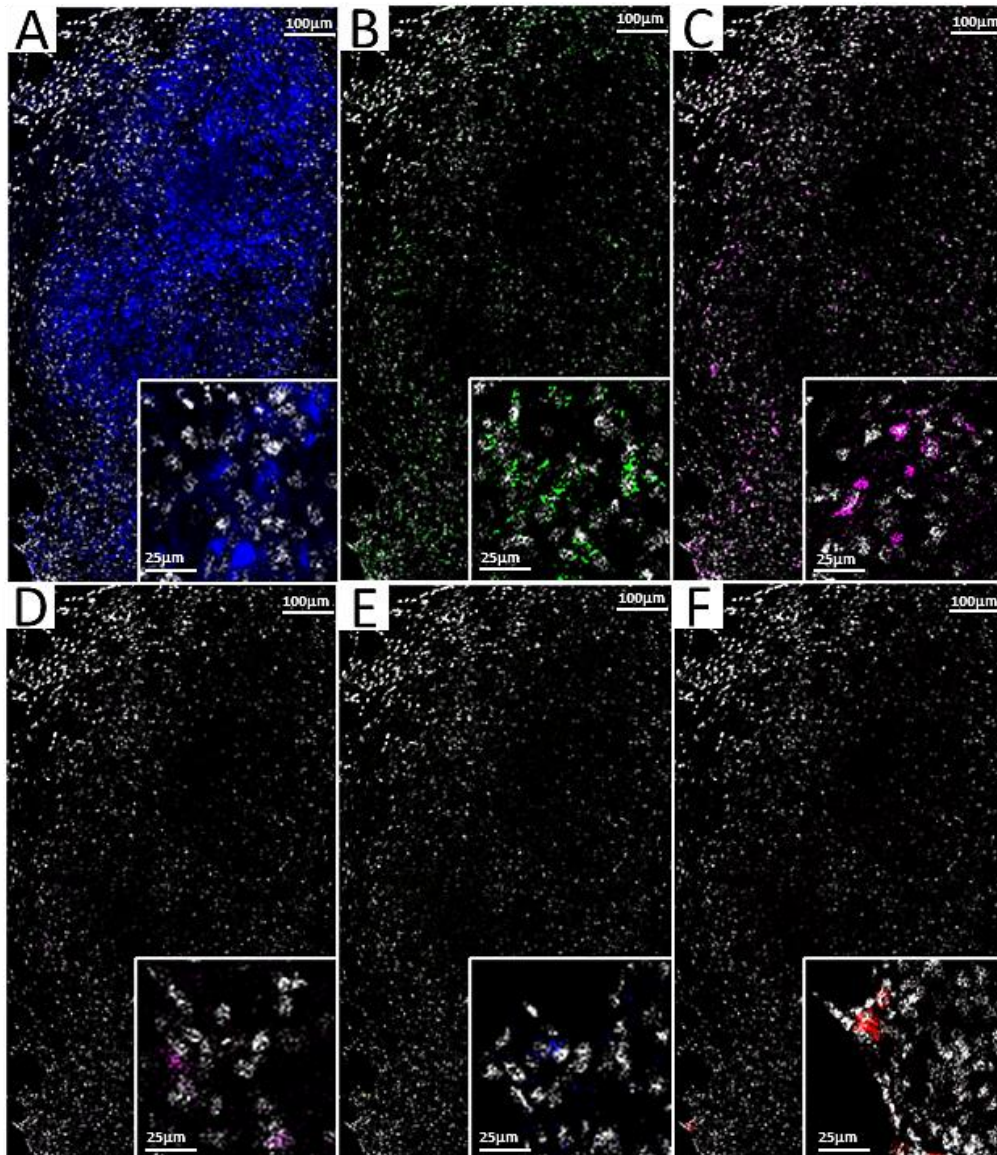


Figure 3. Hyperion imaging mass cytometry showing simultaneous immunophenotyping of inflammatory cells and nuclear pJAK2 expressing cells in a granulomatous structure in a lung biopsy from a sarcoidosis patient. Nuclear pJAK2 (white) is : absent in CD68⁺ cells (blue) (A), present in most CD4⁺ cells (green) (B), present in CD8a⁺ cells (magenta) (C), absent in Foxp3⁺ cells (magenta) (D), present in IL17⁺ cells (blue) (E), present in some CD20⁺ cells (red) (F).

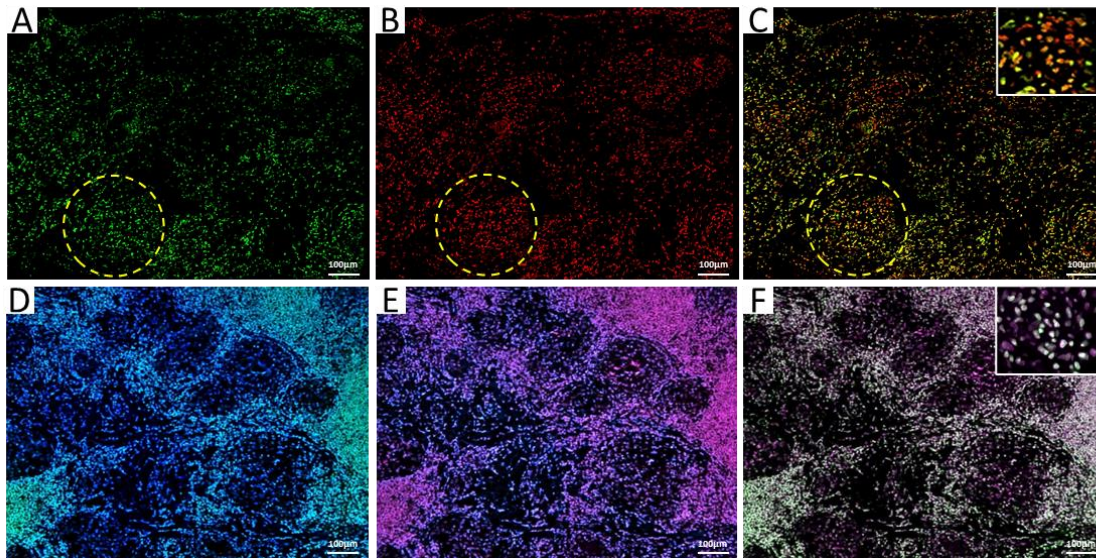


Figure 4. Colocalization of pJAK2 with histones in a sarcoidosis granuloma by immunofluorescence. pJAK2 (green) in granuloma cells surrounded in yellow (A). Histone H3 in red (B). Colocalization of pJAK2 with histone H3 (orange) (C). pJAK2 (cyan) (D) and H3K4me (magenta) (E) were identified in the nuclei of some granuloma cells. pJAK2 was colocalized in H3K4me-positive cells (white or bright green) (F).

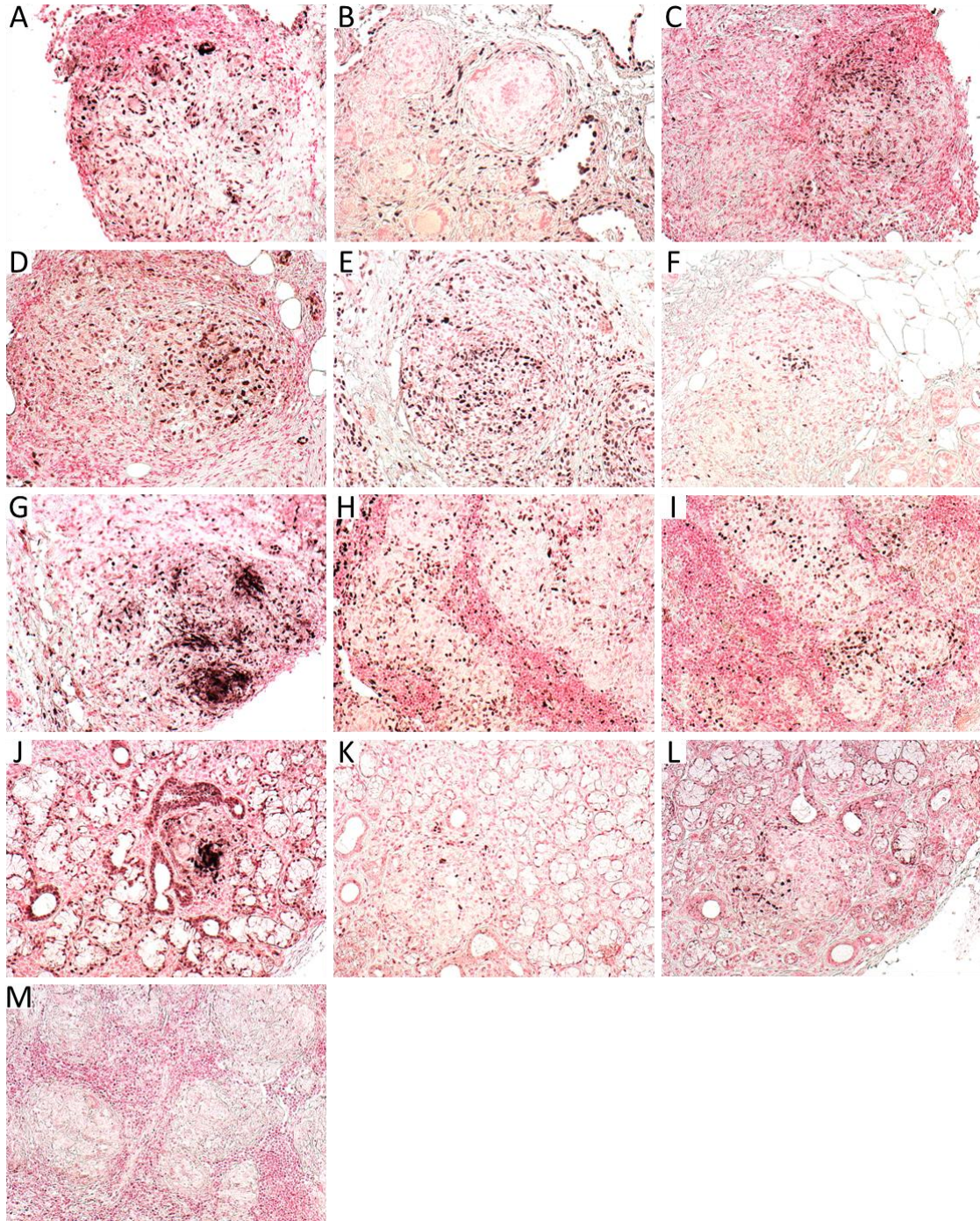


Figure 5. Immunohistochemical analysis of pSTAT1, pSTAT3 and pSTAT5 in sarcoid granulomas from different biopsies. pSTAT1 (A-J), pSTAT3 (B-K) and pSTAT5 (C-L) were detected in lung (A-C) skin (D-F) lymph nodes (G-I) and salivary glands (J-L). Isotype control (M). Magnification x 200

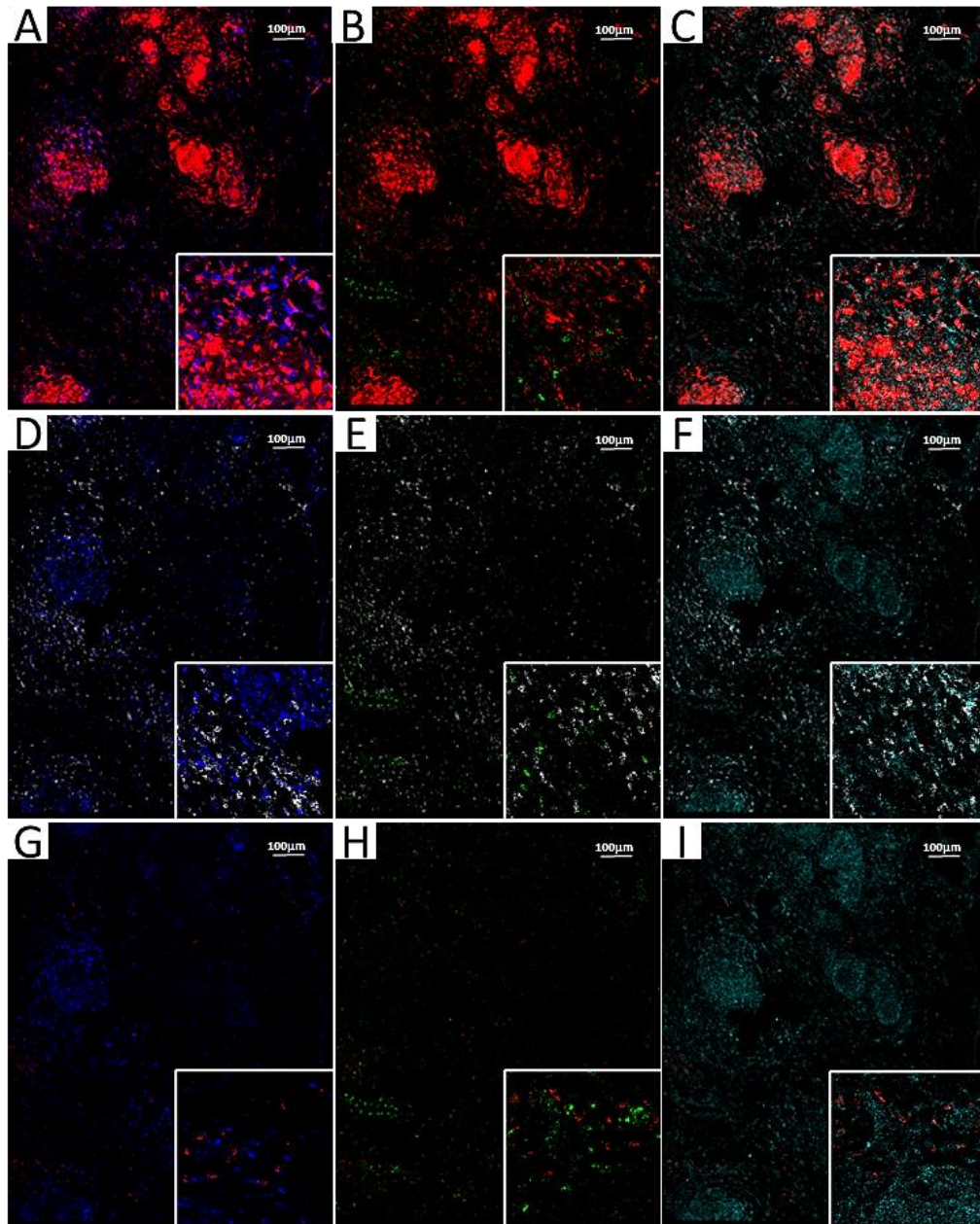


Figure 6. Hyperion imaging mass cytometry showing simultaneous immunophenotyping of inflammatory cells and nuclear pSTAT expressing cells in a granulomatous structure in a lung biopsy from a sarcoidosis patient. Nuclear pSTAT1 (blue) is : present in CD68⁺ cells (red) (A), absent in most CD3⁺ cells (white) (D), absent in CD20⁺ cells (red) (G). Nuclear pSTAT3 (blue) is : absent in CD68⁺ cells (red) (B), absent in most CD3⁺ cells (white) (E), absent in CD20⁺ cells (red) (H). Nuclear pSTAT5 (cyan) is : present in CD68⁺ cells (red) (C), absent in most CD3⁺ cells (white) (F), absent in CD20⁺ cells (red) (I).

Table 2. Percentage of positive patients and level of expression of pJAK2, pSTAT1, pSTAT3, pSTAT5 in different biopsies

Samples analyzed	Positive pJAK2-%	PG/TG (%)	Positive pSTAT1-%	PG/TG (%)	Positive pSTAT3-%	PG/TG (%)	Positive pSTAT5-%	PG/TG (%)
Total biopsies n = 52	92.30	643/878 (73.23)	50.98	299/778 (38.43)	46	192/796 (24.12)	48	168/787 (21.34)
Lung biopsies n = 10	100	190/220 (86.36)	70	59/228 (25.87)	60	19/228 (8.33)	70	42/216 (19.44)
Lymph node biopsies n = 12	75	178/335 (53.13)	72	178/357 (49.85)	40	108/357 (30.25)	40	61/357 (17.08)
Skin biopsies n = 13	92.30	136/176 (77.27)	46.15	51/171 (29.82)	61.53	57/180 (31.66)	53.84	45/180 (25)
Salivary gland biopsies n = 8	100	23/29 (79.31)	62.5	11/22 (50)	62.5	8/31 (25.80)	75	20/34 (58.82)
Liver biopsies n = 9	100	116/118 (98.30)	0	0	0	0	0	0

PG/TG : positive granulomas/total granulomas

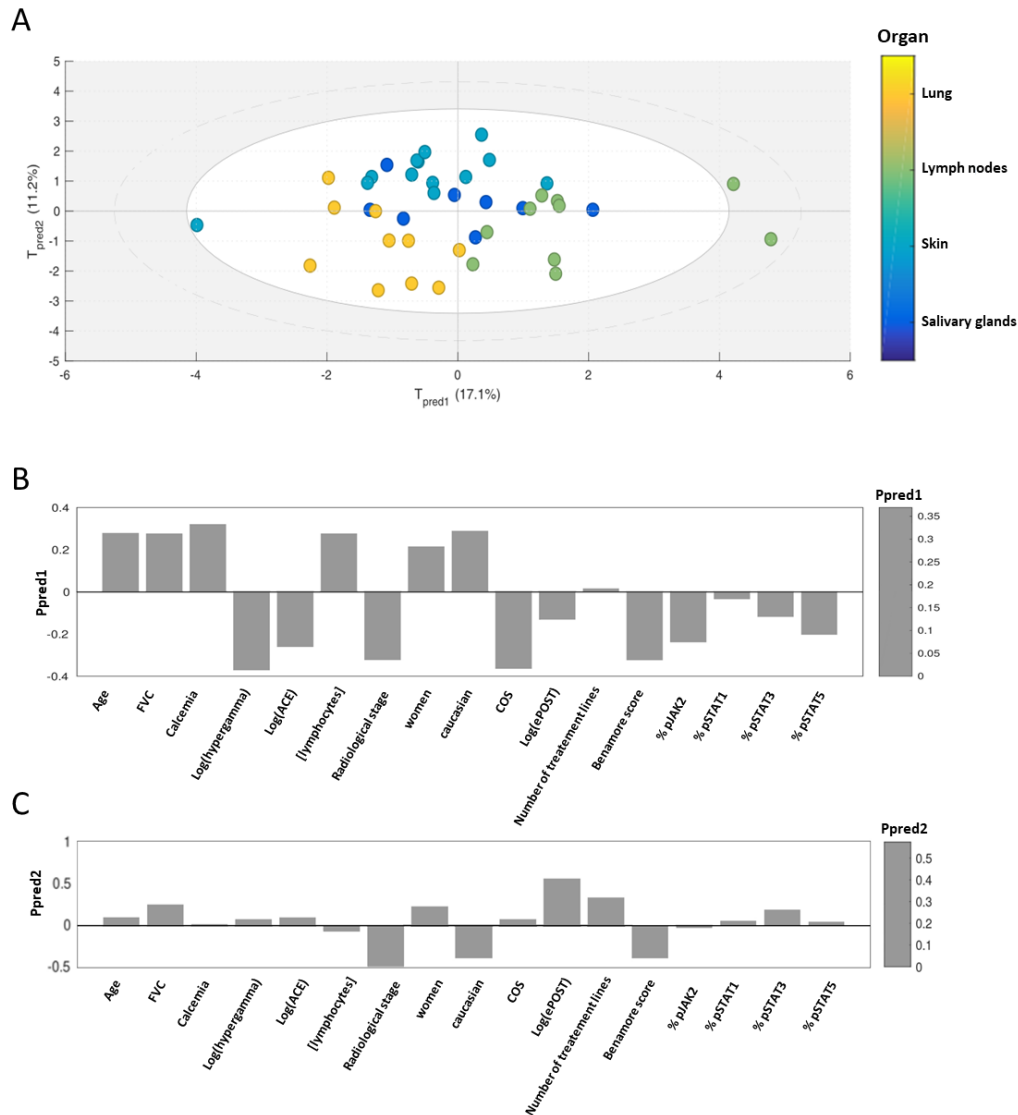


Figure 7. PLS regression between biopsied organs and patient characteristics including protein expression levels. Score plot representing patients with lung biopsy as yellow dots (AUC = 0.84) and those with skin biopsy as cyan dots (AUC = 0.86) (A). The Pred1 loading plot shows all the significant variables that separate the lung and skin groups from the other two organs (lymph nodes and salivary glands); Log (hypergamma), Log (ACE), radiological stage, COS, Log (ePost), Benamora score, % JAK2, % STAT1, % STAT3, % STAT5 (B). The Ppred2 loading plot shows the significant variables that separate the skin group from the lung group: Age, FVC, Log (hypergamma), Log (ACE), women, COS, Log (ePOST), % pSTAT3 (C). All significant variables have a $p < 0.001$.

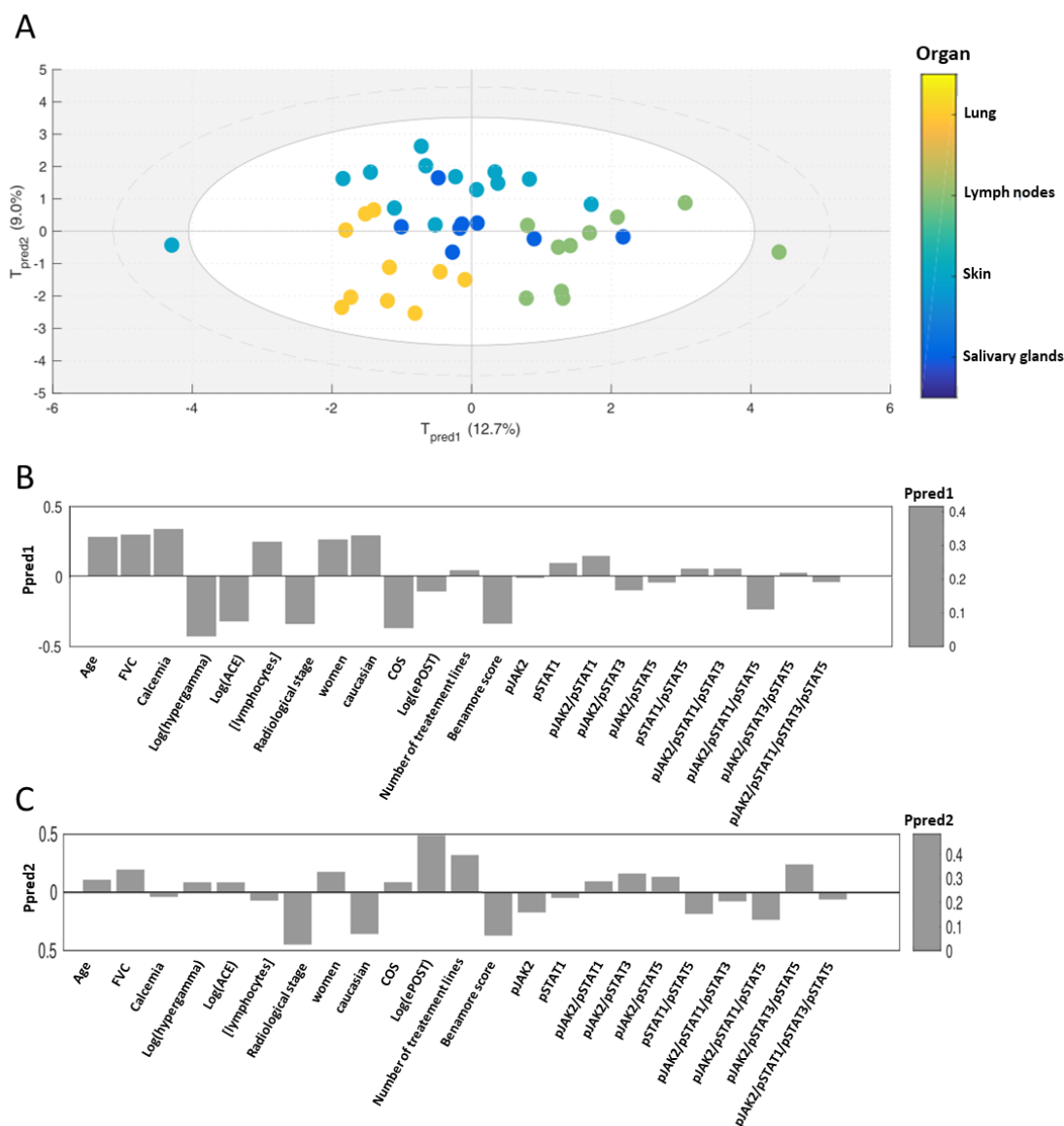


Figure 8. PLS regression between biopsied organs and patient characteristics including detected signatures. Score plot representing patients with lung biopsy as yellow dots (AUC = 0.84) and those with skin biopsy as cyan dots (AUC = 0.86) (A). The Pred1 loading plot shows all the significant variables that separate the lung and skin groups from the other two organs (lymph nodes and salivary glands) : Log (hypergamma), Log (ACE), radiological stage, COS, Log (ePost), Benamore score, pJAK2/pSTAT3, pJAK2/pSTAT5, pJAK2/pSTAT1/pSTAT5, pJAK2/pSTAT1/pSTAT3/pSTAT5 (B). The Ppred2 loading plot shows the significant variables that separate the skin group from the lung group : Age, FVC, Log (hypergamma), Log (ACE), women, COS, Log (ePOST), pJAK2/pSTAT1, pJAK2/pSTAT3, pJAK2/pSTAT5, pJAK2/pSTAT3/pSTAT5 (C). All significant variables have a $p < 0.001$.

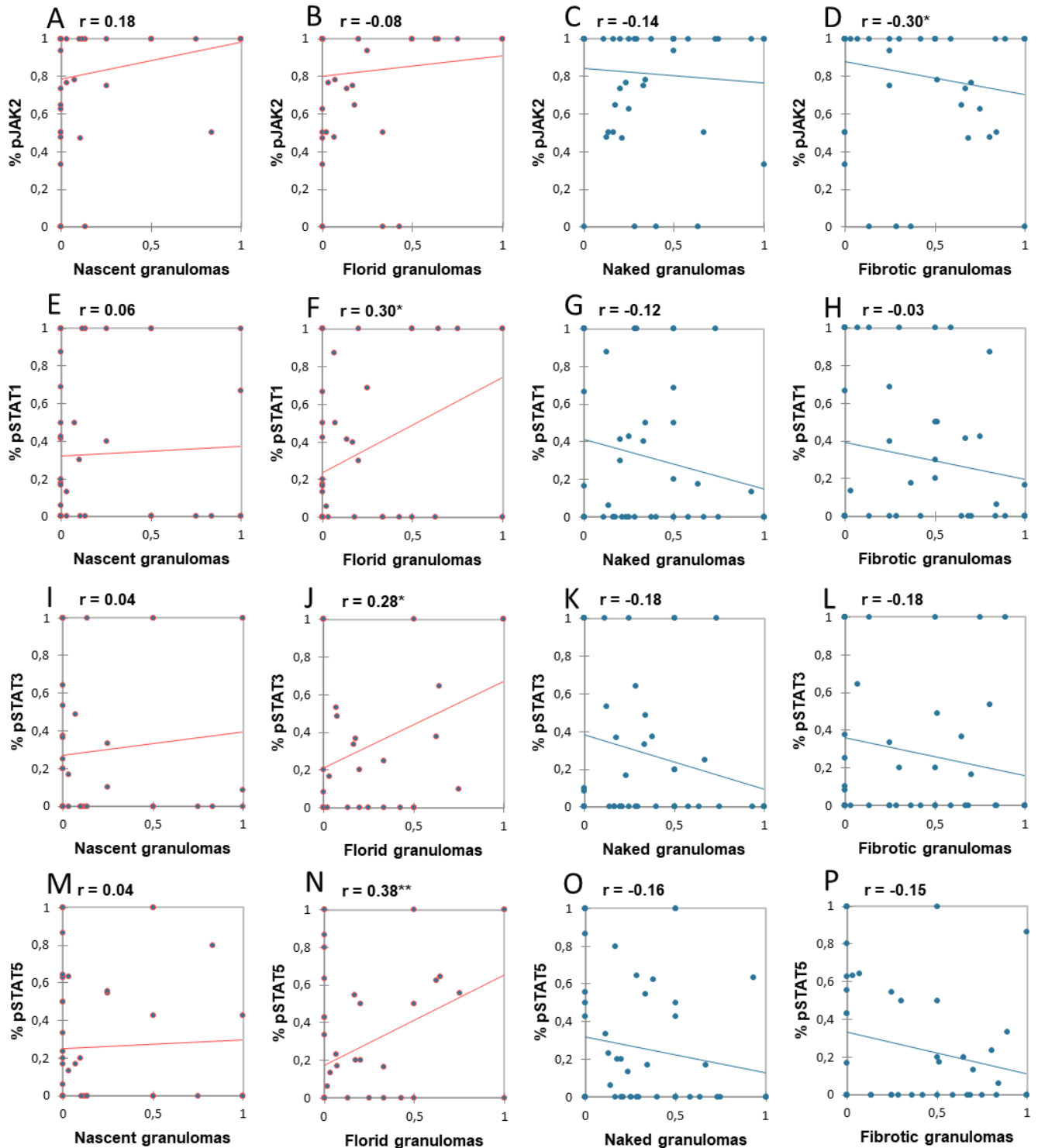


Figure 9. Correlation plots were generated to show the relationship between pJAK1, pSTAT1, pSTAT3, and pSTAT5 levels and the stages of granuloma evolution in various organs. Correlation between the percentage of pJAK2, pSTAT1, pSTAT3 and pSTAT5 expression and the presence of the nascent granuloma stage (A) (E) (I) (M). Florid granuloma stage (B) (F) (J) (N). Naked granuloma stage (C) (G) (K) (O). Fibrotic granuloma stage (D) (H) (L) (P). Spearman's correlation method was used to analyze data, N=52 patients. The correlation coefficients r are indicated in the graphs, and for each coefficient, we calculated the p-value. The stars represent significance levels, with * indicating $p < 0.05$ and ** indicating $p < 0.01$.

Supplementary Data

Table S1. Antibody characteristics

Specificity	Clone	Unmasking solution	source
JAK2	D2E12	EDTA-Tris	Cell signaling
STAT1	D4Y6Z	EDTA-Tris	Cell signaling
STAT3	124H6	EDTA-Tris	Cell signaling
STAT5	D3N2B	EDTA-Tris	Cell signaling
pJAK2	E132	Citrate	Abcam
pSTAT1	58D6	EDTA-Tris	Cell signaling
pSTAT3	D3A7	EDTA-Tris	Cell signaling
pSTAT5	C11C5	EDTA-Tris	Cell signaling
CD3	Polyclonal	EDTA-Tris	Standard Biotools
CD68	KP1	EDTA-Tris	Standard Biotools
CD4	ab181724	EDTA-Tris	Abcam
CD8a	C8/144B	EDTA-Tris	Standard Biotools
Foxp3	PCH101	EDTA-Tris	Standard Biotools
IL17	AF-317	EDTA-Tris	Biotechne
CD20	H1	EDTA-Tris	Standard Biotools

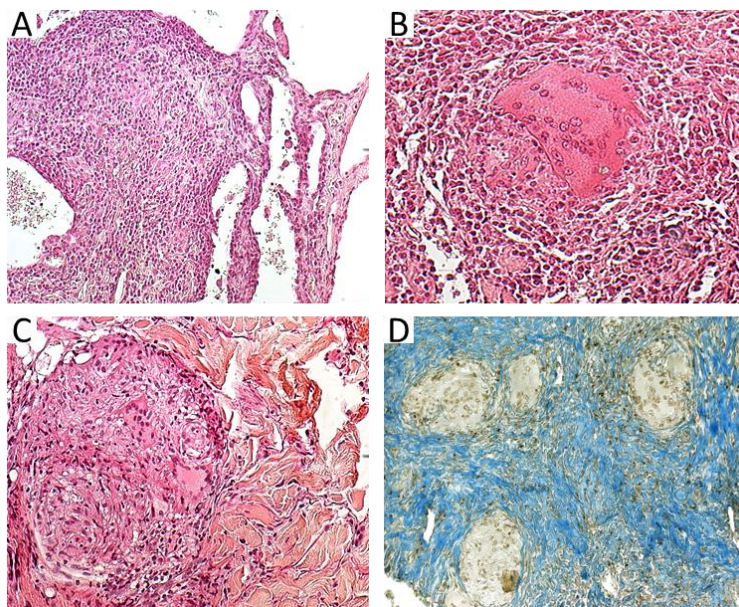


Figure S1. Stages of granuloma evolution. Haematoxylin eosin staining illustrates the nascent (A), florid (B) and naked stages (C). Aniline blue staining illustrates the fibrotic stage (D). Magnification x 200

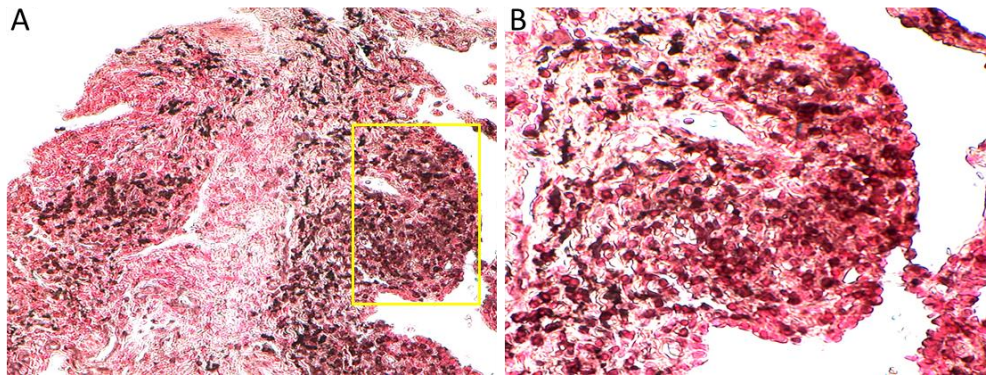


Figure S2. Immunohistochemical analysis of IFNG1 in sarcoid granulomas from lung biopsy. IFNG1 detected in granuloma cells, Magnification x 200 (A). IFNG1 expressed in the cytoplasm, Magnification x 400 (B).

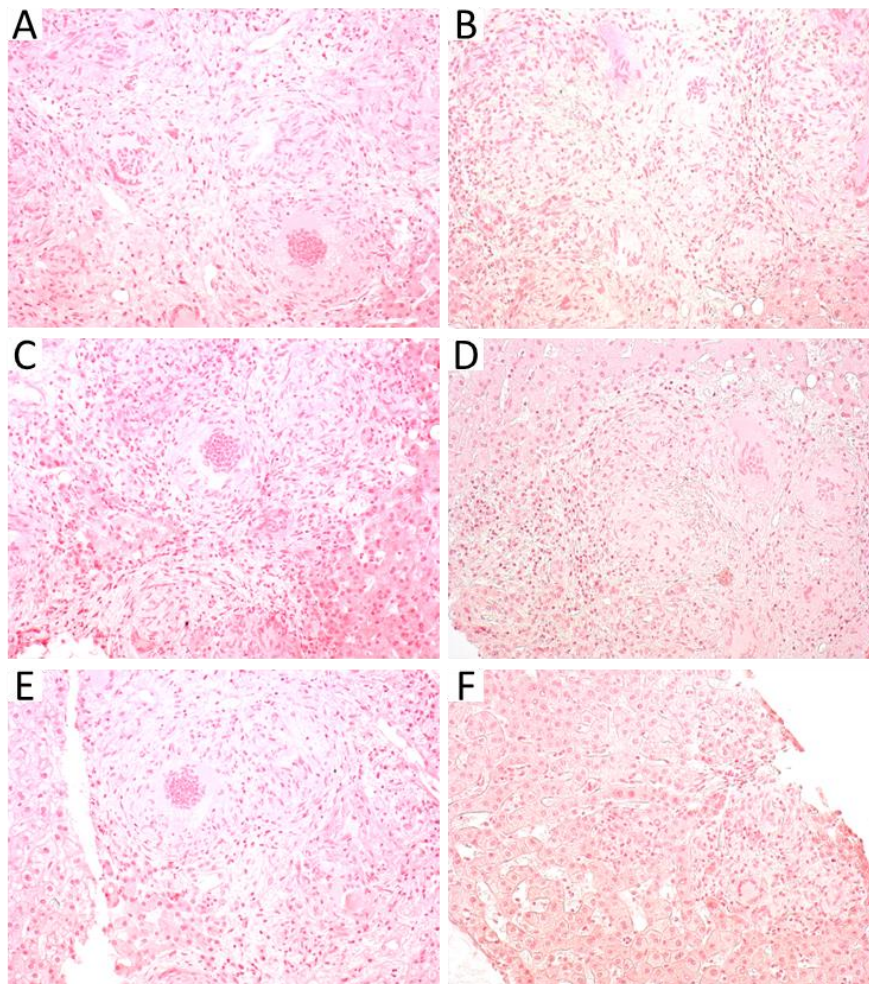


Figure S3. Immunohistochemical analysis of STAT1, STAT3 and STAT5 and their active forms in hepatic sarcoidosis granulomas. STAT1 (A), pSTAT1 (B), STAT3 (C), pSTAT3 (D), STAT5 (E) and pSTAT5 (F) were not detected. Magnification x 200

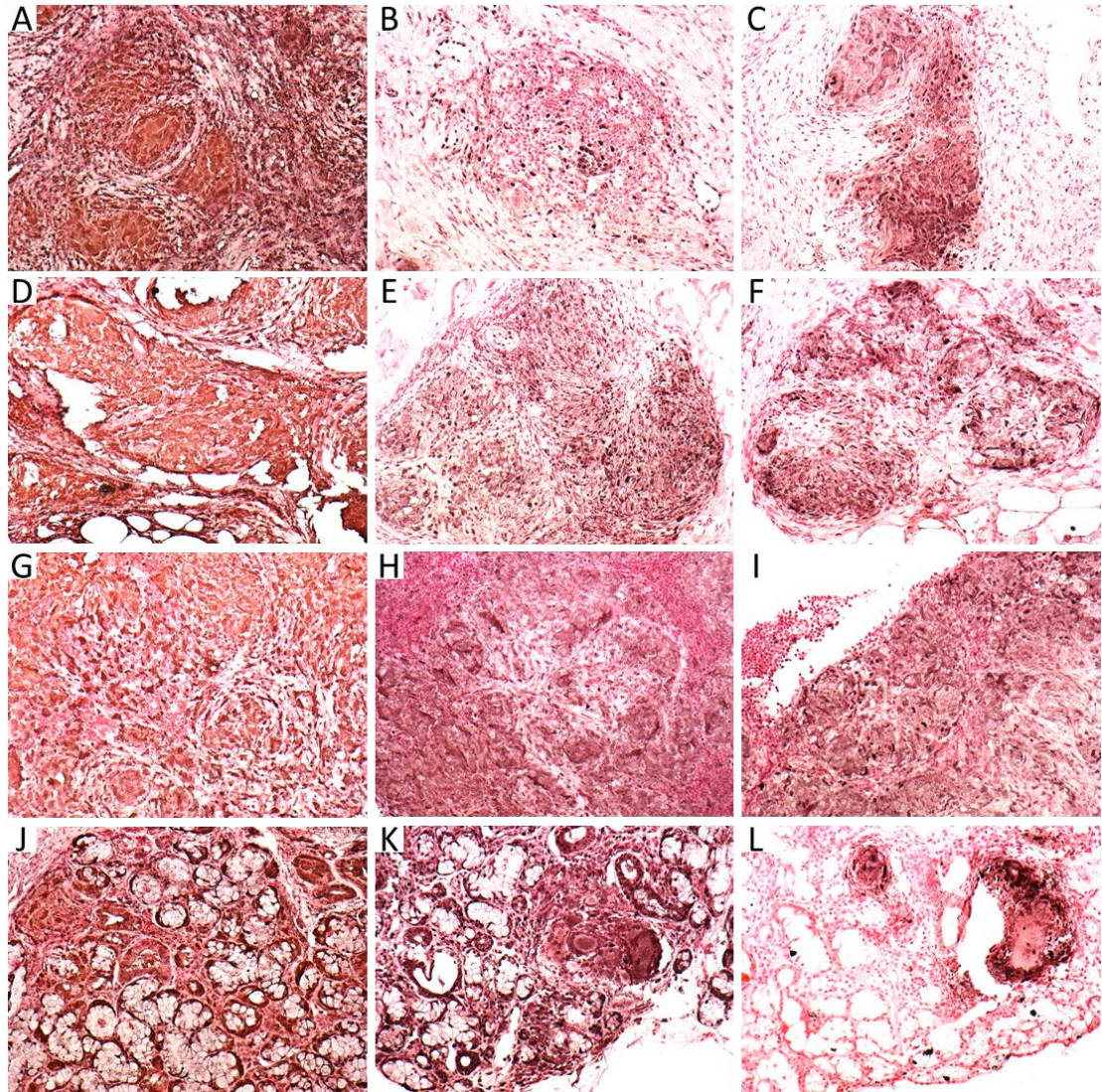


Figure S4. Immunohistochemical analysis of STAT1, STAT3 and STAT5 in sarcoid granulomas from different biopsies. STAT1 (A-J), STAT3 (B-K) and STAT5 (C-L) were detected in lung (A-C) skin (D-F) lymph nodes (G-I) and salivary glands (J-L). Magnification x 200

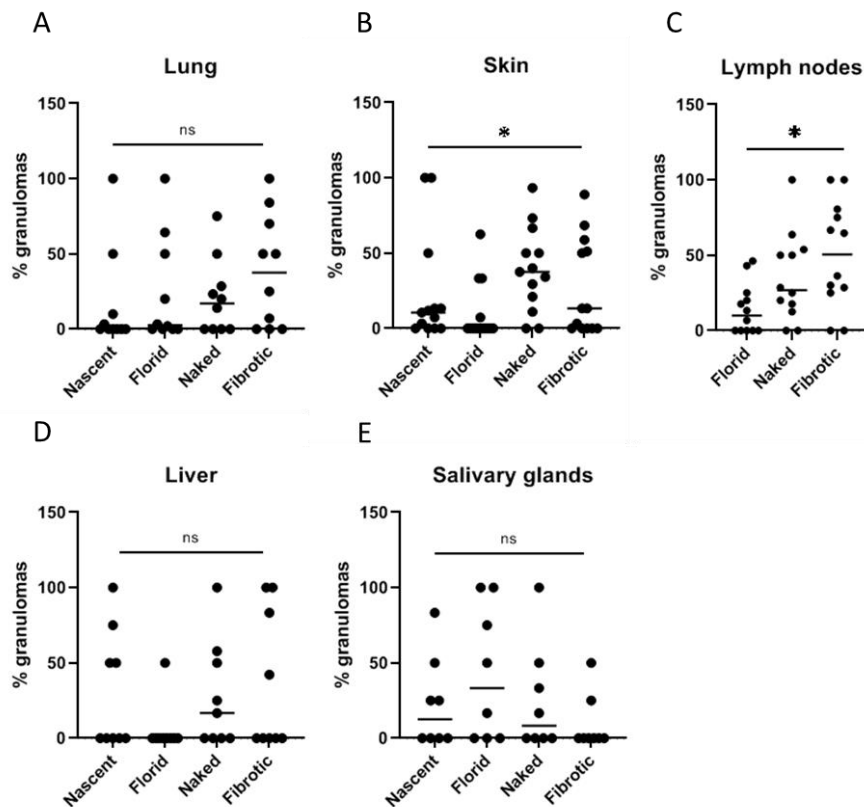


Figure S5. Distribution of granuloma stages in different organs. No significant difference in the distribution of nascent, florid, naked, fibrous stages in lung (A), liver (D) and salivary gland biopsies (E). A significant difference in skin (B) and lymph node biopsies (C). Friedman's test was used to analyze data, N = 8-13 patients. The stars represent significance levels, with * indicating $p < 0.05$.

2 Complément d'article

2.1 Caractérisation des cellules constituant le granulome

A l'aide de l'Hyperion, nous avons caractérisé l'environnement tissulaire du granulome, ainsi que sa composition cellulaire. Notre objectif initial était de comparer les proportions cellulaires et leur répartition dans le granulome en fonction de l'organe affecté. Par la suite, notre attention s'est portée sur une analyse précise de la localisation cellulaire des divers membres de la voie JAK/STAT identifiés au sein du granulome.

Nous avons examiné l'environnement tissulaire entourant le granulome en utilisant quatre marqueurs : le collagène I pour la matrice extracellulaire, l' α SMA pour les vaisseaux sanguins,

l'E-cadhérine et la pan-cytokératine pour les cellules épithéliales. Nos observations ont révélé que le collagène de type I se localise autour du granulome, formant ainsi une sorte de gaine ou délimitation pour le granulome. Cependant, dans une seconde biopsie bronchique, il était présent à l'intérieur du granulome. En ce qui concerne les vaisseaux sanguins, leur présence a été observée à la fois dans le granulome et autour de celui-ci dans les deux biopsies bronchiques, tandis qu'ils étaient exclusivement localisés autour du granulome dans les biopsies de glande salivaire et cutanée. Dans les quatre biopsies, les granulomes ont été observés en proximité des cellules épithéliales. De plus, les cellules géantes des granulomes ont exprimé la E-cadhérine.

De façon générale, nous avons observé que les cellules CD68+ (macrophages, cellules épithélioïdes et cellules géantes) étaient principalement localisées dans le follicule central du granulome dans les quatre biopsies analysées. En revanche, les cellules CD3+ (lymphocytes) étaient majoritairement présentes dans la couronne lymphocytaire des granulomes dans une biopsie bronchique et une biopsie de glande salivaire. Cependant, leur présence était moins marquée dans la couronne lymphocytaire dans une autre biopsie bronchique et d'une biopsie cutanée. Concernant les sous-populations lymphocytaires, les LTCD4+ étaient fortement présents et de manière quasi-égale dans les deux compartiments du granulome dans les quatre biopsies. Alors que, les LTCD8+ étaient moins abondants dans les deux compartiments du granulome, excepté dans la biopsie cutanée où ils se retrouvent uniquement dans la couronne lymphocytaire. Il est intéressant de noter que la répartition des des LTregs, LTh17 et LB était variable dans le granulome de chaque biopsie. En effet, les LTreg étaient présents dans les deux compartiments dans les granulomes des biopsies bronchiques, tandis que dans la biopsie de glande salivaire, ils étaient uniquement localisés dans la couronne lymphocytaire. Leur présence était très faible dans la biopsie cutanée. Les LTh17 étaient présents très faiblement et exclusivement dans la couronne lymphocytaire du granulome de la biopsie bronchique, glande salivaire et cutanée. Dans une autre biopsie bronchique, leur présence était très faible et limitée au follicule central. Les LB étaient modérément présents dans la couronne lymphocytaire et faiblement présents dans le follicule central du granulome dans une biopsie bronchique et une biopsie de glande salivaire. Dans une autre biopsie bronchique, leur présence était faible et limitée à la couronne lymphocytaire, tandis qu'ils étaient absents dans la biopsie cutanée.

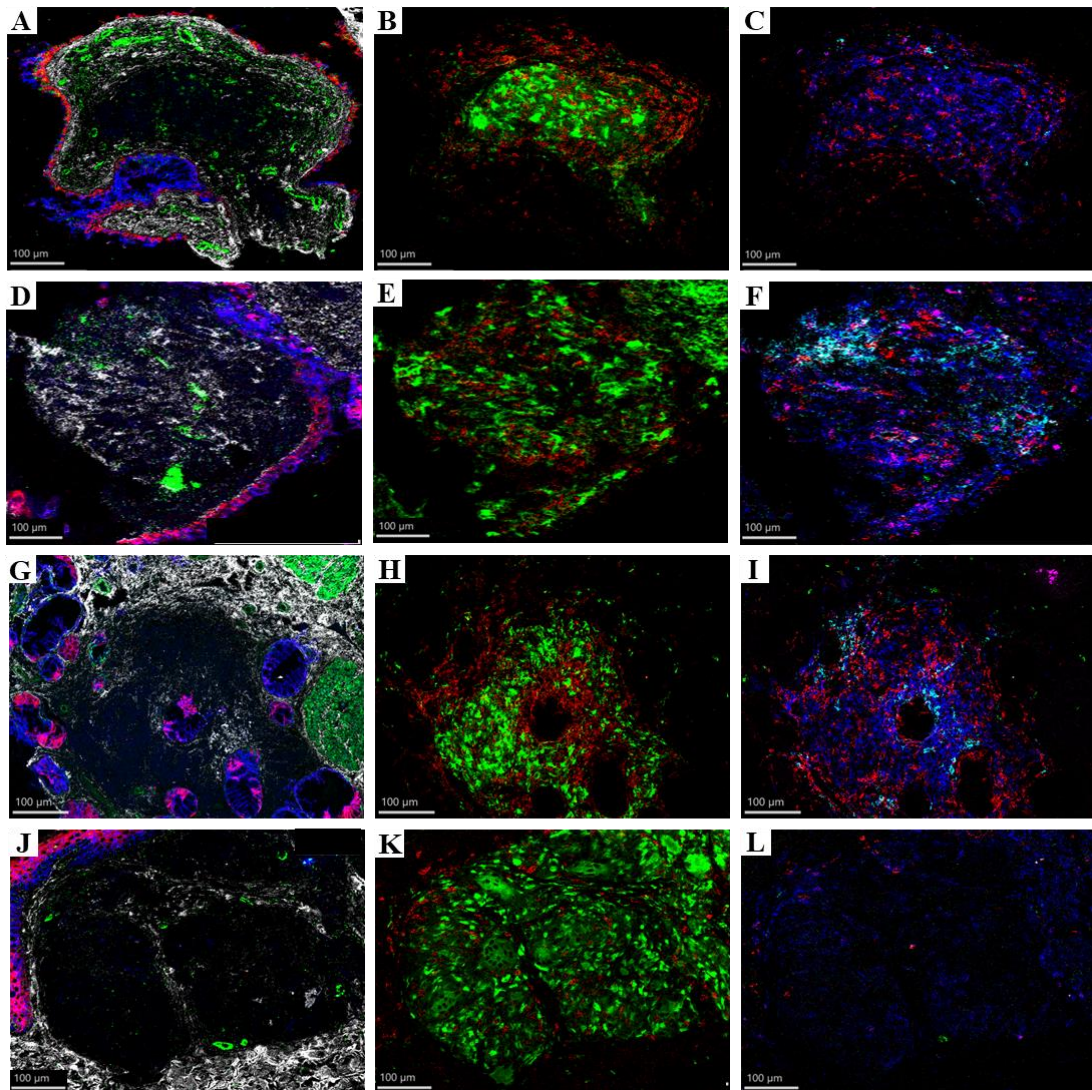


Figure 20 : Caractérisation de l'environnement tissulaire et la composition cellulaire du granulome sarcôïdien par *Hyperion*.

Dans les biopsies bronchiques (A-F), glande salivaire (G-I) et cutanée (J-L) : L'environnement tissulaire caractérisé par le collagène I (blanc), α -SMA (vert), E-cadhérine (bleu), pan-cytokératine (rouge) (A-J). Les granulomes sont composés des cellules de la lignée myéloïdes CD68+ (vert), et de lymphocytes CD3+ (rouge) (B-K). Les granulomes sont composés de plusieurs sous-populations lymphocytaires : les Tregs (Foxp3) en magenta, les Th17 (IL-17) en vert, les LTCD4+ (CD4) en bleu, les LTCD8+ (CD8a) en rouge, les LB (CD20) en cyan (C-L).

Tableau 6 : Résumé de la répartition des populations cellulaires au sein du granulome

Cellules du granulome	Biopsie bronchique 1			Biopsie bronchique 2			Biopsie glande salivaire			Biopsie cutanée		
	Follicule central	Couronne lymphocytaire	Périphérie	Follicule central	Couronne lymphocytaire	Périphérie	Follicule central	Couronne lymphocytaire	Périphérie	Follicule central	Couronne lymphocytaire	Périphérie
CD68+	+++	+	+	+++	-	+	+++	+	+	+++	-	+
LTCD3+	+	+++	+	+	+	+	+	+++	+	+	+	+
LTCD4+	+++	++	+	++	+++	+	+++	++	+	++	++	+
LTCD8+	++	++	+	+	++	+	++	++	+	-	+	-
LTreg	++	+	+/-	+	++	+	-	+	+	+/-	+/-	+/-
LTh17	+/-	-	-	-	+/-	-	-	+/-	+	-	+/-	+/-
LB	-	+	-	+	++	-	+	++	+	-	-	-

Les notations +++, ++, +, +/- et - correspondent respectivement à une abondance élevée, modérée, faible, très faible et absente d'une population cellulaire. Les cellules myéloïdes CD68+ ont été comparées aux LTCD3+ ; tandis que les autres sous-populations lymphocytaires ont été comparées entre elles.

2.2 La voie JAK/STAT dans les biopsies rénales

Nous avons examiné l'activation des membres de la voie JAK/STAT dans le rein, en raison de la présentation spécifique de la sarcoïdose dans cet organe. En effet, le rein est connu pour présenter principalement des zones d'inflammation avec ou sans fibrose, et peu de granulomes (Hug et al., 1987). Parmi les 9 biopsies rénales analysées, seules deux ont montré la présence de granulomes. De façon intéressante, nous avons observé une activation de JAK2 exclusivement dans les noyaux des lymphocytes présents dans les zones d'inflammation. En ce qui concerne les STATs, seuls pSTAT1 et pSTAT5 ont été détectés dans les fibroblastes et les cellules inflammatoires des zones de fibrose ainsi que dans les granulomes. Contrairement aux autres organes étudiés, nous n'avons pas observé d'expression de pSTAT3 dans les granulomes et zones d'inflammation du rein.

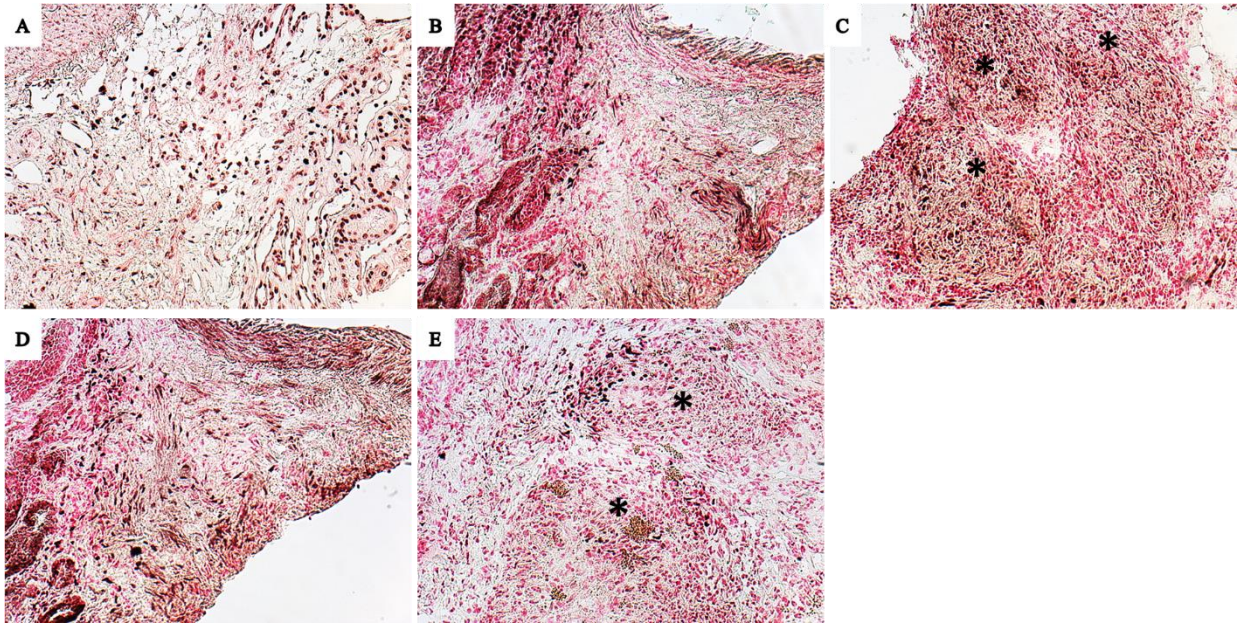


Figure 21 : Expression de pJAK2, pSTAT1 et pSTAT5 dans les granulomes des biopsies rénales.

pJAK2 nucléaire dans les lymphocytes d'une zone d'inflammation (A). pSTAT1 et pSTAT5 détectés dans les fibroblastes et les cellules inflammatoire d'une zone de fibrose (B,D) et dans les granulomes indiqués par (*) (C,E). Grossissement 200x

2.3 Scores d'expression de la voie JAK/STAT

Une méthode supplémentaire pour évaluer l'expression des protéines détectées (pJAK2, pSTAT1, pSTAT3 et pSTAT5) dans les cinq biopsies analysées était la détermination des scores d'expression. Le niveau d'expression offrait une estimation du nombre de granulomes marqués dans chaque biopsie, tandis que le score d'expression permettait d'estimer le nombre de cellules marquées dans chaque granulome. Initialement, nous avons observé que les pourcentages des scores d'expression (1, 2 et 3) étaient les plus élevés pour pJAK2 par rapport aux STATs. En général, il n'y avait pas de variations notables dans les pourcentages des scores d'expressions entre les cinq organes étudiés. Pour les STATs, à l'exception du foie, les scores d'expression 1 et 2 ont été détectés pour pSTAT1 dans tous les organes, tandis que seuls le score 1 a été observé pour pSTAT3 et pSTAT5. Dans chaque organe, les pourcentages d'expression des STATs pour le score 1 étaient similaires, à l'exception de pSTAT3 qui présentaient un pourcentage d'expression plus élevé. Ces observations confirment nos résultats antérieurs sur les niveaux d'expression, mettant en évidence une présence plus importante de pSTAT3 dans les granulomes des biopsies cutanées.

Tableau 7 : Scores d'expression exprimé en pourcentage de pJAK2, pSTAT1, pSTAT3 et pSTAT5 dans les granulomes des biopsies analysées

	pJAK2				pSTAT1				pSTAT3				pSTAT5			
	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
Poumon	7	47	40	6	58	31	11	0	69	31	0	0	65	34	1	0
Ganglion	39	38	21	0	58	21	16	3	78	20	0	0	82	17	0	0
Peau	17	47	35	0	68	27	5	0	53	47	0	0	74	25	1	0
Glande salivaire	9	31	34	25	45	43	13	0	57	43	0	0	45	55	0	0
Foie	7	67	22	4	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0

2.4 La voie JAK/STAT dans les biopsies multiorganes

Dans cette analyse, nous avons examiné deux questions : tout d'abord, si les biopsies prélevées simultanément chez les mêmes patients expriment les mêmes membres de la voie JAK/STAT ; deuxièmement, si les patients ayant subi des biopsies à des moments différents présentent des niveaux d'expression plus importants des membres détectés, ce qui pourrait indiquer leur implication dans la persistance de la maladie. Au total 18 biopsies ont été analysées, avec deux biopsies prélevées pour chaque patient. Six patients ont eu des biopsies prélevées simultanément, tandis que trois autres ont subi des prélèvements à des moments différents, avec un intervalle de 2 à 6 ans entre les deux. De façon intéressante, un seul patient a exprimé la même « signature » JAK/STAT dans les granulomes de ses biopsies (Figure 22). Cela met en évidence la diversité des granulomes chez un même patient, soulignant probablement l'influence du microenvironnement tissulaire sur les signatures exprimées. Nous avons constaté que parmi les trois patients ayant subi des biopsies à des moments différents, un patient (P5) a montré une diminution du niveau d'expression de pJAK2 et une absence d'expression de pSTAT1,3 et 5 lors de sa seconde biopsie prélevé 3 ans plus tard. En revanche, les deux autres patients (P8 et P9) ont présenté une quasi-absence d'expression des quatre protéines lors de la première biopsie, suivie d'un niveau d'expression élevé lors de la seconde biopsie (Tableau 8). En raison de la taille limitée de la cohorte, les conclusions ne peuvent pas être tirées. Néanmoins, l'augmentation des niveaux d'expression des quatre protéines activées lors de la seconde biopsie pourrait avoir un lien avec la rechute de la maladie.

Tableau 8 : Niveaux d'expression de pJAK2, pSTAT1, pSTAT3 et pSTAT5 dans deux organes (biopsies) provenant des mêmes patients

	Organe 1									Organe 2								
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
pJAK2	100	100	100	100	66,66	50	100	0	0	20	100	0	0	47,36	100	0	100	100
pSTAT1	100	100	0	0	66,66	0	0	0	17,64	0	0	0	0	0	0	75	100	100
pSTAT3	10	100	0	0	0	25	100	0	0	0	0	0	0	0	100	75	100	83,33
pSTAT5	55,55	100	0	0	33,33	16,66	0	0	0	0	50	0	0	0	100	100	0	83,33

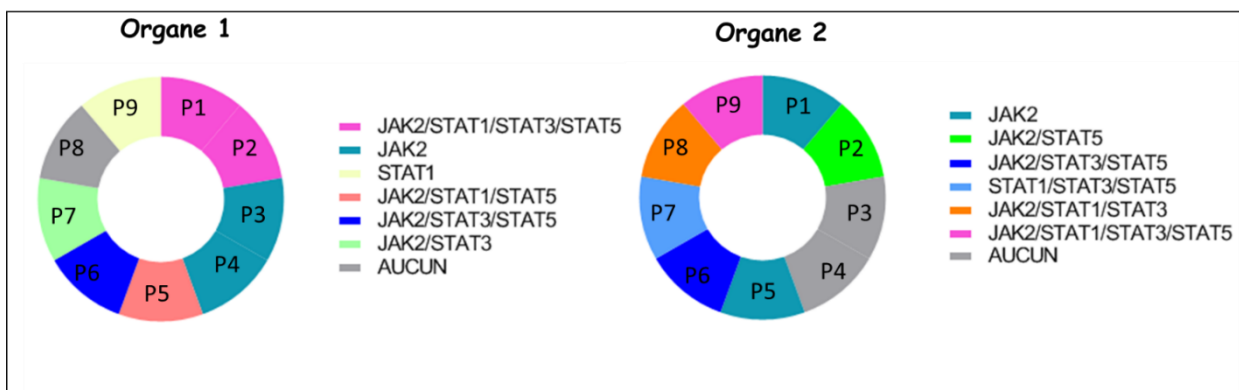


Figure 22 : Variabilité des signatures selon les organes touchés chez les mêmes patients.

2.5 La voie JAK/STAT dans les lymphocytes circulants

Dans le but de déterminer l'origine du profil d'expression JAK/STAT particulier détecté dans le granulome de sarcoïdose (pJAK2 nucléaire dans les lymphocytes, sans détection des pSTATs), nous avons analysé l'expression de pJAK2 et pSTAT1 dans les lymphocytes circulants des patients atteints de sarcoïdose et des sujets sains en western blot et en immunocytochimie. Nous avons observé que pJAK2 était exclusivement détecté dans les extraits cytoplasmiques et la membrane des lymphocytes de patients et sujets sains, tant avant qu'après stimulation par l'IFN- γ . Ainsi, dans la sarcoïdose, l'expression non canonique de P-JAK2 semble être restreinte aux lymphocytes du granulome. De plus, nos résultats révèlent l'existence de deux groupes de patients : le premier présente un niveau d'expression de pJAK2

constant avant et après stimulation, caractérisé par une sarcoïdose multiviscérale ou une atteinte pulmonaire sévère. Le second groupe montre un profil d'expression de pJAK2 similaire à celui des sujets sains, avant et après stimulation, caractérisé par une atteinte pulmonaire moins sévère. Les mêmes observations ont été faites pour pSTAT1. Dans la sarcoïdose, les lymphocytes circulants présentent une activation de la voie canonique JAK2/STAT1, et cela semble être associé à la sévérité de la maladie.

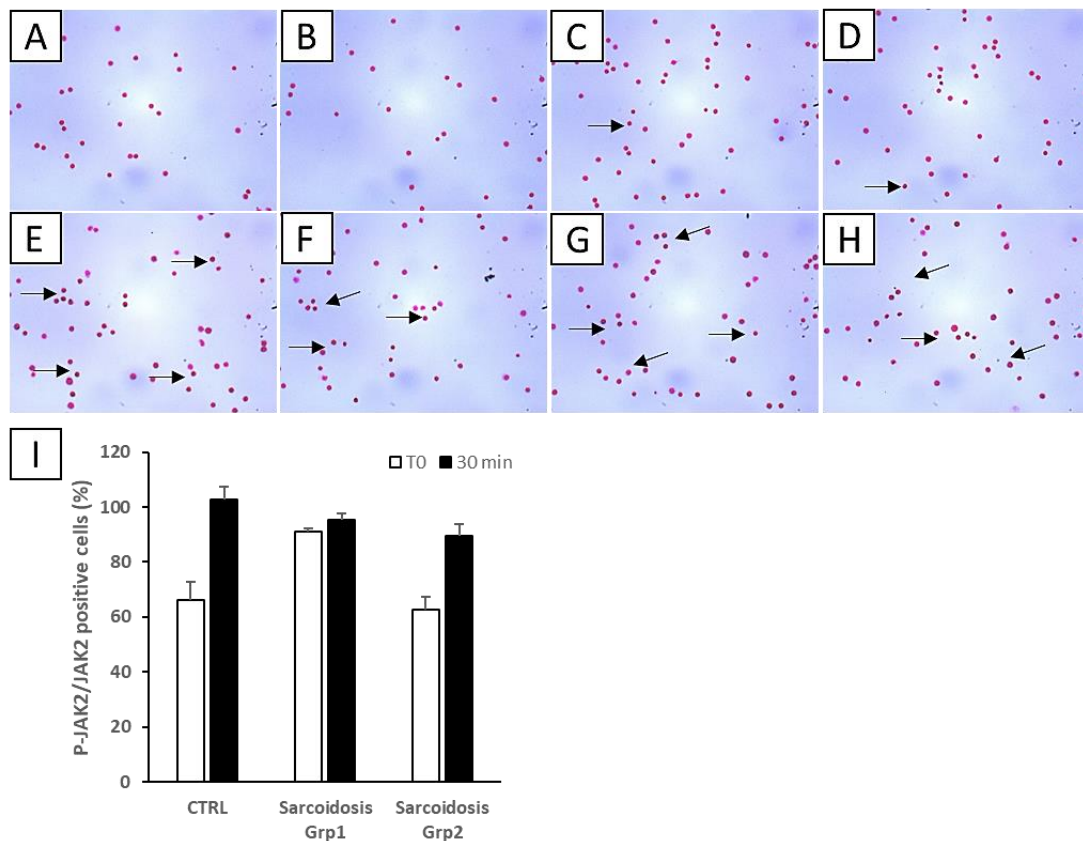


Figure 23 : Activation de JAK2 dans les lymphocytes circulants des patients atteints de sarcoïdose.

La présence de pJAK2 a été évaluée sur des préparations de cytopspin de cellules CD3+ isolées provenant de sujets témoins (A, B, C, D) et de patients atteints de sarcoïdose (E, F, G, H) après un traitement par IFN- γ pendant 0 min (A, E), 5 min (B, F), 10 min (C, G) et 30 min (D, H). Les flèches indiquent les cellules positives, Grossissement 200x. Le pourcentage de cellules pJAK2 positives sur la préparation de cytopspin a été quantifié après stimulation par l'IFN γ pendant 0 min et 30 min (I). Donnée représentée en moyennes et écart-types. N=3 pour Ctrl, N=3 pour sarcoidosis Grp1 et N=4 pour sarcoidosis Grp2

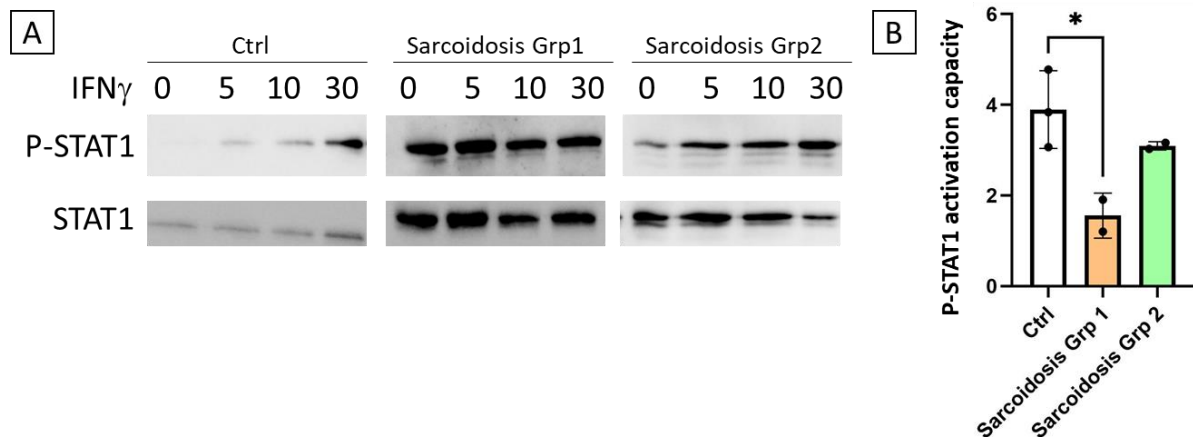


Figure 24 : Activation de STAT1 dans les lymphocytes circulants des patients atteints de sarcoïdose.

La présence de pSTAT1 a été évaluée sur des extraits protéiques de cellules CD3+ isolées provenant de sujets témoins de patients ayant des atteintes sévères (sarcoïdose Grp1) et moins sévères (sarcoïdose Grp2) après stimulation par l'IFN- γ pendant 0, 5, 10 et 30 min (A). La capacité d'activation de STAT1 pourcentage a été quantifié à partir des résultats du western blot (B). Donnée représentée en moyennes et écart-types. * : p-value<0.05 (test t de Welch). N=3 pour Ctrl, N=2 pour sarcoidosis Grp1 et N=2 pour sarcoidosis Grp2

1 Comparaison entre la composition du granulome caractérisée VS celle décrite dans la littérature

De façon générale, nous avons observé que les cellules CD68+ (macrophages, cellules épithélioïdes et cellules géantes) étaient principalement localisées dans le centre (follicule central) du granulome dans les quatre tissus analysés. Les macrophages et les cellules épithélioïdes, semblent les cellules les plus nombreuses dans le follicule central. En revanche, les cellules CD3+ (lymphocytes) étaient majoritairement présentes autour dans la coiffe (couronne lymphocytaire) des granulomes dans une biopsie bronchique et une biopsie de glande salivaire. Cependant, leur présence était moins marquée dans la couronne lymphocytaire dans une autre biopsie bronchique et d'une biopsie cutanée. Ces observations suggèrent que la distribution et les proportions des lymphocytes peuvent varier en fonction du stade d'évolution du granulome (naissant, floride, « naked » et fibreux), qui est probablement influencé par l'environnement cytokinique sécrété par le tissu où se développe le granulome. Cette hypothèse est appuyée par l'observation majoritaire des granulomes « naked » dans les biopsies cutanées (Ball et al., 2004; Cardoso et al., 2009; Mangas et al., 2006), suggérant que le développement d'un granulome peut ne pas toujours suivre les quatre stades d'évolution observés. Ceci dépendrait en grande partie de l'environnement cytokinique, notamment du type de chimiokines, qui influencerait le recrutement des lymphocytes.

Des études antérieures ont indiqué que les cellules épithélioïdes étaient l'élément prédominant des granulomes de sarcoïdose. De nombreux auteurs ont qualifié le granulome de sarcoïdose de « granulome épithélioïde », ce qui signifie qu'ils reconnaissent le fait que les cellules épithélioïdes représentent l'élément cellulaire principal et le plus abondant dans ces granulomes (Cardoso et al., 2009; Carrington, 1976; Danel et al., 1983; Soler and Basset, 1976). Une seule étude a remis en question ces conclusions en utilisant une analyse stéréométrique pour évaluer la composition cellulaire de 102 granulomes provenant de 34 biopsies pulmonaires transbronchiques. Cette étude a montré que, bien que les cellules épithélioïdes, les macrophages et les cellules géantes étaient exclusivement localisés dans la région centrale des granulomes, les lymphocytes étaient présents à la fois dans cette région centrale et dans la périphérie des granulomes (couronne lymphocytaire). Malgré cette présence, les lymphocytes étaient en

réalité plus nombreux que les cellules épithélioïdes, contrairement à ce que suggéraient les études précédentes qui utilisaient des méthodes semi-quantitatives. Ainsi, cette étude propose de reconsidérer l'appellation « granulome épithélioïde » au profit de « granulome lymphocytaire-épithélioïde » (Kosjerina et al., 2012).

2 Détection de pJAK2 nucléaire dans les lymphocytes du granulome et cellules environnantes

De façon intéressante, nous avons détecté une voie non canonique avec la présence de la forme activée pJAK2 au niveau nucléaire dans les cellules du granulome, alors que pJAK2 était cytoplasmique dans les cellules des ganglions lymphatiques de sujets sains. Le pourcentage de patients pJAK2 nucléaires positifs était de 92,30%, alors que le pourcentage d'expression de pJAK2 (le nombre de granulomes positifs par rapport au nombre de granulomes totaux) était de 73.23%. La présence quasi-systématique de pJAK2 dans notre cohorte d'étude, suggère une implication continue tout au long du développement de la sarcoïdose. pJAK2 est principalement détecté dans les lymphocytes, plus précisément dans les LTCD4+, LTCD8+, LTh17, ainsi que dans certains LB, mais jamais dans les Treg. La différence d'expression entre les Treg et les autres sous-populations lymphocytaires est probablement due au phénotype dérégulé des Treg dans la sarcoïdose. En effet, il a été montré que les Treg présentent une survie altérée et une susceptibilité accrue à l'apoptose induite par CD95L, alors que pJAK2 nucléaire est associée à un renouvellement cellulaire élevé (Broos et al., 2015b; Zouein et al., 2011). pJAK2 a été observée non seulement au sein du granulome, mais aussi dans les cellules environnantes (les cellules épithéliales, endothéliales et fibroblastes). JAK2 comme les autres kinases JAKs, résident principalement dans le cytoplasme. Cependant, des études ont révélé sa localisation nucléaire dans différents types cellulaires. Les premières études ont rapporté la localisation nucléaire de JAK2 dans les îlots pancréatiques, les hépatocytes de rat, les cellules COS-7 (fibroblastes rénaux de singe), les ovocytes et embryons de souris (Ito et al., 2004; Lee and Duhé, 2006; Ram and Waxman, 1997; Sorenson and Stout, 1995). Une étude a rapporté une localisation nucléocytoplasmique de JAK2 dans les cellules CHO et les hépatocytes de rat (Lobie et al., 1996). De plus, La présence de JAK2 nucléaire a été mise en évidence dans diverses pathologies (Rinaldi et al., 2010; Wang et al., 2022). Cette kinase a été détectée dans les cellules hématopoïétiques des patients atteints de néoplasie myéloproliférative présentant la mutation JAK2 V617F (Rinaldi et al., 2010). Nos observations concordent avec celles

rapportées dans une étude sur la FPI et la PR : pJAK2 a été identifiée dans les noyaux des cellules épithéliales, endothéliales et fibroblastes dans les biopsies pulmonaires, ainsi que dans les lymphocytes des ganglions lymphatiques (Wang et al., 2022). Ces observations illustrent la mise en place, par le granulome, d'un environnement cytokinique potentiellement influencé par divers stress, tels que l'hypoxie, qui affectent les cellules environnantes. Il a été démontré que l'hypoxie fait partie du microenvironnement du granulome (centre hypoxique) (Kambouchner et al., 2011). En réponse à l'hypoxie, des macrophages dérivés de monocytes sanguins de patients atteints de sarcoïdose pulmonaire se caractérisent par une réponse pro-inflammatoire, pro-fibrosante, et une phagocytose plus importante que ceux des témoins (Jeny et al., 2021).

La détection de pJAK2 dans les noyaux, sans la détection de JAK2 total, et l'absence de détection de STAT activé dans ces mêmes cellules suggère que JAK2 inactif subit une translocation nucléaire, induisant un changement de conformation qui masque l'épitope reconnu par l'anticorps ; une fois dans le noyau, JAK2 est activé. La translocation nucléaire de JAK2 reste encore mal comprise, mais plusieurs mécanismes sont proposés. Outre la séquence NLS probablement nécessaire en raison de sa taille importante, les interactions avec des protéines telles que SOCS1 et Hsp70/Hsc70 pourraient également jouer un rôle dans sa localisation nucléaire (Kodiha et al., 2005; Ragimbeau et al., 2001; Sakamoto et al., 2000; Sarkar et al., 2001). Dans la sarcoïdose, Des anticorps anti-Hsp70 ont été rapportés (de Smet and Ramadan, 2001; Hrycaj et al., 1995). De plus, l'allèle HSP70 +2437 C a été associé à la sarcoïdose et au syndrome de Löfgren (Bogunia-Kubik et al., 2006). La liaison aux récepteurs de surface cellulaire et des facteurs environnementaux tels que l'anoxie pourraient également contribuer à la translocation nucléaire de JAK2 (Dudley et al., 2005; Johnson et al., 2013).

Dans le granulome les cellules pJAK2 positives sont caractérisées par une activité transcriptionnelle élevée (H3K4me positives). D'autres études ont détecté pJAK2 nucléaire dans les cellules hématopoïétiques et sa présence nucléaire a été associée à un renouvellement cellulaire élevé (Zouein et al., 2011). De plus, il a été montré que JAK2 joue un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire en phosphorylant l'inhibiteur de la kinase cycline-dépendante p27^{Kip1}, altérant sa capacité à inhiber les kinases cycline-dépendantes et initiant une cascade d'événements aboutissant à sa dégradation protéasomique (Jäkel et al., 2011). Plusieurs études ont révélé l'implication des JAKs nucléaires dans la régulation épigénétique. Il a été constaté que JAK2 nucléaire phosphorylait l'histone H3 sur Y41 dans les cellules hématopoïétiques. La phosphorylation de H3Y41 empêche la liaison de la protéine d'hétérochromatine 1 α (HP1 α), qui fonctionne dans la répression des gènes hétérochromatiques (Dawson et al., 2009). D'autre

part, JAK2 mutée dans les néoplasmes myéloprolifératifs modifient la structure de la chromatine en inhibant PRMT5, une arginine méthyltransférase. Cela réduit la méthylation de l'histone H2A/H4 R3 (Liu et al., 2011). D'autres études ont également montré que pJAK2 nucléaire affecte l'expression des gènes en activant les facteurs de transcription (Helmer et al., 2010; Nilsson et al., 2006). L'étude de Nilsson et al. a montré que la prolactine induit l'activation de JAK2 dans les noyaux des cellules épithéliales mammaires, conduisant à la phosphorylation du facteur de transcription NF1-C2 (Nilsson et al., 2006).

3 Détection de la voie canonique JAK/STAT dans les cellules CD68+ dans le granulome

Concernant les facteurs de transcription STAT, seulement pSTAT1, pSTAT3 et pSTAT5 ont été détectés dans le granulome sarcoïdien. Au moins un des STAT est activé dans les granulomes d'une biopsie, ce qui illustre le rôle essentiel des facteurs STAT dans la sarcoïdose. 50,98% des patients étaient positifs pour pSTAT1 avec 38,43% de granulomes marqués, 46% de patients positifs pour pSTAT3 avec 24,12% de granulomes marqués et 48% de patients étaient positifs pour pSTAT5 avec 21,34% de granulomes marqués. Une étude récente avait montré des observations assez similaires : parmi 60 biopsies comprenant le poumon, la peau, les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse et le cornet nasal, 50% étaient positives pour pSTAT1 et pSTAT3 (Kraaijvanger et al., 2023). Nous avons détecté l'activation de pSTAT1 et pSTAT5 principalement dans les cellules de la lignée myéloïde, alors que pSTAT3 selon les granulomes a été détecté dans les cellules de la lignée myéloïde et ou au niveau des lymphocytes périphériques. De façon intéressante l'activation de pSTAT5 dans le granulome n'a jamais été montré auparavant, alors que pSTAT1 et pSTAT3 ont été détecté par d'autres études. Damsky et al., ont montré que toutes les biopsies analysées (21 biopsies cutanées) étaient positives pour pSTAT1 et pSTAT3. pSTAT1 était retrouvé au centre du granulome, principalement dans les macrophages alors que pSTAT3 était davantage retrouvé dans les lymphocytes en périphérie du granulome (Damsky et al., 2018). Ceci a été confirmé par une autre étude récente sur différents organes biopsiés atteints de sarcoïdose (Kraaijvanger et al., 2023). L'activation de pSTAT1, pSTAT3, pSTAT5 est probablement le résultat de la voie canonique médié par JAK2 détectée dans les macrophages. La non-détection de pJAK2 au niveau du cytoplasme/membrane est probablement due au fait que le processus de prélèvement et de fixation des biopsies (activité hospitalière de routine relativement longue, non adaptée à la cinétique de

phosphorylation des kinases) a potentiellement affecté certaines caractéristiques moléculaires de l'échantillon, y compris l'état d'activation de JAK2. En ce qui concerne le rôle potentiel des STATs détectés dans les macrophages du granulome, il est connu que STAT1 et STAT5 sont impliqués dans la polarisation M1, tandis que STAT3 est associé à la polarisation M2 ainsi qu'à la différenciation Th2 et Th17 (Benveniste et al., 2014; Li et al., 2023). Il est probable que ces facteurs de transcription contribuent à médier l'équilibre entre les phénotypes M1/Th1 et M2/Th2 dans le granulome sarcoïdien.

4 Association entre pJAK2, les STATs et la sévérité de la sarcoïdose

La variabilité de l'expression de pJAK2, pSTAT1, pSTAT3 et pSTAT5 dans notre cohorte d'étude, nous a poussé à se demander si elle était liée à la sévérité de la maladie. Nous avons constaté que les patients ayant des biopsies pulmonaires et cutanées avaient les paramètres et des scores de sévérité les plus élevés : un stade radiologique et un score de Benamore plus élevés pour les biopsies pulmonaires et un COS et ePOST plus élevés pour les biopsies cutanées. Ces mêmes patients présentaient les pourcentages d'expression les plus élevés de pJAK2, pSTAT1, pSTAT3 et pSTAT5 avec une expression plus élevée de pSTAT3 chez les patients ayant des biopsies cutanées. A l'inverse, Kraaijvanger et al. ont montré que des scores immunohistochimique élevés de pSTAT1 et pSTAT3 n'ont aucun lien avec le COS et le score de Scadding et donc avec la sévérité de la maladie (Kraaijvanger et al., 2023). Ceci peut être expliqué par le fait que nous avons utilisé une approche statistique multivariées différente prenant en compte la variabilité d'organes.

Parmi toutes les signatures retrouvées dans les organes analysés, deux signatures prédominantes ont été identifiées et associées à un profil plutôt sévère : pJAK2/pSTAT1-pSTAT5 dans les biopsies pulmonaires et pJAK2/pSTAT3-pSTAT5 dans les biopsies cutanées. Ce résultat suggère que les mécanismes moléculaires activés lors de la formation du granulome sarcoïdien sont impactés par l'organe atteint. Par exemple, les fibroblastes sont des cellules abondantes dans la peau, elles ont la capacité de sécréter plusieurs cytokines telles que l'IL-6, IL-11, CNTF, OSM, IL-27, IL-22 activant STAT3 de façon autocrine (West, 2019). Ces mêmes cytokines ont été retrouvés dans les lésions de la sarcoïdose (Boleto et al., 2020; Ringkowski et al., 2014), ce qui suggère que les fibroblastes pourraient favoriser l'activation de STAT3 dans les granulomes cutanés. Il a été montré que l'activation de STAT3 dans les fibroblastes est

souvent associée à des maladies inflammatoires caractérisées par une fibrose tissulaire excessive tels que la sclérodermie systémique ou la FPI (Chakraborty et al., 2017; Milara et al., 2018). La variabilité des signatures selon l'organe atteint résultant de deux environnements cytokiniques différents pourrait également expliquer la réponse variable au tofacitinib observée chez une patiente ayant une rémission clinique et histologique de l'atteinte cutanée et aucune amélioration de son atteinte pulmonaire (Damsky et al., 2018). Il a été montré que l'effet du tofacitinib peut être influencé par la spécificité des récepteurs de cytokines, les types cellulaires présents, les cytokines activatrices et le contexte pathologique (Palmroth et al., 2021).

Nous avons abordé l'évolution de la sarcoïdose d'une autre manière en corrélant les stades de développement du granulome dans toutes les biopsies avec les pourcentages d'expression de pJAK2, pSTAT1, pSTAT3 and pSTAT5. De façon intéressante nous avons constaté que les niveaux d'expression pSTAT1, pSTAT3 et pSTAT5 sont significativement corrélés avec les granulomes florides et inversement corrélés avec les granulomes « naked » et fibreux. Ce résultat suggère que l'activation de la voie canonique JAK/STAT et plus précisément STAT1, STAT3 et STAT5 participerait aux mécanismes de formation des granulomes plutôt qu'à leur persistance.

5 Détection de la voie canonique JAK/STAT dans les lymphocytes circulants des patients

Dans le but de déterminer l'origine du profil d'expression JAK/STAT particulier détecté dans le granulome de sarcoïdose (pJAK2 nucléaire dans les lymphocytes, sans détection des pSTATs), nous avons analysé l'expression de pJAK2 et pSTAT1 dans les lymphocytes circulants des patients atteints de sarcoïdose et des sujets sains en western blot et en immunocytochimie. Nous avons détecté l'activation de la voie canonique JAK2/STAT1 dans deux groupes de patients : le premier présente un niveau d'expression de pJAK2/pSTAT1 constant avant et après stimulation, caractérisé par une sarcoïdose multiviscérale ou une atteinte pulmonaire sévère. Le second groupe montre un profil d'expression de pJAK2/pSTAT1 similaire à celui des sujets sains, avant et après stimulation, caractérisé par une atteinte pulmonaire moins sévère. Ces observations montrent un profil d'expression de la voie JAK/STAT différent entre les lymphocytes circulants et ceux des granulomes. La détection de pJAK2 uniquement dans les extraits cytoplasmiques des lymphocytes périphériques des

patients, avant et après stimulation par l'IFN- γ , indique que l'expression non canonique de pJAK2 semble être exclusive aux lymphocytes des granulomes. Ceci suggère qu'au moment de la formation des granulomes, les lymphocytes attirés par chimiotactisme vers le tissu lésé sont stimulés par un facteur inconnu qui provoque la translocation nucléaire de JAK2. Par ailleurs, cette translocation nucléaire de JAK2 dans les lymphocytes des granulomes pourrait expliquer pourquoi STAT1 est inactivé dans les lymphocytes des granulomes et n'est détecté que dans les lymphocytes circulants.

Malgré un nombre restreint de patients, nous avons identifié une association entre la voie canonique JAK2/STAT1 et la sévérité de la maladie. Nos résultats sont concordants avec les analyses transcriptomiques. Récemment, une étude a révélé que la voie JAK/STAT, particulièrement *JAK2* et *STAT1*, est significativement régulée à la hausse dans les PBMC, les biopsies pulmonaires, cutanées, de l'orbite antérieure et de la glande lacrymale, ainsi que dans les ganglions lymphatiques des patients atteints de sarcoïdose (Lindquist et al., 2023). D'autres études transcriptomiques réalisées sur les PBMC, des poumons et des ganglions lymphatiques ont identifiés *STAT1*, ainsi que les gènes codants pour les chimiokines qu'il régule (*IL-5*, *IL-7*, *IL-15*, *CCR5*, *CXCL9*, *CXCL10* et *CXCL11*), comme des acteurs inflammatoires majeurs dans la sarcoïdose (Crouser et al., 2009; Rosenbaum et al., 2009). De manière similaire à nos observations, une autre étude a mis en évidence un lien entre la voie JAK/STAT et la sévérité de la maladie. L'analyse transcriptomique des PBMC provenant de patients atteints de sarcoïdose a identifié une signature moléculaire composée de 17 gènes (*ADORA3*, *ATP10A*, *CBLB*, *EFHA2*, *ERCC6L2*, *FIGNL1*, *GALNT12*, *IL6ST*, *ITGA6*, *MBTPS1*, *MTERFD2*, *SATB1*, *SORCS3*, *STAT4*, *TMEM263*, *UR11*, *ZFYVE9*) associés à la voie JAK/STAT, dont l'expression est corrélée avec la gravité de la maladie (Zhou et al., 2017). Des études plus approfondies sont nécessaires pour déterminer le lien entre la voie canonique JAK/STAT et la voie non canonique pJAK2, ainsi que leur rôle dans le développement et la progression du granulome et, par conséquent, dans la gravité de la sarcoïdose.

6 Perspectives

À court terme, il est essentiel de poursuivre l'analyse *in vitro* des PBMC provenant de patients et sujets sains. Dans un premier temps, il est nécessaire d'examiner l'activation des kinases JAKs et des facteurs de transcriptions STATs au niveau monocytes isolés, afin de

déterminer si l'activation des STATs, en particulier STAT1, STAT3 et STAT5, dans les cellules de la lignée myéloïdes CD68+ se produit de manière précoce au niveau des monocytes sanguins. Ensuite, il serait pertinent d'étudier l'effet des inhibiteurs pharmacologiques de JAKs (ruxolitinib et tofacitinib) sur les cellules du granulome, en se concentrant spécifiquement sur la voie d'activation des STATs dans les cellules de la lignée myéloïdes et sur la voie non canonique dans les lymphocytes. Il est probable qu'il y ait une restauration de la localisation cytoplasmique de JAK2, comme cela a déjà été démontré dans une autre étude (Rinaldi et al., 2010). D'autre part, des modèles murins de granulomatose pulmonaire induits par le *Propionibacterium acnes* ou par des nanotubes de carbone ont été mis au point dans le laboratoire. Il serait judicieux d'analyser l'activation des membres de la voie JAK/STAT dans les granulomes formés en réponse à ces antigènes potentiels associés à la sarcoïdose.

À moyen terme, il serait envisageable d'étudier le lien entre la voie non canonique JAK2 et l'hypoxie. En effet, une étude a suggéré l'implication de l'hypoxie dans la translocation nucléaire de JAK2 (Dudley et al., 2005). D'autre part, les travaux de Florence Jeny ont montré que les cellules principalement dérivées de macrophages, eux-mêmes dérivés de monocytes constituant le granulome sarcoïdien sont probablement exposées à l'hypoxie à différents moments d'évolution de la réaction inflammatoire-granulomateuse. Dans les formes actives de la sarcoïdose pulmonaire, ces cellules présentent une réponse accrue à l'hypoxie, caractérisée par une réponse pro-inflammatoire, pro-fibrosante et une phagocytose plus importante (Jeny et al., 2021). De même l'hypoxie semble favoriser la survenue des granulomes et l'évolution vers la fibrose dans des modèles *in vivo* de granulomatose induite par l'instillation intratrachéale de nanotubes de carbone (Jeny, 2021). Ce modèle pourrait être utilisé pour examiner la relation entre l'hypoxie, la fibrose et la voie non canonique JAK2. Un autre modèle, impliquant l'utilisation de PBMC de patients, serait pertinent pour explorer cette association. Actuellement, un modèle *in vitro* de granulome 3D, basé sur celui décrit par Tezera et al. est en cours de développement dans notre laboratoire (Tezera et al., 2017). Les PBMCs sont incorporées dans des billes d'alginate, une substance inerte, et peuvent être cultivées dans un espace sphérique clos reproduisant une matrice pour la formation de granulome.

Comme mentionnée précédemment, plusieurs études ont mis en évidence le rôle épigénétique de JAK2 dans le noyau, où il se trouve en colocalisation avec des histones clés impliquées dans la transition de l'hétérochromatine vers l'euchromatine (Dawson et al., 2009; Liu et al., 2011). Par ailleurs, une étude a identifié des gènes différemment méthylés dans la

sarcoïdose progressive par rapport à la sarcoïdose résolutive. Ces gènes sont impliqués dans l'immunité (HLA, chimiokines, MSMB, KIR3DL2), le remodelage de la chromatine (HMGA1), la transcription (ZDHHC2) et le métabolisme de la vitamine B6 (PDXK) (Yang et al., 2019). Il serait intéressant d'analyser la colocalisation entre JAK2 et les histones en utilisant des techniques d'analyse d'épigénétique telles que le ChIP-seq (*Chromatin Immunoprecipitation followed by Sequencing*). Cette étude permettrait de déterminer s'il existe une association entre la localisation nucléaire de JAK2, la méthylation des histones et l'expression des gènes détectés dans la sarcoïdose progressive.

Conclusion

Ce travail de thèse a permis de fournir des informations précises sur l'expression spatio-temporelle des membres de la voie JAK/STAT dans les granulomes et leur relation avec la sévérité de la sarcoïdose. Dans le granulome, nous avons identifié une voie non canonique impliquant l'activation nucléaire de JAK2 dans les lymphocytes, ainsi qu'une potentielle voie canonique impliquant l'activation de STAT1, STAT3 et STAT5 dans les cellules myéloïdes. Ces deux voies sont plus exprimées dans les organes les plus souvent touchés par la sarcoïdose (le poumon et la peau), et présentent deux signatures distinctes associées à la sévérité des atteintes. Par ailleurs, l'expression de ces protéines est uniquement corrélée avec le développement des granulomes et sans lien apparent avec leur persistance ou le stade fibreux. Nous avons également identifié une activation différentielle de JAK2 et STAT1 dans les lymphocytes du sang périphérique et des granulomes. La voie canonique JAK2/STAT1 activée dans les lymphocytes circulants est également associée à la sévérité de la maladie, tandis que la voie non canonique JAK2 semble être exclusive aux lymphocytes des granulomes. Ces résultats indiquent que les mécanismes et voies activés dans les cellules immunitaires du sang périphériques ne reflètent pas nécessairement ceux activés localement dans les granulomes. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour comprendre ces différences d'expression et leur lien avec le développement et, surtout, la progression de la maladie.

Références bibliographiques

- Adams, D.O., 1976. The granulomatous inflammatory response. A review. *Am J Pathol* 84, 164–192.
- Adrianto, I., Lin, C.P., Hale, J.J., Levin, A.M., Datta, I., Parker, R., Adler, A., Kelly, J.A., Kaufman, K.M., Lessard, C.J., Moser, K.L., Kimberly, R.P., Harley, J.B., Iannuzzi, M.C., Rybicki, B.A., Montgomery, C.G., 2012. Genome-wide association study of African and European Americans implicates multiple shared and ethnic specific loci in sarcoidosis susceptibility. *PLoS One* 7, e43907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043907>
- Albacker, L.A., Wu, J., Smith, P., Warmuth, M., Stephens, P.J., Zhu, P., Yu, L., Chmielecki, J., 2017. Loss of function JAK1 mutations occur at high frequency in cancers with microsatellite instability and are suggestive of immune evasion. *PLoS One* 12, e0176181. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176181>
- Ando, M., Goto, A., Takeno, Y., Yamasue, M., Komiya, K., Umeki, K., Nureki, S.-I., Miyazaki, E., Kadota, J.-I., 2018. Significant elevation of the levels of B-cell activating factor (BAFF) in patients with sarcoidosis. *Clin Rheumatol* 37, 2833–2838. <https://doi.org/10.1007/s10067-018-4183-2>
- Arakelyan, A., Kriegova, E., Kubištova, Z., Mrazek, F., Kverka, M., Du Bois, R.M., Kolek, V., Petrek, M., 2009. Protein levels of CC chemokine ligand (CCL)15, CCL16 and macrophage stimulating protein in patients with sarcoidosis. *Clinical and Experimental Immunology* 155, 457–465. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03832.x>
- Arger, N.K., Machiraju, S., Allen, I.E., Woodruff, P.G., Koth, L.L., 2020. T-bet Expression in Peripheral Th17.0 Cells Is Associated With Pulmonary Function Changes in Sarcoidosis. *Front Immunol* 11, 1129. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01129>
- Argetsinger, L.S., Kouadio, J.-L.K., Steen, H., Stensballe, A., Jensen, O.N., Carter-Su, C., 2004. Autophosphorylation of JAK2 on tyrosines 221 and 570 regulates its activity. *Mol Cell Biol* 24, 4955–4967. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.11.4955-4967.2004>
- Arkema, E.V., Cozier, Y.C., 2018. Epidemiology of sarcoidosis: current findings and future directions. *Therapeutic Advances in Chronic Disease* 9, 227–240. <https://doi.org/10.1177/2040622318790197>
- Arkema, E.V., Grunewald, J., Kullberg, S., Eklund, A., Askling, J., 2016. Sarcoidosis incidence and prevalence: a nationwide register-based assessment in Sweden. *Eur Respir J* 48, 1690–1699. <https://doi.org/10.1183/13993003.00477-2016>
- ATS/ERS/WASOG, 1999. Statement on sarcoidosis. Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS), the European Respiratory Society (ERS) and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG) adopted by the ATS Board of Directors and by the ERS Executive Committee, February 1999. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 736–755. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.160.2.ats4-99>
- Awasthi, N., Liongue, C., Ward, A.C., 2021. STAT proteins: a kaleidoscope of canonical and non-canonical functions in immunity and cancer. *Journal of Hematology & Oncology* 14, 198. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01214-y>
- Ayala-Aguilera, C.C., Valero, T., Lorente-Macías, Á., Baillache, D.J., Croke, S., Unciti-Broceta, A., 2022. Small Molecule Kinase Inhibitor Drugs (1995-2021): Medical Indication, Pharmacology, and Synthesis. *J Med Chem* 65, 1047–1131. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00963>

- Bacon, C.M., McVicar, D.W., Ortaldo, J.R., Rees, R.C., O’Shea, J.J., Johnston, J.A., 1995. Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. *J Exp Med* 181, 399–404. <https://doi.org/10.1084/jem.181.1.399>
- Baetz, A., Koelsche, C., Strebovsky, J., Heeg, K., Dalpke, A.H., 2008. Identification of a nuclear localization signal in suppressor of cytokine signaling 1. *FASEB J* 22, 4296–4305. <https://doi.org/10.1096/fj.08-116079>
- Ball, N.J., Kho, G.T., Martinka, M., 2004. The histologic spectrum of cutaneous sarcoidosis: a study of twenty-eight cases. *J Cutan Pathol* 31, 160–168. <https://doi.org/10.1111/j.0303-6987.2004.00157.x>
- Barna, B.P., McPeck, M., Malur, A., Fessler, M.B., Wingard, C.J., Dobbs, L., Verbanac, K.M., Bowling, M., Judson, M.A., Thomassen, M.J., 2016. Elevated MicroRNA-33 in Sarcoidosis and a Carbon Nanotube Model of Chronic Granulomatous Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 54, 865–871. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0332OC>
- Barnard, J., Rose, C., Newman, L., Canner, M., Martyny, J., McCammon, C., Bresnitz, E., Rossman, M., Thompson, B., Rybicki, B., Weinberger, S.E., Moller, D.R., McLennan, G., Hunninghake, G., DePalo, L., Baughman, R.P., Iannuzzi, M.C., Judson, M.A., Knatterud, G.L., Teirstein, A.S., Yeager, H., Johns, C.J., Rabin, D.L., Cherniack, R., ACCESS Research Group, 2005. Job and industry classifications associated with sarcoidosis in A Case-Control Etiologic Study of Sarcoidosis (ACCESS). *J Occup Environ Med* 47, 226–234. <https://doi.org/10.1097/01.jom.0000155711.88781.91>
- Baughman, R.P., Drent, M., Kavuru, M., Judson, M.A., Costabel, U., du Bois, R., Albera, C., Brutsche, M., Davis, G., Donohue, J.F., Müller-Quernheim, J., Schlenker-Herceg, R., Flavin, S., Lo, K.H., Oemar, B., Barnathan, E.S., Sarcoidosis Investigators, 2006. Infliximab therapy in patients with chronic sarcoidosis and pulmonary involvement. *Am J Respir Crit Care Med* 174, 795–802. <https://doi.org/10.1164/rccm.200603-402OC>
- Baughman, R.P., Field, S., Costabel, U., Crystal, R.G., Culver, D.A., Drent, M., Judson, M.A., Wolff, G., 2016. Sarcoidosis in America. Analysis Based on Health Care Use. *Ann Am Thorac Soc* 13, 1244–1252. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201511-760OC>
- Baughman, R.P., Lower, E.E., 2007. Evidence-based therapy for cutaneous sarcoidosis. *Clin Dermatol* 25, 334–340. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2007.03.011>
- Baughman, R.P., Nagai, S., Balter, M., Costabel, U., Drent, M., du Bois, R., Grutters, J.C., Judson, M.A., Lambiri, I., Lower, E.E., Muller-Quernheim, J., Prasse, A., Rizzato, G., Rottoli, P., Spagnolo, P., Teirstein, A., 2011. Defining the clinical outcome status (COS) in sarcoidosis: results of WASOG Task Force. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 28, 56–64.
- Baughman, R.P., Teirstein, A.S., Judson, M.A., Rossman, M.D., Yeager, H., Bresnitz, E.A., DePALO, L., Hunninghake, G., Iannuzzi, M.C., Johns, C.J., McLENNAN, G., Moller, D.R., Newman, L.S., Rabin, D.L., Rose, C., Rybicki, B., Weinberger, S.E., Terrin, M.L., Knatterud, G.L., Cherniak, R., Group, A.C.C.E.S. of S. (access) R., 2001. Clinical Characteristics of Patients in a Case Control Study of Sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 1885–1889. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.10.2104046>
- Beghè, D., Dall’Asta, L., Garavelli, C., Pastorelli, A.A., Muscarella, M., Saccani, G., Aiello, M., Crisafulli, E., Corradi, M., Stacchini, P., Chetta, A., Bertorelli, G., 2017. Sarcoidosis in an Italian province. Prevalence and environmental risk factors. *PLoS One* 12, e0176859. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176859>

- Begitt, A., Droscher, M., Knobloch, K.-P., Vinkemeier, U., 2011. SUMO conjugation of STAT1 protects cells from hyperresponsiveness to IFN γ . *Blood* 118, 1002–1007. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-347930>
- Beijer, E., Meek, B., Bossuyt, X., Peters, S., Vermeulen, R.C.H., Kromhout, H., Veltkamp, M., 2020. Immunoreactivity to metal and silica associates with sarcoidosis in Dutch patients. *Respiratory Research* 21, 141. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01409-w>
- Belkhou, A., Younsi, R., El Bouchti, I., El Hassani, S., 2008. Rituximab as a treatment alternative in sarcoidosis. *Joint Bone Spine* 75, 511–512. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2008.01.025>
- Benamore, R., Kendrick, Y.R., Repapi, E., Helm, E., Cole, S.L., Taylor, S., Ho, L.-P., 2016. CTAS: a CT score to quantify disease activity in pulmonary sarcoidosis. *Thorax* 71, 1161–1163. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-208833>
- Benveniste, E., Liu, Y., McFarland, B., Qin, H., 2014. Involvement of the Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling Pathway in Multiple Sclerosis and the Animal Model of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 34, 577–88. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0012>
- Besnard, V., Calender, A., Bouvry, D., Pacheco, Y., Chapelon-Abric, C., Jeny, F., Nunes, H., Planès, C., Valeyre, D., 2018. G908R NOD2 variant in a family with sarcoidosis. *Respiratory Research* 19, 44. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0748-5>
- Bhattacharya, S., Eckner, R., Grossman, S., Oldread, E., Arany, Z., D'Andrea, A., Livingston, D.M., 1996. Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signalling induced by interferon- α . *Nature* 383, 344–347. <https://doi.org/10.1038/383344a0>
- Bogunia-Kubik, K., Koscińska, K., Suchnicki, K., Lange, A., 2006. HSP70-hom gene single nucleotide (+2763 G/A and +2437 C/T) polymorphisms in sarcoidosis. *Int J Immunogenet* 33, 135–140. <https://doi.org/10.1111/j.1744-313X.2006.00584.x>
- Boleto, G., Vieira, M., Desbois, A.C., Saadoun, D., Cacoub, P., 2020. Emerging Molecular Targets for the Treatment of Refractory Sarcoidosis. *Frontiers in Medicine* 7.
- Bonelli, M., Kerschbaumer, A., Kastrati, K., Ghoreschi, K., Gadina, M., Heinz, L.X., Smolen, J.S., Aletaha, D., O'Shea, J., Laurence, A., 2024. Selectivity, efficacy and safety of JAKinibs: new evidence for a still evolving story. *Ann Rheum Dis* 83, 139–160. <https://doi.org/10.1136/ard-2023-223850>
- Boniface, K., Blom, B., Liu, Y.-J., de Waal Malefyt, R., 2008. From interleukin-23 to T-helper 17 cells: human T-helper cell differentiation revisited. *Immunol Rev* 226, 132–146. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00714.x>
- Brito-Zerón, P., Kostov, B., Superville, D., Baughman, R.P., Ramos-Casals, M., Autoimmune Big Data Study Group, 2019. Geoepidemiological big data approach to sarcoidosis: geographical and ethnic determinants. *Clin Exp Rheumatol* 37, 1052–1064.
- Broos, C.E., Koth, L.L., van Nimwegen, M., In 't Veen, J.C.C.M., Paulissen, S.M.J., van Hamburg, J.P., Annema, J.T., Heller-Baan, R., Kleinjan, A., Hoogsteden, H.C., Wijsenbeek, M.S., Hendriks, R.W., van den Blink, B., Kool, M., 2018. Increased T-helper 17.1 cells in sarcoidosis mediastinal lymph nodes. *Eur Respir J* 51, 1701124. <https://doi.org/10.1183/13993003.01124-2017>
- Broos, C.E., van Nimwegen, M., Hoogsteden, H.C., Hendriks, R.W., Kool, M., van den Blink, B., 2013. Granuloma Formation in Pulmonary Sarcoidosis. *Front. Immunol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00437>

- Broos, C.E., van Nimwegen, M., In 't Veen, J.C.C.M., Hoogsteden, H.C., Hendriks, R.W., van den Blink, B., Kool, M., 2015a. Decreased Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 Expression on Regulatory T Cells and Th17 Cells in Sarcoidosis: Double Trouble? *Am J Respir Crit Care Med* 192, 763–765. <https://doi.org/10.1164/rccm.201503-0635LE>
- Broos, C.E., van Nimwegen, M., Kleinjan, A., ten Berge, B., Muskens, F., in 't Veen, J.C.C.M., Annema, J.T., Lambrecht, B.N., Hoogsteden, H.C., Hendriks, R.W., Kool, M., van den Blink, B., 2015b. Impaired survival of regulatory T cells in pulmonary sarcoidosis. *Respiratory Research* 16, 108. <https://doi.org/10.1186/s12931-015-0265-8>
- Brown, S., Hu, N., Hombría, J.C.-G., 2003. Novel level of signalling control in the JAK/STAT pathway revealed by in situ visualisation of protein-protein interaction during *Drosophila* development. *Development* 130, 3077–3084. <https://doi.org/10.1242/dev.00535>
- Bühling, F., Reisenauer, A., Gerber, A., Krüger, S., Weber, E., Brömme, D., Roessner, A., Ansorge, S., Welte, T., Röcken, C., 2001. Cathepsin K--a marker of macrophage differentiation? *J Pathol* 195, 375–382. <https://doi.org/10.1002/path.959>
- Burke, J.R., Cheng, L., Gillooly, K.M., Strnad, J., Zupa-Fernandez, A., Catlett, I.M., Zhang, Y., Heimrich, E.M., McIntyre, K.W., Cunningham, M.D., Carman, J.A., Zhou, X., Banas, D., Chaudhry, C., Li, S., D'Arienzo, C., Chimalakonda, A., Yang, X., Xie, J.H., Pang, J., Zhao, Q., Rose, S.M., Huang, J., Moslin, R.M., Wroblewski, S.T., Weinstein, D.S., Salter-Cid, L.M., 2019. Autoimmune pathways in mice and humans are blocked by pharmacological stabilization of the TYK2 pseudokinase domain. *Sci Transl Med* 11, eaaw1736. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw1736>
- Burke, W.M., Keogh, A., Maloney, P.J., Delprado, W., Bryant, D.H., Spratt, P., 1990. Transmission of sarcoidosis via cardiac transplantation. *Lancet* 336, 1579. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)93354-r](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)93354-r)
- Candotti, F., Oakes, S.A., Johnston, J.A., Giliani, S., Schumacher, R.F., Mella, P., Fiorini, M., Ugazio, A.G., Badolato, R., Notarangelo, L.D., Bozzi, F., Macchi, P., Strina, D., Vezzoni, P., Blaese, R.M., O'Shea, J.J., Villa, A., 1997. Structural and functional basis for JAK3-deficient severe combined immunodeficiency. *Blood* 90, 3996–4003.
- Cardoso, J.C., Cravo, M., Reis, J.P., Tellechea, O., 2009. Cutaneous sarcoidosis: a histopathological study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 23, 678–682. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2009.03153.x>
- Carlson, I., Tognazzi, K., Manseau, E.J., Dvorak, H.F., Brown, L.F., 1997. Osteopontin is strongly expressed by histiocytes in granulomas of diverse etiology. *Lab Invest* 77, 103–108.
- Carrington, C.B., 1976. Structure and function in sarcoidosis. *Ann N Y Acad Sci* 278, 265–283. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1976.tb47038.x>
- Chakraborty, D., Šumová, B., Mallano, T., Chen, C.-W., Distler, A., Bergmann, C., Ludolph, I., Horch, R.E., Gelse, K., Ramming, A., Distler, O., Schett, G., Šenolt, L., Distler, J.H.W., 2017. Activation of STAT3 integrates common profibrotic pathways to promote fibroblast activation and tissue fibrosis. *Nat Commun* 8, 1130. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01236-6>
- Chatterjee-Kishore, M., Kishore, R., Hicklin, D.J., Marincola, F.M., Ferrone, S., 1998. Different requirements for signal transducer and activator of transcription 1alpha and interferon regulatory factor 1 in the regulation of low molecular mass polypeptide 2 and transporter associated with antigen processing 1 gene expression. *J Biol Chem* 273, 16177–16183. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.26.16177>

- Chaudhry, A., Rudra, D., Treuting, P., Samstein, R.M., Liang, Y., Kas, A., Rudensky, A.Y., 2009. CD4+ regulatory T cells control Th17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* 326, 986–991. <https://doi.org/10.1126/science.1172702>
- Chen, E.S., Moller, D.R., 2014. Etiologic role of infectious agents. *Semin Respir Crit Care Med* 35, 285–295. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1376859>
- Chen, M., Cheng, A., Chen, Y.Q., Hymel, A., Hanson, E.P., Kimmel, L., Minami, Y., Taniguchi, T., Changelian, P.S., O’Shea, J.J., 1997. The amino terminus of JAK3 is necessary and sufficient for binding to the common gamma chain and confers the ability to transmit interleukin 2-mediated signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6910–6915. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.6910>
- Chen, X., Vinkemeier, U., Zhao, Y., Jeruzalmi, D., Darnell, J.E., Kuriyan, J., 1998. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* 93, 827–839. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81443-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81443-9)
- Chung, C.D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., Shuai, K., 1997. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278, 1803–1805. <https://doi.org/10.1126/science.278.5344.1803>
- Churg, A., Carrington, C.B., Gupta, R., 1979. Necrotizing Sarcoid Granulomatosis. *Chest* 76, 406–413. <https://doi.org/10.1378/chest.76.4.406>
- Clark, J.D., Flanagan, M.E., Telliez, J.-B., 2014. Discovery and development of Janus kinase (JAK) inhibitors for inflammatory diseases. *J Med Chem* 57, 5023–5038. <https://doi.org/10.1021/jm401490p>
- Clevenger, C.V., Russell, D.H., Appasamy, P.M., Prystowsky, M.B., 1990. Regulation of interleukin 2-driven T-lymphocyte proliferation by prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6460–6464.
- Colboc, H., Moguelet, P., Bazin, D., Bachmeyer, C., Frochot, V., Weil, R., Letavernier, E., Jouanneau, C., Daudon, M., Bernaudin, J. f., 2019. Physicochemical characterization of inorganic deposits associated with granulomas in cutaneous sarcoidosis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 33, 198–203. <https://doi.org/10.1111/jdv.15167>
- Consensus conference: activity of sarcoidosis. Third WASOG meeting, Los Angeles, USA, September 8-11, 1993, 1994. . *Eur Respir J* 7, 624–627. <https://doi.org/10.1183/09031936.94.07030624>
- Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Schindler, C., Zhong, Z., Wen, Z., Darnell, J.E., Mui, A.L., Miyajima, A., Quelle, F.W., Ihle, J.N., 1995. Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. *Genomics* 29, 225–228. <https://doi.org/10.1006/geno.1995.1235>
- Coricello, A., Mesiti, F., Lupia, A., Maruca, A., Alcaro, S., 2020. Inside Perspective of the Synthetic and Computational Toolbox of JAK Inhibitors: Recent Updates. *Molecules* 25, 3321. <https://doi.org/10.3390/molecules25153321>
- Costabel, U., Hunninghake, G.W., On Behalf Of The Sarcoidosis Statement Committee, 1999. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. *Eur Respir J* 14, 735. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.1999.14d02.x>
- Crouse, J., Kalinke, U., Oxenius, A., 2015. Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nat Rev Immunol* 15, 231–242. <https://doi.org/10.1038/nri3806>
- Crouser, E.D., Culver, D.A., Knox, K.S., Julian, M.W., Shao, G., Abraham, S., Liyanarachchi, S., Macre, J.E., Wewers, M.D., Gavrilin, M.A., Ross, P., Abbas, A., Eng, C., 2009. Gene Expression Profiling Identifies MMP-12 and ADAMDEC1 as Potential Pathogenic Mediators of Pulmonary Sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 179, 929–938. <https://doi.org/10.1164/rccm.200803-490OC>

- Culver, D.A., Barna, B.P., Raychaudhuri, B., Bonfield, T.L., Abraham, S., Malur, A., Farver, C.F., Kavuru, M.S., Thomassen, M.J., 2004. Peroxisome Proliferator–Activated Receptor γ Activity Is Deficient in Alveolar Macrophages in Pulmonary Sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30, 1–5. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2003-0304RC>
- Damsky, W., Thakral, D., Emeagwali, N., Galan, A., King, B., 2018. Tofacitinib Treatment and Molecular Analysis of Cutaneous Sarcoidosis. *N Engl J Med* 379, 2540–2546. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1805958>
- Damsky, W., Young, B.D., Sloan, B., Miller, E.J., Obando, J.A., King, B., 2020. Treatment of Multiorgan Sarcoidosis With Tofacitinib. *ACR Open Rheuma* 2, 106–109. <https://doi.org/10.1002/acr2.11112>
- Danel, C., Dewar, A., Corrin, B., Turner-Warwick, M., Chretien, J., 1983. Ultrastructural changes in bronchoalveolar lavage cells in sarcoidosis and comparison with the tissue granuloma. *Am J Pathol* 112, 7–17.
- Darlington, P., Gabrielsen, A., Sörensson, P., Tallstedt, L., Padyukov, L., Eklund, A., Grunewald, J., 2014. HLA-alleles associated with increased risk for extra-pulmonary involvement in sarcoidosis. *Tissue Antigens* 83, 267–272. <https://doi.org/10.1111/tan.12326>
- Darnell, J.E., Kerr, I.M., Stark, G.R., 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415–1421. <https://doi.org/10.1126/science.8197455>
- Dawson, M.A., Bannister, A.J., Göttgens, B., Foster, S.D., Bartke, T., Green, A.R., Kouzarides, T., 2009. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1 α from chromatin. *Nature* 461, 819–822. <https://doi.org/10.1038/nature08448>
- de Smet, M.D., Ramadan, A., 2001. Circulating antibodies to inducible heat shock protein 70 in patients with uveitis. *Ocul Immunol Inflamm* 9, 85–92. <https://doi.org/10.1076/ocii.9.2.85.3973>
- Decker, T., Kovarik, P., Meinke, A., 1997. GAS Elements: A Few Nucleotides with a Major Impact on Cytokine-Induced Gene Expression. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 17, 121–134. <https://doi.org/10.1089/jir.1997.17.121>
- Dehara, M., Sachs, M.C., Grunewald, J., Blomberg, A., Arkema, E.V., 2023. Modifiable lifestyle risk factors for sarcoidosis: a nested case–control study. *ERJ Open Research* 9. <https://doi.org/10.1183/23120541.00492-2022>
- Demirkok, S.S., Basaranoglu, M., Coker, E., Karayel, T., 2007. Seasonality of the onset of symptoms, tuberculin test anergy and Kveim positive reaction in a large cohort of patients with sarcoidosis. *Respirology* 12, 591–593. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2007.01062.x>
- Dimberg, A., Karlberg, I., Nilsson, K., Oberg, F., 2003. Ser727/Tyr701-phosphorylated Stat1 is required for the regulation of c-Myc, cyclins, and p27Kip1 associated with ATRA-induced G0/G1 arrest of U-937 cells. *Blood* 102, 254–261. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3149>
- Dréno, B., 2020. Tatouage et réaction sarcoïdique. *Bull Acad Natl Med* 204, 611–615. <https://doi.org/10.1016/j.banm.2020.04.011>
- Drent, M., Bomans, P.H., Van Suylen, R.J., Lamers, R.J., Bast, A., Wouters, E.F., 2000. Association of man-made mineral fibre exposure and sarcoidlike granulomas. *Respir Med* 94, 815–820. <https://doi.org/10.1053/rmed.2000.0827>
- Drent, M., Lower, E.E., De Vries, J., 2012. Sarcoidosis-associated fatigue. *Eur Respir J* 40, 255–263. <https://doi.org/10.1183/09031936.00002512>

- Drent, M., Wirnsberger, R.M., de Vries, J., van Dieijen-Visser, M.P., Wouters, E.F., Schols, A.M., 1999. Association of fatigue with an acute phase response in sarcoidosis. *Eur Respir J* 13, 718–722. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.1999.13d03.x>
- Duan, J., Xu, Y., Zhu, H., Zhang, H., Sun, S., Sun, H., Wang, W., Xie, S., 2018. Relationship between CT activity score with lung function and the serum angiotensin converting enzyme in pulmonary sarcoidosis on chest HRCT. *Medicine (Baltimore)* 97, e12205. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000012205>
- Duchemann, B., Annesi-Maesano, I., Naurois, C.J. de, Sanyal, S., Brillet, P.-Y., Brauner, M., Kambouchner, M., Huynh, S., Naccache, J.M., Borie, R., Piquet, J., Mekinian, A., Virally, J., Uzunhan, Y., Cadranet, J., Crestani, B., Fain, O., Lhote, F., Dhote, R., Saidenberg-Kermanac'h, N., Rosental, P.-A., Valeyre, D., Nunes, H., 2017. Prevalence and incidence of interstitial lung diseases in a multi-ethnic county of Greater Paris. *European Respiratory Journal* 50. <https://doi.org/10.1183/13993003.02419-2016>
- Dudley, A.C., Thomas, D., Best, J., Jenkins, A., 2005. A VEGF/JAK2/STAT5 axis may partially mediate endothelial cell tolerance to hypoxia. *Biochem J* 390, 427–436. <https://doi.org/10.1042/BJ20050351>
- Duetsch, G., Illig, T., Loesgen, S., Rohde, K., Klopp, N., Herbon, N., Gohlke, H., Altmueller, J., Wjst, M., 2002. STAT6 as an asthma candidate gene: polymorphism-screening, association and haplotype analysis in a Caucasian sib-pair study. *Hum Mol Genet* 11, 613–621. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.6.613>
- Ebe, Y., Ikushima, S., Yamaguchi, T., Kohno, K., Azuma, A., Sato, K., Ishige, I., Usui, Y., Takemura, T., Eishi, Y., 2000. Proliferative response of peripheral blood mononuclear cells and levels of antibody to recombinant protein from *Propionibacterium acnes* DNA expression library in Japanese patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 17, 256–265.
- Eletto, D., Burns, S.O., Angulo, I., Plagnol, V., Gilmour, K.C., Henriquez, F., Curtis, J., Gaspar, M., Nowak, K., Daza-Cajigal, V., Kumararatne, D., Doffinger, R., Thrasher, A.J., Nejentsev, S., 2016. Biallelic JAK1 mutations in immunodeficient patient with mycobacterial infection. *Nat Commun* 7, 13992. <https://doi.org/10.1038/ncomms13992>
- Esteves, T., Aparicio, G., Garcia-Patos, V., 2016. Is there any association between Sarcoidosis and infectious agents?: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pulm Med* 16, 165. <https://doi.org/10.1186/s12890-016-0332-z>
- Facco, M., Cabrelle, A., Teramo, A., Olivieri, V., Gnoato, M., Teolato, S., Ave, E., Gattazzo, C., Fadini, G.P., Calabrese, F., Semenzato, G., Agostini, C., 2011. Sarcoidosis is a Th1/Th17 multisystem disorder. *Thorax* 66, 144–150. <https://doi.org/10.1136/thx.2010.140319>
- Feng, J., Witthuhn, B.A., Matsuda, T., Kohlhuber, F., Kerr, I.M., Ihle, J.N., 1997. Activation of Jak2 Catalytic Activity Requires Phosphorylation of Y1007 in the Kinase Activation Loop. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.5.2497>
- Ferrao, R., Lupardus, P.J., 2017. The Janus Kinase (JAK) FERM and SH2 Domains: Bringing Specificity to JAK–Receptor Interactions. *Frontiers in Endocrinology* 8.
- Fidler, L.M., Balter, M., Fisher, J.H., To, T., Stanbrook, M.B., Gershon, A., 2019. Epidemiology and health outcomes of sarcoidosis in a universal healthcare population: a cohort study. *Eur Respir J* 54, 1900444. <https://doi.org/10.1183/13993003.00444-2019>

- Finbloom, D.S., Winestock, K.D., 1995. IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J Immunol* 155, 1079–1090.
- Fischer, A., Rybicki, B.A., 2015. Granuloma genes in sarcoidosis – what’s new? *Curr Opin Pulm Med* 21, 510–516. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000189>
- Fité, E., Alsina, J.M., Mañá, J., Pujol, R., Ruiz, J., Morera, J., 1996. Epidemiology of sarcoidosis in Catalonia: 1979-1989. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 13, 153–158.
- Flex, E., Petrangeli, V., Stella, L., Chiaretti, S., Hornakova, T., Knoops, L., Ariola, C., Fodale, V., Clappier, E., Paoloni, F., Martinelli, S., Fragale, A., Sanchez, M., Tavolaro, S., Messina, M., Cazzaniga, G., Camera, A., Pizzolo, G., Tornesello, A., Vignetti, M., Battistini, A., Cavé, H., Gelb, B.D., Renault, J.-C., Biondi, A., Constantinescu, S.N., Foà, R., Tartaglia, M., 2008. Somatically acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med* 205, 751–758. <https://doi.org/10.1084/jem.20072182>
- Frank, S.J., Yi, W., Zhao, Y., Goldsmith, J.F., Gilliland, G., Jiang, J., Sakai, I., Kraft, A.S., 1995. Regions of the JAK2 tyrosine kinase required for coupling to the growth hormone receptor. *J Biol Chem* 270, 14776–14785. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.24.14776>
- Furusawa, H., Suzuki, Y., Miyazaki, Y., Inase, N., Eishi, Y., 2012. Th1 and Th17 immune responses to viable *Propionibacterium acnes* in patients with sarcoidosis. *Respir Investig* 50, 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.resinv.2012.07.001>
- Garman, L., Montgomery, C.G., Rivera, N.V., 2020. Recent advances in sarcoidosis genomics: epigenetics, gene expression, and gene by environment (G×E) interactions studies. *Curr Opin Pulm Med* 26, 544–553. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000719>
- Garrido-Trigo, A., Salas, A., 2020. Molecular Structure and Function of Janus Kinases: Implications for the Development of Inhibitors. *J Crohns Colitis* 14, S713–S724. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjz206>
- Gauzzi, M.C., Velazquez, L., McKendry, R., Mogensen, K.E., Fellous, M., Pellegrini, S., 1996. Interferon-alpha-dependent activation of Tyk2 requires phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase. *J Biol Chem* 271, 20494–20500. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20494>
- Gnanasambandan, K., Sayeski, P.P., 2011. A Structure-Function Perspective of Jak2 Mutations and Implications for Alternate Drug Design Strategies: The Road not Taken. *Curr Med Chem* 18, 4659–4673.
- Gordon, S., Martinez-Pomares, L., 2017. Physiological roles of macrophages. *Pflugers Arch* 469, 365–374. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-1945-7>
- Govender, P., Berman, J.S., 2015. The Diagnosis of Sarcoidosis. *Clin Chest Med* 36, 585–602. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2015.08.003>
- Graff, P., Larsson, J., Bryngelsson, I.-L., Wiebert, P., Vihlborg, P., 2020. Sarcoidosis and silica dust exposure among men in Sweden: a case-control study. *BMJ Open* 10, e038926. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-038926>
- Grunewald, J., Eklund, A., 2009. Löfgren’s Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 179, 307–312. <https://doi.org/10.1164/rccm.200807-1082OC>
- Grunewald, J., Idali, F., Kockum, I., Seddighzadeh, M., Nisell, M., Eklund, A., Padyukov, L., 2010. Major histocompatibility complex class II transactivator gene polymorphism: associations with Löfgren’s syndrome. *Tissue Antigens* 76, 96–101. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2010.01476.x>

- Grutters, J.C., van den Bosch, J.M.M., 2006. Corticosteroid treatment in sarcoidosis. *Eur Respir J* 28, 627–636. <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00105805>
- Gual, P., Baron, V., Lequoy, V., Van Obberghen, E., 1998. Interaction of Janus kinases JAK-1 and JAK-2 with the insulin receptor and the insulin-like growth factor-1 receptor. *Endocrinology* 139, 884–893. <https://doi.org/10.1210/endo.139.3.5829>
- Gurniak, C.B., Berg, L.J., 1996. Murine JAK3 is preferentially expressed in hematopoietic tissues and lymphocyte precursor cells. *Blood* 87, 3151–3160.
- Hamilton, J.A., 2019. GM-CSF in inflammation. *J Exp Med* 217, e20190945. <https://doi.org/10.1084/jem.20190945>
- Harper, L.J., Gerke, A.K., Wang, X.-F., Ribeiro Neto, M.L., Baughman, R.P., Beyer, K., Drent, M., Judson, M.A., Maier, L.A., Serchuck, L., Singh, N., Culver, D.A., 2020. Income and Other Contributors to Poor Outcomes in U.S. Patients with Sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 201, 955–964. <https://doi.org/10.1164/rccm.201906-1250OC>
- Hassani, M., Koenderman, L., 2018. Immunological and hematological effects of IL-5(R α)-targeted therapy: An overview. *Allergy* 73, 1979–1988. <https://doi.org/10.1111/all.13451>
- Hauber, H., Gholami, D., Meyer, A., Pforte, A., 2003. Increased interleukin-13 expression in patients with sarcoidosis. *Thorax* 58, 519–524. <https://doi.org/10.1136/thorax.58.6.519>
- Hawkins, C., Shaginurova, G., Shelton, D.A., Herazo-Maya, J.D., Oswald-Richter, K.A., Rotsinger, J.E., Young, A., Celada, L.J., Kaminski, N., Sevin, C., Drake, W.P., 2017. Local and Systemic CD4⁺ T Cell Exhaustion Reverses with Clinical Resolution of Pulmonary Sarcoidosis. *Journal of Immunology Research* 2017, e3642832. <https://doi.org/10.1155/2017/3642832>
- Heij, L., Dahan, A., Hoitsma, E., 2012. Sarcoidosis and pain caused by small-fiber neuropathy. *Pain Res Treat* 2012, 256024. <https://doi.org/10.1155/2012/256024>
- Helmer, R.A., Panchoo, M., Dertien, J.S., Bhakta, S.M., Hewetson, A., Chilton, B.S., 2010. Prolactin-induced Jak2 phosphorylation of RUSH: a key element in Jak/RUSH signaling. *Mol Cell Endocrinol* 325, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.05.010>
- Helming, L., Gordon, S., 2009. Molecular mediators of macrophage fusion. *Trends in Cell Biology* 19, 514–522. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.07.005>
- Henke, C.E., Henke, G., Elveback, L.R., Beard, C.M., Ballard, D.J., Kurland, L.T., 1986. The epidemiology of sarcoidosis in Rochester, Minnesota: a population-based study of incidence and survival. *Am J Epidemiol* 123, 840–845. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a114313>
- Heron, M., van Moorsel, C.H.M., Grutters, J.C., Huizinga, T.W.J., van der Helm-van Mil, A.H.M., Nagtegaal, M.M., Ruven, H.J.T., van den Bosch, J.M.M., 2011. Genetic variation in GREM1 is a risk factor for fibrosis in pulmonary sarcoidosis. *Tissue Antigens* 77, 112–117. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2010.01590.x>
- Herrtwich, L., Nanda, I., Evangelou, K., Nikolova, T., Horn, V., Sagar, null, Erny, D., Stefanowski, J., Rogell, L., Klein, C., Gharun, K., Follo, M., Seidl, M., Kremer, B., Münke, N., Senges, J., Fliegauf, M., Aschman, T., Pfeifer, D., Sarrazin, S., Sieweke, M.H., Wagner, D., Dierks, C., Haaf, T., Ness, T., Zaiss, M.M., Voll, R.E., Deshmukh, S.D., Prinz, M., Goldmann, T., Hölscher, C., Hauser, A.E., Lopez-Contreras, A.J., Grün, D., Gorgoulis, V., Diefenbach, A., Henneke, P., Triantafyllopoulou, A., 2016. DNA Damage Signaling Instructs Polyploid Macrophage Fate in Granulomas. *Cell* 167, 1264–1280.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.054>

- Hillerdal, G., Nöu, E., Osterman, K., Schmekel, B., 1984. Sarcoidosis: epidemiology and prognosis. A 15-year European study. *Am Rev Respir Dis* 130, 29–32. <https://doi.org/10.1164/arrd.1984.130.1.29>
- Hinz, A., Geue, K., Zenger, M., Wirtz, H., Bosse-Henck, A., 2018. Daytime Sleepiness in Patients Diagnosed with Sarcoidosis Compared with the General Population. *Can Respir J* 2018, 6853948. <https://doi.org/10.1155/2018/6853948>
- Homma, J.Y., Abe, C., Chosa, H., Ueda, K., Saegusa, J., Nakayama, M., Homma, H., Washizaki, M., Okano, H., 1978. Bacteriological investigation on biopsy specimens from patients with sarcoidosis. *Jpn J Exp Med* 48, 251–255.
- Horvath, C.M., Wen, Z., Darnell, J.E., 1995. A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev* 9, 984–994. <https://doi.org/10.1101/gad.9.8.984>
- Hrycaj, P., Wurm, K., Mennet, P., Müller, W., 1995. Antibodies to heat shock proteins in patients with pulmonary sarcoidosis. *Sarcoidosis* 12, 124–130.
- Hu, X., Li, J., Fu, M., Zhao, X., Wang, W., 2021. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Sig Transduct Target Ther* 6, 1–33. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00791-1>
- Huang, H., Lu, Z., Jiang, C., Liu, J., Wang, Y., Xu, Z., 2013. Imbalance between Th17 and Regulatory T-Cells in Sarcoidosis. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 21463–21473. <https://doi.org/10.3390/ijms141121463>
- Huang, M., Qian, F., Hu, Y., Ang, C., Li, Z., Wen, Z., 2002. Chromatin-remodelling factor BRG1 selectively activates a subset of interferon-alpha-inducible genes. *Nat Cell Biol* 4, 774–781. <https://doi.org/10.1038/ncb855>
- Hubbard, S.R., Till, J.H., 2000. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem* 69, 373–398. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.373>
- Hug, C., Reutter, F.W., Gloor, F., 1987. [Sarcoidosis of the kidney]. *Schweiz Med Wochenschr* 117, 2118–2121.
- Hunninghake, G.W., Costabel, U., Ando, M., Baughman, R., Cordier, J.F., du Bois, R., Eklund, A., Kitaichi, M., Lynch, J., Rizzato, G., Rose, C., Selroos, O., Semenzato, G., Sharma, O.P., 1999. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. American Thoracic Society/European Respiratory Society/World Association of Sarcoidosis and other Granulomatous Disorders. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 16, 149–173.
- Huppertz, C., Jäger, B., Wieczorek, G., Engelhard, P., Oliver, S.J., Bauernfeind, F.-G., Littlewood-Evans, A., Welte, T., Hornung, V., Prasse, A., 2020. The NLRP3 inflammasome pathway is activated in sarcoidosis and involved in granuloma formation. *European Respiratory Journal* 55. <https://doi.org/10.1183/13993003.00119-2019>
- Iannuzzi, M.C., Fontana, J.R., 2011. Sarcoidosis: clinical presentation, immunopathogenesis, and therapeutics. *JAMA* 305, 391–399. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.10>
- Idali, F., Wahlström, J., Müller-Suur, C., Eklund, A., Grunewald, J., 2008. Analysis of regulatory T cell associated forkhead box P3 expression in the lungs of patients with sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 152, 127–137. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03609.x>
- Ito, M., Nakasato, M., Suzuki, T., Sakai, S., Nagata, M., Aoki, F., 2004. Localization of janus kinase 2 to the nuclei of mature oocytes and early cleavage stage mouse embryos. *Biol Reprod* 71, 89–96. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.023226>

- Ivashkiv, L.B., Donlin, L.T., 2014. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 14, 36–49. <https://doi.org/10.1038/nri3581>
- Izbicki, G., Chavko, R., Banauch, G.I., Weiden, M.D., Berger, K.I., Aldrich, T.K., Hall, C., Kelly, K.J., Prezant, D.J., 2007. World Trade Center “sarcoid-like” granulomatous pulmonary disease in New York City Fire Department rescue workers. *Chest* 131, 1414–1423. <https://doi.org/10.1378/chest.06-2114>
- Jäkel, H., Weinl, C., Hengst, L., 2011. Phosphorylation of p27Kip1 by JAK2 directly links cytokine receptor signaling to cell cycle control. *Oncogene* 30, 3502–3512. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.68>
- James, C., Ugo, V., Le Couédic, J.-P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garçon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., Villeval, J.L., Constantinescu, S.N., Casadevall, N., Vainchenker, W., 2005a. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, 1144–1148. <https://doi.org/10.1038/nature03546>
- James, C., Ugo, V., Le Couédic, J.-P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garçon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., Villeval, J.L., Constantinescu, S.N., Casadevall, N., Vainchenker, W., 2005b. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, 1144–1148. <https://doi.org/10.1038/nature03546>
- James, W.E., Baughman, R., 2018. Treatment of sarcoidosis: grading the evidence. *Expert Rev Clin Pharmacol* 11, 677–687. <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1486706>
- Jamilloux, Y., Maucourt-Boulch, D., Kerever, S., Gerfaud-Valentin, M., Broussolle, C., Eb, M., Valeyre, D., Seve, P., 2016. Sarcoidosis-related mortality in France: a multiple-cause-of-death analysis. *European Respiratory Journal* 48, 1700–1709. <https://doi.org/10.1183/13993003.00457-2016>
- Jenab, S., Morris, P.L., 1998. Testicular leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor mediate phosphorylation of signal transducers and activators of transcription (STAT)-3 and STAT-1 and induce c-fos transcription and activator protein-1 activation in rat Sertoli but not germ cells. *Endocrinology* 139, 1883–1890. <https://doi.org/10.1210/endo.139.4.5871>
- Jeny, F., 2021. Effet de l’hypoxie sur le développement, la persistance et l’évolution fibrosante des granulomes pulmonaires (These de doctorat). Paris 13.
- Jeny, F., Bernaudin, J.-F., Valeyre, D., Kambouchner, M., Pretolani, M., Nunes, H., Planès, C., Besnard, V., 2021. Hypoxia Promotes a Mixed Inflammatory-Fibrotic Macrophages Phenotype in Active Sarcoidosis. *Front Immunol* 12, 719009. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.719009>
- Jiang, Y., Jiang, D., Costabel, U., Dai, H., Wang, C., 2022. A transcriptomics-based meta-analysis identifies a cross-tissue signature for sarcoidosis. *Front Med (Lausanne)* 9, 960266. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.960266>
- Johnson, H., Noon-Song, E., Dabelic, R., Ahmed, C., 2013. IFN Signaling: How a Non-Canonical Model Led to the Development of IFN Mimetics. *Frontiers in Immunology* 4.
- Johnson, H.M., Noon-Song, E., Ahmed, C.M., 2011. Controlling Nuclear Jaks and Stats for Specific Gene Activation by Ifn γ and Other Cytokines: A Possible Steroid-like Connection. *J Clin Cell Immunol* 2, 1000112. <https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000112>
- Judson, M.A., 2020. Environmental Risk Factors for Sarcoidosis. *Front Immunol* 11, 1340. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01340>
- Judson, M.A., 2015. The Clinical Features of Sarcoidosis: A Comprehensive Review. *Clinic Rev Allerg Immunol* 49, 63–78. <https://doi.org/10.1007/s12016-014-8450-y>

- Judson, M.A., 2008. The diagnosis of sarcoidosis. *Clin Chest Med* 29, 415–427, viii. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2008.03.009>
- Judson, M.A., Baughman, R.P., Costabel, U., Flavin, S., Lo, K.H., Kavuru, M.S., Drent, M., Centocor T48 Sarcoidosis Investigators, 2008. Efficacy of infliximab in extrapulmonary sarcoidosis: results from a randomised trial. *Eur Respir J* 31, 1189–1196. <https://doi.org/10.1183/09031936.00051907>
- Jung, M., Ma, Y., Iyer, R.P., DeLeon-Pennell, K.Y., Yabluchanskiy, A., Garrett, M.R., Lindsey, M.L., 2017. IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. *Basic Res Cardiol* 112, 33. <https://doi.org/10.1007/s00395-017-0622-5>
- Kaiser, Y., Lepzien, R., Kullberg, S., Eklund, A., Smed-Sörensen, A., Grunewald, J., 2016. Expanded lung T-bet+ROR γ T+ CD4+ T-cells in sarcoidosis patients with a favourable disease phenotype. *Eur Respir J* 48, 484–494. <https://doi.org/10.1183/13993003.00092-2016>
- Kambouchner, M., Pirici, D., Uhl, J.-F., Mogoanta, L., Valeyre, D., Bernaudin, J.-F., 2011. Lymphatic and blood microvasculature organisation in pulmonary sarcoid granulomas. *European Respiratory Journal* 37, 835–840. <https://doi.org/10.1183/09031936.00086410>
- Kamphuis, L.S., van Zelm, M.C., Lam, K.H., Rimmelzwaan, G.F., Baarsma, G.S., Dik, W.A., Thio, H.B., van Daele, P.L., van Velthoven, M.E., Batstra, M.R., van Hagen, P.M., van Laar, J.A., 2013. Perigranuloma Localization and Abnormal Maturation of B Cells. *Am J Respir Crit Care Med* 187, 406–416. <https://doi.org/10.1164/rccm.201206-1024OC>
- Kaplan, M.H., Schindler, U., Smiley, S.T., Grusby, M.J., 1996a. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 4, 313–319. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80439-2](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80439-2)
- Kaplan, M.H., Sun, Y.L., Hoey, T., Grusby, M.J., 1996b. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 382, 174–177. <https://doi.org/10.1038/382174a0>
- Karaghiosoff, M., Neubauer, H., Lassnig, C., Kovarik, P., Schindler, H., Pircher, H., McCoy, B., Bogdan, C., Decker, T., Brem, G., Pfeffer, K., Müller, M., 2000. Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice. *Immunity* 13, 549–560. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)00054-6](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)00054-6)
- Karakaya, B., van der Vis, J.J., Veltkamp, M., Biesma, D.H., Grutters, J.C., van Moorsel, C.H.M., 2022. ANXA11 rs1049550 Associates with Löfgren’s Syndrome and Chronic Sarcoidosis Patients. *Cells* 11, 1557. <https://doi.org/10.3390/cells11091557>
- Keijsers, R.G.M., Grutters, J.C., 2020. In Which Patients with Sarcoidosis Is FDG PET/CT Indicated? *J Clin Med* 9, 890. <https://doi.org/10.3390/jcm9030890>
- Kershaw, N.J., Murphy, J.M., Liao, N.P.D., Varghese, L.N., Laktyushin, A., Whitlock, E.L., Lucet, I.S., Nicola, N.A., Babon, J.J., 2013. SOCS3 binds specific receptor-JAK complexes to control cytokine signaling by direct kinase inhibition. *Nat Struct Mol Biol* 20, 469–476. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2519>
- Khadela, A., Chavda, V.P., Postwala, H., Shah, Y., Mistry, P., Apostolopoulos, V., 2022. Epigenetics in Tuberculosis: Immunomodulation of Host Immune Response. *Vaccines (Basel)* 10, 1740. <https://doi.org/10.3390/vaccines10101740>
- Kim, E., Kim, M., Woo, D.-H., Shin, Y., Shin, J., Chang, N., Oh, Y.T., Kim, H., Rhee, J., Nakano, I., Lee, C., Joo, K.M., Rich, J.N., Nam, D.-H., Lee, J., 2013. Phosphorylation of EZH2 activates STAT3

signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Cancer Cell* 23, 839–852. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.008>

Kim, H.J., Kim, H.M., Song, J.W., 2021. Clinical characteristics and outcomes of Korean patients with sarcoidosis. *Sci Rep* 11, 23700. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03175-1>

Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J., Schindler, C.W., 2002. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285, 1–24. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00398-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00398-0)

Kiuchi, N., Nakajima, K., Ichiba, M., Fukada, T., Narimatsu, M., Mizuno, K., Hibi, M., Hirano, T., 1999. STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J Exp Med* 189, 63–73. <https://doi.org/10.1084/jem.189.1.63>

Kodiha, M., Chu, A., Lazrak, O., Stochaj, U., 2005. Stress inhibits nucleocytoplasmic shuttling of heat shock protein hsc70. *Am J Physiol Cell Physiol* 289, C1034–1041. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00590.2004>

Kohlhuber, F., Rogers, N.C., Watling, D., Feng, J., Guschin, D., Briscoe, J., Witthuhn, B.A., Kotenko, S.V., Pestka, S., Stark, G.R., Ihle, J.N., Kerr, I.M., 1997. A JAK1/JAK2 chimera can sustain alpha and gamma interferon responses. *Mol Cell Biol* 17, 695–706. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.2.695>

Kortylewski, M., Kujawski, M., Wang, T., Wei, S., Zhang, S., Pilon-Thomas, S., Niu, G., Kay, H., Mulé, J., Kerr, W.G., Jove, R., Pardoll, D., Yu, H., 2005. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med* 11, 1314–1321. <https://doi.org/10.1038/nm1325>

Kosjerina, Z., Zaric, B., Vuckovic, D., Lalosevic, D., Djenadic, G., Murer, B., 2012. The sarcoid granuloma: ‘epithelioid’ or ‘lymphocytic-epithelioid’ granuloma? *Multidiscip Respir Med* 7, 11. <https://doi.org/10.1186/2049-6958-7-11>

Kostik, M.M., Raupov, R.K., Suspitsin, E.N., Isupova, E.A., Gaidar, E.V., Gabrusskaya, T.V., Kaneva, M.A., Snegireva, L.S., Likhacheva, T.S., Miulkidzhan, R.S., Kosmin, A.V., Tumakova, A.V., Masalova, V.V., Dubko, M.F., Kalashnikova, O.V., Aksentijevich, I., Chasnyk, V.G., 2022. The Safety and Efficacy of Tofacitinib in 24 Cases of Pediatric Rheumatic Diseases: Single Centre Experience. *Front Pediatr* 10, 820586. <https://doi.org/10.3389/fped.2022.820586>

Koth, L.L., Solberg, O.D., Peng, J.C., Bhakta, N.R., Nguyen, C.P., Woodruff, P.G., 2011. Sarcoidosis Blood Transcriptome Reflects Lung Inflammation and Overlaps with Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 184, 1153–1163. <https://doi.org/10.1164/rccm.201106-1143OC>

Kraaijvanger, R., Ambarus, C.A., Damen, J., van der Vis, J.J., Kazemier, K.M., Grutters, J.C., van Moorsel, C.H.M., Veltkamp, M., 2023. Simultaneous Assessment of mTORC1, JAK/STAT, and NLRP3 Inflammasome Activation Pathways in Patients with Sarcoidosis. *Int J Mol Sci* 24, 12792. <https://doi.org/10.3390/ijms241612792>

Kreins, A.Y., Ciancanelli, M.J., Okada, S., Kong, X.-F., Ramírez-Alejo, N., Kilic, S.S., El Baghdadi, J., Nonoyama, S., Mahdavian, S.A., Ailal, F., Bousfiha, A., Mansouri, D., Nievas, E., Ma, C.S., Rao, G., Bernasconi, A., Sun Kuehn, H., Niemela, J., Stoddard, J., Deveau, P., Cobat, A., El Azbaoui, S., Sabri, A., Lim, C.K., Sundin, M., Avery, D.T., Halwani, R., Grant, A.V., Boisson, B., Bogunovic, D., Itan, Y., Moncada-Velez, M., Martinez-Barricarte, R., Migaud, M., Deswarte, C., Alsina, L., Kotlarz, D., Klein, C., Muller-Fleckenstein, I., Fleckenstein, B., Cormier-Daire, V., Rose-John, S., Picard, C., Hammarstrom, L., Puel, A., Al-Muhsen, S., Abel, L., Chaussabel, D., Rosenzweig, S.D., Minegishi, Y., Tangye, S.G., Bustamante, J., Casanova, J.-L., Boisson-Dupuis, S., 2015. Human TYK2 deficiency: Mycobacterial and viral infections without hyper-IgE syndrome. *J Exp Med* 212, 1641–1662. <https://doi.org/10.1084/jem.20140280>

- Kruit, A., Grutters, J.C., Ruven, H.J.T., Moorsel, C.H.M. van, Weiskirchen, R., Mengsteab, S., Bosch, J.M.M. van den, 2006. Transforming Growth Factor- β Gene Polymorphisms in Sarcoidosis Patients With and Without Fibrosis. *CHEST* 129, 1584–1591. <https://doi.org/10.1378/chest.129.6.1584>
- Kucera, G.P., Rybicki, B.A., Kirkey, K.L., Coon, S.W., Major, M.L., Maliarik, M.J., Iannuzzi, M.C., 2003. Occupational risk factors for sarcoidosis in African-American siblings. *Chest* 123, 1527–1535. <https://doi.org/10.1378/chest.123.5.1527>
- Larsson, J., Graff, P., Bryngelsson, I.-L., Vihlborg, P., 2020. Sarcoidosis and increased risk of comorbidities and mortality in sweden. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 37, 104–135. <https://doi.org/10.36141/svdlid.v37i2.9142>
- Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., Shevach, E.M., O'shea, J.J., 2007. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26, 371–381. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.02.009>
- Lee, N.-S., Barber, L., Akula, S.M., Sigounas, G., Kataria, Y.P., Arce, S., 2011a. Disturbed homeostasis and multiple signaling defects in the peripheral blood B-cell compartment of patients with severe chronic sarcoidosis. *Clin Vaccine Immunol* 18, 1306–1316. <https://doi.org/10.1128/CVI.05118-11>
- Lee, N.-S., Barber, L., Kanchwala, A., Childs, C.J.H., Kataria, Y.P., Judson, M.A., Mazer, M.A., Arce, S., 2011b. Low Levels of NF- κ B/p65 Mark Anergic CD4⁺ T Cells and Correlate with Disease Severity in Sarcoidosis. *Clinical and Vaccine Immunology* 18, 223–234. <https://doi.org/10.1128/CVI.00469-10>
- Lee, S., Duhé, R.J., 2006. Kinase activity and subcellular distribution of a chimeric green fluorescent protein-tagged Janus kinase 2. *J Biomed Sci* 13, 773–786. <https://doi.org/10.1007/s11373-006-9111-9>
- Leonard, W.J., O'Shea, J.J., 1998. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 16, 293–322. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.293>
- Leslie, K., Lang, C., Devgan, G., Azare, J., Berishaj, M., Gerald, W., Kim, Y.B., Paz, K., Darnell, J.E., Albanese, C., Sakamaki, T., Pestell, R., Bromberg, J., 2006. Cyclin D1 is transcriptionally regulated by and required for transformation by activated signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Research* 66, 2544–2552. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2203>
- Levin, A.M., Adrianto, I., Datta, I., Iannuzzi, M.C., Trudeau, S., Li, J., Drake, W.P., Montgomery, C.G., Rybicki, B.A., 2015. Association of HLA-DRB1 with Sarcoidosis Susceptibility and Progression in African Americans. *Am J Respir Cell Mol Biol* 53, 206–216. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0227OC>
- Levrant, M., Martis, N., Viau, P., Suarez, F., Queyrel, V., 2019. Refractory sarcoidosis-like systemic granulomatosis responding to ruxolitinib. *Annals of the Rheumatic Diseases* 78, 1606–1607. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215387>
- Li, M., Wang, M., Wen, Y., Zhang, H., Zhao, G., Gao, Q., 2023. Signaling pathways in macrophages: molecular mechanisms and therapeutic targets. *MedComm* (2020) 4, e349. <https://doi.org/10.1002/mco2.349>
- Limper, A.H., Colby, T.V., Sanders, M.S., Asakura, S., Roche, P.C., DeRemee, R.A., 1994. Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1 in the nonnecrotizing granulomas of pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 149, 197–204. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.149.1.8111583>
- Lin, J.-X., Du, N., Li, P., Kazemian, M., Gebregiorgis, T., Spolski, R., Leonard, W.J., 2017. Critical functions for STAT5 tetramers in the maturation and survival of natural killer cells. *Nat Commun* 8, 1320. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01477-5>

- Lin, J.-X., Li, P., Liu, D., Jin, H.T., He, J., Ata Ur Rasheed, M., Rochman, Y., Wang, L., Cui, K., Liu, C., Kelsall, B.L., Ahmed, R., Leonard, W.J., 2012. Critical Role of STAT5 transcription factor tetramerization for cytokine responses and normal immune function. *Immunity* 36, 586–599. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.02.017>
- Lindquist, I., Rosenbaum, J., Friedman, M., 2023. Pos1566 Solving Sarcoidosis: A Transcriptome-Based Meta-Analysis of Clinical Sarcoidosis Studies Illustrates Shared Pathophysiology, Examines Mediators of Fibrosis, Identifies Candidate Biomarkers and Suggests a Therapeutic Mechanism of Jak Inhibition. *Annals of the Rheumatic Diseases* 82, 1158–1158. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2023-eular.5315>
- Linke, M., Pham, H.T.T., Katholnig, K., Schnöller, T., Miller, A., Demel, F., Schütz, B., Rosner, M., Kovacic, B., Sukhbaatar, N., Niederreiter, B., Blüml, S., Kuess, P., Sexl, V., Müller, M., Mikula, M., Weckwerth, W., Haschemi, A., Susani, M., Hengstschläger, M., Gambello, M.J., Weichhart, T., 2017. Chronic signaling via the metabolic checkpoint kinase mTORC1 induces macrophage granuloma formation and marks sarcoidosis progression. *Nat Immunol* 18, 293–302. <https://doi.org/10.1038/ni.3655>
- Lioy, P.J., Weisel, C.P., Millette, J.R., Eisenreich, S., Vallero, D., Offenberg, J., Buckley, B., Turpin, B., Zhong, M., Cohen, M.D., Prophete, C., Yang, I., Stiles, R., Chee, G., Johnson, W., Porcja, R., Alimokhtari, S., Hale, R.C., Weschler, C., Chen, L.C., 2002. Characterization of the dust/smoke aerosol that settled east of the World Trade Center (WTC) in lower Manhattan after the collapse of the WTC 11 September 2001. *Environ Health Perspect* 110, 703–714.
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S.A., Chung, C.D., Chang, D.D., Shuai, K., 1998. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10626–10631. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10626>
- Liu, F., Zhao, X., Perna, F., Wang, L., Koppikar, P., Abdel-Wahab, O., Harr, M.W., Levine, R.L., Xu, H., Tefferi, A., Deblasio, A., Hatlen, M., Menendez, S., Nimer, S.D., 2011. JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5 down-regulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation. *Cancer Cell* 19, 283–294. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.12.020>
- Liu, K.D., Gaffen, S.L., Goldsmith, M.A., 1998. JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Current Opinion in Immunology* 10, 271–278. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(98\)80165-9](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80165-9)
- Liu, X., Robinson, G.W., Wagner, K.U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A., Hennighausen, L., 1997. Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev* 11, 179–186. <https://doi.org/10.1101/gad.11.2.179>
- Liu, Y., Aryee, M.J., Padyukov, L., Fallin, M.D., Hesselberg, E., Runarsson, A., Reinius, L., Acevedo, N., Taub, M., Ronninger, M., Shchetynsky, K., Scheynius, A., Kere, J., Alfredsson, L., Klareskog, L., Ekström, T.J., Feinberg, A.P., 2013. Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis. *Nat Biotechnol* 31, 142–147. <https://doi.org/10.1038/nbt.2487>
- Liu, Y., Qiu, L., Wang, Y., Aimurolo, H., Zhao, Y., Li, S., Xu, Z., 2016. The Circulating Treg/Th17 Cell Ratio Is Correlated with Relapse and Treatment Response in Pulmonary Sarcoidosis Patients after Corticosteroid Withdrawal. *PLOS ONE* 11, e0148207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148207>
- Lobie, P.E., Ronsin, B., Silvennoinen, O., Haldosén, L.A., Norstedt, G., Morel, G., 1996. Constitutive nuclear localization of Janus kinases 1 and 2. *Endocrinology* 137, 4037–4045. <https://doi.org/10.1210/endo.137.9.8756581>

- Lobie, P.E., Wood, T.J., Chen, C.M., Waters, M.J., Norstedt, G., 1994. Nuclear translocation and anchorage of the growth hormone receptor. *J Biol Chem* 269, 31735–31746.
- Locke, L.W., Crouser, E.D., White, P., Julian, M.W., Caceres, E.G., Papp, A.C., Le, V.T., Sadee, W., Schlesinger, L.S., 2019. IL-13-regulated Macrophage Polarization during Granuloma Formation in an In Vitro Human Sarcoidosis Model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 60, 84–95. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0053OC>
- LöFGREN, S., Lundbäck, H., 1952. The Bilateral Hilar Lymphoma Syndrome. *Acta Medica Scandinavica* 142, 265–273. <https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1952.tb13865.x>
- Love, C., Tomas, M.B., Tronco, G.G., Palestro, C.J., 2005. FDG PET of Infection and Inflammation. *RadioGraphics* 25, 1357–1368. <https://doi.org/10.1148/rg.255045122>
- Lower, E., Sturdivant, M., Baughman, R.P., 2019. Presence of onconeural antibodies in sarcoidosis patients with parasarcoidosis syndrome. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 36, 254–260. <https://doi.org/10.36141/svldd.v36i4.8745>
- Luo, H., Rose, P., Barber, D., Hanratty, W.P., Lee, S., Roberts, T.M., D’Andrea, A.D., Dearolf, C.R., 1997. Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates Drosophila and mammalian Jak-Stat pathways. *Mol Cell Biol* 17, 1562–1571. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.3.1562>
- Ma, D., Huang, H., Huang, Z., 2010. STAT1 signaling is required for optimal Th1 cell differentiation in mice. *Chin. Sci. Bull.* 55, 1032–1040. <https://doi.org/10.1007/s11434-010-0030-9>
- Macchi, P., Villa, A., Giliani, S., Sacco, M.G., Frattini, A., Porta, F., Ugazio, A.G., Johnston, J.A., Candotti, F., O’Shea, J.J., 1995. Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). *Nature* 377, 65–68. <https://doi.org/10.1038/377065a0>
- Mañá, J., Rubio-Rivas, M., Villalba, N., Marcoval, J., Iriarte, A., Molina-Molina, M., Llatjos, R., García, O., Martínez-Yélamos, S., Vicens-Zygmunt, V., Gámez, C., Pujol, R., Corbella, X., 2017. Multidisciplinary approach and long-term follow-up in a series of 640 consecutive patients with sarcoidosis: Cohort study of a 40-year clinical experience at a tertiary referral center in Barcelona, Spain. *Medicine (Baltimore)* 96, e7595. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000007595>
- Mañá, J., Salazar, A., Manresa, F., 1994. Clinical factors predicting persistence of activity in sarcoidosis: a multivariate analysis of 193 cases. *Respiration* 61, 219–225. <https://doi.org/10.1159/000196341>
- Mangas, C., Fernández-Figueras, M.-T., Fité, E., Fernández-Chico, N., Sàbat, M., Ferrándiz, C., 2006. Clinical spectrum and histological analysis of 32 cases of specific cutaneous sarcoidosis. *J Cutan Pathol* 33, 772–777. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.2006.00563.x>
- Marrero, M.B., Schieffer, B., Paxton, W.G., Heerdt, L., Berk, B.C., Delafontaine, P., Bernstein, K.E., 1995. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* 375, 247–250. <https://doi.org/10.1038/375247a0>
- Marshall, B.G., Wangoo, A., Cook, H.T., Shaw, R.J., 1996. Increased inflammatory cytokines and new collagen formation in cutaneous tuberculosis and sarcoidosis. *Thorax* 51, 1253–1261. <https://doi.org/10.1136/thx.51.12.1253>
- Mascarenhas, J., Hoffman, R., 2012. Ruxolitinib: the first FDA approved therapy for the treatment of myelofibrosis. *Clin Cancer Res* 18, 3008–3014. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3145>
- Mazurkiewicz-Munoz, A.M., Argetsinger, L.S., Kouadio, J.-L.K., Stensballe, A., Jensen, O.N., Cline, J.M., Carter-Su, C., 2006. Phosphorylation of JAK2 at serine 523: a negative regulator of JAK2 that is stimulated by growth hormone and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 26, 4052–4062. <https://doi.org/10.1128/MCB.01591-05>

- Meissner, T., Krause, E., Lödige, I., Vinkemeier, U., 2004. Arginine methylation of STAT1: a reassessment. *Cell* 119, 587–589; discussion 589-590. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.024>
- Milara, J., Hernandez, G., Ballester, B., Morell, A., Roger, I., Montero, P., Escrivá, J., Lloris, J.M., Molina-Molina, M., Morcillo, E., Cortijo, J., 2018. The JAK2 pathway is activated in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* 19, 24. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0728-9>
- Minegishi, Y., Saito, M., Morio, T., Watanabe, K., Agematsu, K., Tsuchiya, S., Takada, H., Hara, T., Kawamura, N., Ariga, T., Kaneko, H., Kondo, N., Tsuge, I., Yachie, A., Sakiyama, Y., Iwata, T., Bessho, F., Ohishi, T., Joh, K., Imai, K., Kogawa, K., Shinohara, M., Fujieda, M., Wakiguchi, H., Pasic, S., Abinun, M., Ochs, H.D., Renner, E.D., Jansson, A., Belohradsky, B.H., Metin, A., Shimizu, N., Mizutani, S., Miyawaki, T., Nonoyama, S., Karasuyama, H., 2006. Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity. *Immunity* 25, 745–755. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.09.009>
- Miotto, D., Christodoulopoulos, P., Olivenstein, R., Taha, R., Cameron, L., Tscicopoulos, A., Tonnel, A.B., Fahy, O., Lafitte, J.J., Luster, A.D., Wallaert, B., Mapp, C.E., Hamid, Q., 2001. Expression of IFN-gamma-inducible protein; monocyte chemotactic proteins 1, 3, and 4; and eotaxin in TH1- and TH2-mediated lung diseases. *J Allergy Clin Immunol* 107, 664–670. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.113524>
- Miyagi, T., Gil, M.P., Wang, X., Louten, J., Chu, W.-M., Biron, C.A., 2007. High basal STAT4 balanced by STAT1 induction to control type 1 interferon effects in natural killer cells. *J Exp Med* 204, 2383–2396. <https://doi.org/10.1084/jem.20070401>
- Miyara, M., Amoura, Z., Parizot, C., Badoual, C., Dorgham, K., Trad, S., Kambouchner, M., Valeyre, D., Chapelon-Abriç, C., Debré, P., Piette, J.-C., Goroçhov, G., 2006. The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells. *J Exp Med* 203, 359–370. <https://doi.org/10.1084/jem.20050648>
- Mohanakrishnan, R., Beier, S., Deodhar, A., 2022. Tofacitinib for the treatment of active ankylosing spondylitis in adults. *Expert Rev Clin Immunol* 18, 273–280. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2022.2038134>
- Moller, D.R., Forman, J.D., Liu, M.C., Noble, P.W., Greenlee, B.M., Vyas, P., Holden, D.A., Forrester, J.M., Lazarus, A., Wsocka, M., Trinchieri, G., Karp, C., 1996. Enhanced expression of IL-12 associated with Th1 cytokine profiles in active pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* 156, 4952–4960.
- Morris, R., Kershaw, N.J., Babon, J.J., 2018. The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway. *Protein Sci* 27, 1984–2009. <https://doi.org/10.1002/pro.3519>
- Morse, S.I., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Schaefer, R.W., 1961. The treatment of sarcoidosis with chloroquine. *Am J Med* 30, 779–784. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(61\)90213-3](https://doi.org/10.1016/0002-9343(61)90213-3)
- Moulin, S., Bouzinba-Segard, H., Kelly, P.A., Finidori, J., 2003. Subcellular trafficking of growth hormone receptor and Jak2 under ligand exposure. *Horm Metab Res* 35, 396–401. <https://doi.org/10.1055/s-2003-41619>
- Mui, A.L., Wakao, H., O'Farrell, A.M., Harada, N., Miyajima, A., 1995. Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs. *EMBO J* 14, 1166–1175. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07100.x>
- Murray, P.J., 2007. The JAK-STAT Signaling Pathway: Input and Output Integration. *J Immunol* 178, 2623–2629. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.2623>

- Myatt, N., Coghill, G., Morrison, K., Jones, D., Cree, I.A., 1994. Detection of tumour necrosis factor alpha in sarcoidosis and tuberculosis granulomas using in situ hybridisation. *J Clin Pathol* 47, 423–426. <https://doi.org/10.1136/jcp.47.5.423>
- Nagai, S., Shigematsu, M., Hamada, K., Izumi, T., 1999. Clinical courses and prognoses of pulmonary sarcoidosis. *Curr Opin Pulm Med* 5, 293–298. <https://doi.org/10.1097/00063198-199909000-00005>
- Nakajima, H., Brindle, P.K., Handa, M., Ihle, J.N., 2001. Functional interaction of STAT5 and nuclear receptor co-repressor SMRT: implications in negative regulation of STAT5-dependent transcription. *EMBO J* 20, 6836–6844. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.23.6836>
- Nathan, N., Montagne, M.-E., Macchi, O., Rosental, P.-A., Chauveau, S., Jeny, F., Sesé, L., Taam, R.A., Brocvielle, M., Brouard, J., Catinon, M., Chapelon-Abric, C., Cohen-Aubart, F., Delacourt, C., Delestrain, C., Deschildre, A., Dossier, A., Epaud, R., Haroche, J., Houdouin, V., Israel-Biet, D., Juvin, K., Jeune, S.L., Lionnet, F., Meinzer, U., Mittaine, M., Nunes, H., Mattioni, S., Naccache, J.-M., Odièvre, M.-H., Vincent, M., Clement, A., Valeyre, D., Cavalin, C., 2022. Exposure to inorganic particles in paediatric sarcoidosis: the PEDIASARC study. *Thorax* 77, 404–407. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2021-217870>
- Neel, B.G., Gu, H., Pao, L., 2003. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci* 28, 284–293. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00091-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00091-4)
- Neubauer, H., Cumano, A., Müller, M., Wu, H., Huffstadt, U., Pfeffer, K., 1998. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 93, 397–409. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81168-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81168-x)
- Neville, E., Walker, A.N., James, D.G., 1983. Prognostic factors predicting the outcome of sarcoidosis: an analysis of 818 patients. *Q J Med* 52, 525–533.
- Newman, L.S., Rose, C.S., Bresnitz, E.A., Rossman, M.D., Barnard, J., Frederick, M., Terrin, M.L., Weinberger, S.E., Moller, D.R., McLennan, G., Hunninghake, G., DePalo, L., Baughman, R.P., Iannuzzi, M.C., Judson, M.A., Knatterud, G.L., Thompson, B.W., Teirstein, A.S., Yeager, H., Johns, C.J., Rabin, D.L., Rybicki, B.A., Cherniack, R., ACCESS Research Group, 2004. A case control etiologic study of sarcoidosis: environmental and occupational risk factors. *Am J Respir Crit Care Med* 170, 1324–1330. <https://doi.org/10.1164/rccm.200402-249OC>
- Nguyen, C.T.H., Kambe, N., Ueda-Hayakawa, I., Kishimoto, I., Ly, N.T.M., Mizuno, K., Okamoto, H., 2018. TARC expression in the circulation and cutaneous granulomas correlates with disease severity and indicates Th2-mediated progression in patients with sarcoidosis. *Allergol Int* 67, 487–495. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2018.02.011>
- Nilsson, J., Bjursell, G., Kannius-Janson, M., 2006. Nuclear Jak2 and Transcription Factor NF1-C2: a Novel Mechanism of Prolactin Signaling in Mammary Epithelial Cells. *Mol Cell Biol* 26, 5663–5674. <https://doi.org/10.1128/MCB.02095-05>
- Nishioka, Y., Manabe, K., Kishi, J., Wang, W., Inayama, M., Azuma, M., Sone, S., 2007. CXCL9 and 11 in patients with pulmonary sarcoidosis: a role of alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol* 149, 317–326. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03423.x>
- Noji, S., Hara, Y., Miura, T., Yamanaka, H., Maeda, K., Hori, A., Yamamoto, H., Obika, S., Inoue, M., Hase, Y., Orita, T., Doi, S., Adachi, T., Tanimoto, A., Oki, C., Kimoto, Y., Ogawa, Y., Negoro, T., Hashimoto, H., Shiozaki, M., 2020. Discovery of a Janus Kinase Inhibitor Bearing a Highly Three-Dimensional Spiro Scaffold: JTE-052 (Delgocitinib) as a New Dermatological Agent to Treat Inflammatory Skin Disorders. *J Med Chem* 63, 7163–7185. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00450>

- Notarangelo, L.D., Giliani, S., Mazza, C., Mella, P., Savoldi, G., Rodriguez-Pérez, C., Mazzolari, E., Fiorini, M., Duse, M., Plebani, A., Ugazio, A.G., Vihinen, M., Candotti, F., Schumacher, R.F., 2000. Of genes and phenotypes: the immunological and molecular spectrum of combined immune deficiency. Defects of the gamma(c)-JAK3 signaling pathway as a model. *Immunol Rev* 178, 39–48. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065x.2000.17812.x>
- Oberstein, A., von Zitzewitz, H., Schweden, F., Müller-Quernheim, J., 1997. Non invasive evaluation of the inflammatory activity in sarcoidosis with high-resolution computed tomography. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 14, 65–72.
- Okumura, F., Joo-Okumura, A., Nakatsukasa, K., Kamura, T., 2016. The role of cullin 5-containing ubiquitin ligases. *Cell Div* 11, 1. <https://doi.org/10.1186/s13008-016-0016-3>
- Olayioye, M.A., Beuvink, I., Horsch, K., Daly, J.M., Hynes, N.E., 1999. ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 274, 17209–17218. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.17209>
- Oltmanns, U., Schmidt, B., Hoernig, S., Witt, C., John, M., 2003. Increased Spontaneous Interleukin-10 Release from Alveolar Macrophages in Active Pulmonary Sarcoidosis. *Experimental Lung Research* 29, 315–328. <https://doi.org/10.1080/01902140303786>
- O’Shea, J.J., Husa, M., Li, D., Hofmann, S.R., Watford, W., Roberts, J.L., Buckley, R.H., Changelian, P., Candotti, F., 2004. Jak3 and the pathogenesis of severe combined immunodeficiency. *Mol Immunol* 41, 727–737. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.04.014>
- O’Shea, J.J., Kanno, Y., Chen, X., Levy, D.E., 2005. Cell signaling. Stat acetylation—a key facet of cytokine signaling? *Science* 307, 217–218. <https://doi.org/10.1126/science.1108164>
- O’Shea, J.J., Murray, P.J., 2008. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 28, 477–487. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.002>
- O’Shea, J.J., Plenge, R., 2012. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity* 36, 542–550. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.014>
- Ostadkarampour, M., Eklund, A., Moller, D., Glader, P., Olgart Höglund, C., Lindén, A., Grunewald, J., Wahlström, J., 2014. Higher levels of interleukin IL-17 and antigen-specific IL-17 responses in pulmonary sarcoidosis patients with Löfgren’s syndrome. *Clin Exp Immunol* 178, 342–352. <https://doi.org/10.1111/cei.12403>
- Oswald-Richter, K.A., Richmond, B.W., Braun, N.A., Isom, J., Abraham, S., Taylor, T.R., Drake, J.M., Culver, D.A., Wilkes, D.S., Drake, W.P., 2013. Reversal of global CD4+ subset dysfunction is associated with spontaneous clinical resolution of pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* 190, 5446–5453. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202891>
- Owen, K.L., Brockwell, N.K., Parker, B.S., 2019. JAK-STAT Signaling: A Double-Edged Sword of Immune Regulation and Cancer Progression. *Cancers (Basel)* 11, 2002. <https://doi.org/10.3390/cancers11122002>
- Pabst, S., Baumgarten, G., Stremmel, A., Lennarz, M., Knüfermann, P., Gillissen, A., Vetter, H., Grohé, C., 2006. Toll-like receptor (TLR) 4 polymorphisms are associated with a chronic course of sarcoidosis. *Clinical and Experimental Immunology* 143, 420–426. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03008.x>
- Pabst, S., Fränken, T., Schönau, J., Stier, S., Nickenig, G., Meyer, R., Skowasch, D., Grohé, C., 2011. Transforming growth factor- β gene polymorphisms in different phenotypes of sarcoidosis. *European Respiratory Journal* 38, 169–175. <https://doi.org/10.1183/09031936.00120410>

- Pagán, A.J., Ramakrishnan, L., 2018. The Formation and Function of Granulomas. *Annual Review of Immunology* 36, 639–665. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100022>
- Palmroth, M., Kuuliala, K., Peltomaa, R., Virtanen, A., Kuuliala, A., Kurttila, A., Kinnunen, A., Leirisalo-Repo, M., Silvennoinen, O., Isomäki, P., 2021. Tofacitinib Suppresses Several JAK-STAT Pathways in Rheumatoid Arthritis In Vivo and Baseline Signaling Profile Associates With Treatment Response. *Front Immunol* 12, 738481. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.738481>
- Park, C., Li, S., Cha, E., Schindler, C., 2000. Immune response in Stat2 knockout mice. *Immunity* 13, 795–804. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)00077-7](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)00077-7)
- Park, S.Y., Saijo, K., Takahashi, T., Osawa, M., Arase, H., Hirayama, N., Miyake, K., Nakauchi, H., Shirasawa, T., Saito, T., 1995. Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. *Immunity* 3, 771–782. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90066-7](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90066-7)
- Paul, W.E., 2010. What determines Th2 differentiation, in vitro and in vivo? *Immunol Cell Biol* 88, 236–239. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.2>
- Paulson, M., Press, C., Smith, E., Tanese, N., Levy, D.E., 2002. IFN-Stimulated transcription through a TBP-free acetyltransferase complex escapes viral shutoff. *Nat Cell Biol* 4, 140–147. <https://doi.org/10.1038/ncb747>
- Pechkovsky, D.V., Prasse, A., Kollert, F., Engel, K.M.Y., Dentler, J., Luttmann, W., Friedrich, K., Müller-Quernheim, J., Zissel, G., 2010. Alternatively activated alveolar macrophages in pulmonary fibrosis-mediator production and intracellular signal transduction. *Clin Immunol* 137, 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.06.017>
- Pellegrini, S., John, J., Shearer, M., Kerr, I.M., Stark, G.R., 1989. Use of a selectable marker regulated by alpha interferon to obtain mutations in the signaling pathway. *Mol Cell Biol* 9, 4605–4612.
- Pericle, F., Kirken, R.A., Bronte, V., Sconocchia, G., DaSilva, L., Segal, D.M., 1997. Immunocompromised tumor-bearing mice show a selective loss of STAT5a/b expression in T and B lymphocytes. *J Immunol* 159, 2580–2585.
- Petrek, M., Kolek, V., Sztokowska, J., Bois, R.M. du, 2002. CC and C chemokine expression in pulmonary sarcoidosis. *European Respiratory Journal* 20, 1206–1212. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00289902>
- Piekarski, E., Benali, K., Rouzet, F., 2018. Nuclear Imaging in Sarcoidosis. *Semin Nucl Med* 48, 246–260. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2018.02.005>
- Pietinalho, A., Hiraga, Y., Hosoda, Y., Löfroos, A.B., Yamaguchi, M., Selroos, O., 1995. The frequency of sarcoidosis in Finland and Hokkaido, Japan. A comparative epidemiological study. *Sarcoidosis* 12, 61–67.
- Pizzini, A., Bacher, H., Aichner, M., Franchi, A., Watzinger, K., Tancevski, I., Sonnweber, T., Mosheimer-Feistritz, B., Duftner, C., Zelger, Bettina, Pallua, J., Sprung, S., Weichhart, T., Zelger, Bernhard, Weiss, G., Löffler-Ragg, J., 2021. High expression of mTOR signaling in granulomatous lesions is not predictive for the clinical course of sarcoidosis. *Respir Med* 177, 106294. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.106294>
- Platanias, L.C., 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5, 375–386. <https://doi.org/10.1038/nri1604>
- Poehlmann, T.G., Fitzgerald, J.S., Meissner, A., Wengenmayer, T., Schleussner, E., Friedrich, K., Markert, U.R., 2005. Trophoblast invasion: tuning through LIF, signalling via Stat3. *Placenta* 26 Suppl A, S37–41. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.01.007>

- Popević, S., Šumarac, Z., Jovanović, D., Babić, D., Stjepanović, M., Jovičić, S., Šobić-Šaranović, D., Filipović, S., Gvozdrenović, B., Omčikus, M., Milovanović, A., Videnović-Ivanov, J., Radović, A., Žugić, V., Mihailović-Vučinić, V., 2016. Verifying Sarcoidosis Activity: Chitotriosidase versus ACE in Sarcoidosis – a Case-control Study. *J Med Biochem* 35, 390–400. <https://doi.org/10.1515/jomb-2016-0017>
- Prasse, A., Pechkovsky, D.V., Toews, G.B., Jungraithmayr, W., Kollert, F., Goldmann, T., Vollmer, E., Müller-Quernheim, J., Zissel, G., 2006. A Vicious Circle of Alveolar Macrophages and Fibroblasts Perpetuates Pulmonary Fibrosis via CCL18. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 781–792. <https://doi.org/10.1164/rccm.200509-1518OC>
- Quintás-Cardama, A., Vaddi, K., Liu, P., Manshour, T., Li, J., Scherle, P.A., Caulder, E., Wen, X., Li, Y., Waeltz, P., Rupal, M., Burn, T., Lo, Y., Kelley, J., Covington, M., Shepard, S., Rodgers, J.D., Haley, P., Kantarjian, H., Fridman, J.S., Verstovsek, S., 2010. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 115, 3109–3117. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-214957>
- Raedler, L.A., 2015. Jakafi (Ruxolitinib): First FDA-Approved Medication for the Treatment of Patients with Polycythemia Vera. *Am Health Drug Benefits* 8, 75–79.
- Ragimbeau, J., Dondi, E., Vasserot, A., Romero, P., Uzé, G., Pellegrini, S., 2001. The receptor interaction region of Tyk2 contains a motif required for its nuclear localization. *J Biol Chem* 276, 30812–30818. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103559200>
- Rahaghi, F.F., Baughman, R.P., Saketkoo, L.A., Sweiss, N.J., Barney, J.B., Birring, S.S., Costabel, U., Crouser, E.D., Drent, M., Gerke, A.K., Grutters, J.C., Hamzeh, N.Y., Huizar, I., Ennis James, W., Kalra, S., Kullberg, S., Li, H., Lower, E.E., Maier, L.A., Mirsaeidi, M., Müller-Quernheim, J., Carmona Porquera, E.M., Samavati, L., Valeyre, D., Scholand, M.B., 2020. Delphi consensus recommendations for a treatment algorithm in pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir Rev* 29, 190146. <https://doi.org/10.1183/16000617.0146-2019>
- Ram, P.A., Waxman, D.J., 1997. Interaction of growth hormone-activated STATs with SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1 and nuclear JAK2 tyrosine kinase. *J Biol Chem* 272, 17694–17702. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17694>
- Ramstein, J., Broos, C.E., Simpson, L.J., Ansel, K.M., Sun, S.A., Ho, M.E., Woodruff, P.G., Bhakta, N.R., Christian, L., Nguyen, C.P., Antalek, B.J., Benn, B.S., Hendriks, R.W., van den Blink, B., Kool, M., Koth, L.L., 2016. IFN- γ -Producing T-Helper 17.1 Cells Are Increased in Sarcoidosis and Are More Prevalent than T-Helper Type 1 Cells. *Am J Respir Crit Care Med* 193, 1281–1291. <https://doi.org/10.1164/rccm.201507-1499OC>
- Rappl, G., Pabst, S., Riemann, D., Schmidt, A., Wickenhauser, C., Schütte, W., Hombach, A.A., Seliger, B., Grohé, C., Abken, H., 2011. Regulatory T cells with reduced repressor capacities are extensively amplified in pulmonary sarcoid lesions and sustain granuloma formation. *Clin Immunol* 140, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2011.03.015>
- Refaeli, Y., Van Parijs, L., London, C.A., Tschopp, J., Abbas, A.K., 1998. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity* 8, 615–623. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80566-x](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80566-x)
- Ren, Y., Zhang, Y., Liu, R.Z., Fenstermacher, D.A., Wright, K.L., Teer, J.K., Wu, J., 2013. JAK1 truncating mutations in gynecologic cancer define new role of cancer-associated protein tyrosine kinase aberrations. *Sci Rep* 3, 3042. <https://doi.org/10.1038/srep03042>

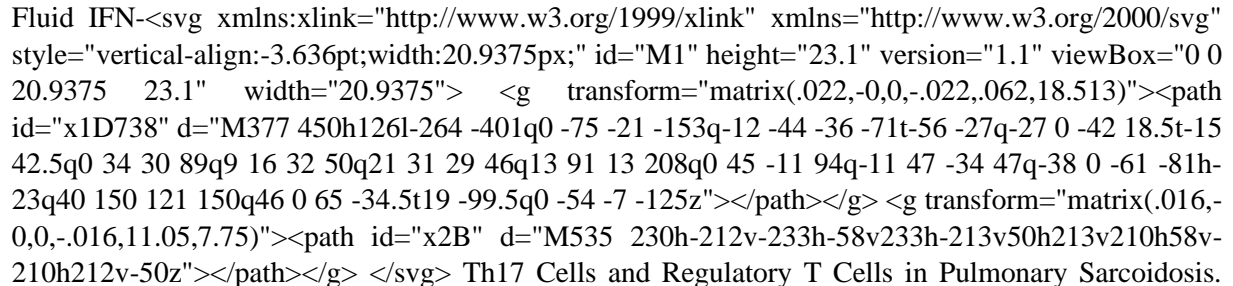
- Richmond, B.W., Ploetze, K., Isom, J., Chambers-Harris, I., Braun, N.A., Taylor, T., Abraham, S., Mageto, Y., Culver, D.A., Oswald-Richter, K.A., Drake, W.P., 2013. Sarcoidosis Th17 cells are ESAT-6 antigen specific but demonstrate reduced IFN- γ expression. *J Clin Immunol* 33, 446–455. <https://doi.org/10.1007/s10875-012-9817-6>
- Rinaldi, C.R., Rinaldi, P., Alagia, A., Gemei, M., Esposito, N., Formiggini, F., Martinelli, V., Senyuk, V., Nucifora, G., Pane, F., 2010. Preferential nuclear accumulation of JAK2V617F in CD34+ but not in granulocytic, megakaryocytic, or erythroid cells of patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasia. *Blood* 116, 6023–6026. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-302265>
- Ringkowski, S., Thomas, P.S., Herbert, C., 2014. Interleukin-12 family cytokines and sarcoidosis. *Frontiers in Pharmacology* 5.
- Rodig, S.J., Meraz, M.A., White, J.M., Lampe, P.A., Riley, J.K., Arthur, C.D., King, K.L., Sheehan, K.C., Yin, L., Pennica, D., Johnson, E.M., Schreiber, R.D., 1998. Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* 93, 373–383. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81166-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81166-6)
- Rogers, F.J., Haserick, J.R., 1954. Sarcoidosis and the Kveim Reaction1. *Journal of Investigative Dermatology* 23, 389–406. <https://doi.org/10.1038/jid.1954.121>
- Rogers, R.S., Horvath, C.M., Matunis, M.J., 2003. SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation. *J Biol Chem* 278, 30091–30097. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301344200>
- Rosenbaum, J.T., Pasadhika, S., Crouser, E.D., Choi, D., Harrington, C.A., Lewis, J.A., Austin, C.R., Diebel, T.N., Vance, E.E., Braziel, R.M., Smith, J.R., Planck, S.R., 2009. Hypothesis: Sarcoidosis is a STAT1-mediated disease. *Clin Immunol* 132, 174–183. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2009.04.010>
- Rossi, G., Cavazza, A., Colby, T.V., 2015. Pathology of Sarcoidosis. *Clin Rev Allergy Immunol* 49, 36–44. <https://doi.org/10.1007/s12016-015-8479-6>
- Rossides, M., Grunewald, J., Eklund, A., Kullberg, S., Di Giuseppe, D., Askling, J., Arkema, E.V., 2018a. Familial aggregation and heritability of sarcoidosis: a Swedish nested case-control study. *Eur Respir J* 52, 1800385. <https://doi.org/10.1183/13993003.00385-2018>
- Rossides, M., Kullberg, S., Askling, J., Eklund, A., Grunewald, J., Arkema, E.V., 2018b. Sarcoidosis mortality in Sweden: a population-based cohort study. *European Respiratory Journal* 51. <https://doi.org/10.1183/13993003.01815-2017>
- Rossides, M., Kullberg, S., Eklund, A., Di Giuseppe, D., Grunewald, J., Askling, J., Arkema, E.V., 2020. Risk of first and recurrent serious infection in sarcoidosis: a Swedish register-based cohort study. *Eur Respir J* 56, 2000767. <https://doi.org/10.1183/13993003.00767-2020>
- Rossman, M.D., Thompson, B., Frederick, M., Maliarik, M., Iannuzzi, M.C., Rybicki, B.A., Pandey, J.P., Newman, L.S., Magira, E., Beznik-Cizman, B., Monos, D., ACCESS Group, 2003. HLA-DRB1*1101: a significant risk factor for sarcoidosis in blacks and whites. *Am J Hum Genet* 73, 720–735. <https://doi.org/10.1086/378097>
- Rotenberg, C., Besnard, V., Brillet, P.-Y., Giraudier, S., Nunes, H., Valeyre, D., 2018. Dramatic response of refractory sarcoidosis under ruxolitinib in a patient with associated JAK2-mutated polycythemia. *Eur Respir J* 52, 1801482. <https://doi.org/10.1183/13993003.01482-2018>
- Rubin, L.A., Nelson, D.L., 1990. The soluble interleukin-2 receptor: biology, function, and clinical application. *Ann Intern Med* 113, 619–627. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-113-8-619>

- Rui, L., Drennan, A.C., Ceribelli, M., Zhu, F., Wright, G.W., Huang, D.W., Xiao, W., Li, Y., Grindle, K.M., Lu, L., Hodson, D.J., Shaffer, A.L., Zhao, H., Xu, W., Yang, Y., Staudt, L.M., 2016. Epigenetic gene regulation by Janus kinase 1 in diffuse large B-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, E7260–E7267. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610970113>
- Rybicki, B.A., Iannuzzi, M.C., Frederick, M.M., Thompson, B.W., Rossman, M.D., Bresnitz, E.A., Terrin, M.L., Moller, D.R., Barnard, J., Baughman, R.P., DePALO, L., Hunninghake, G., Johns, C., Judson, M.A., Knatterud, G.L., McLENNAN, G., Newman, L.S., Rabin, D.L., Rose, C., Teirstein, A.S., Weinberger, S.E., Yeager, H., Cherniack, R., 2001. Familial Aggregation of Sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 2085–2091. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.11.2106001>
- Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F., Grosschedl, R., 2001. PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* 15, 3088–3103. <https://doi.org/10.1101/gad.944801>
- Saidenberg-Kermanac'h, N., Semerano, L., Nunes, H., Sadoun, D., Guillot, X., Boubaya, M., Naggara, N., Valeyre, D., Boissier, M.-C., 2014. Bone fragility in sarcoidosis and relationships with calcium metabolism disorders: a cross sectional study on 142 patients. *Arthritis Res Ther* 16, R78. <https://doi.org/10.1186/ar4519>
- Saijo, K., Park, S.Y., Ishida, Y., Arase, H., Saito, T., 1997. Crucial role of Jak3 in negative selection of self-reactive T cells. *J Exp Med* 185, 351–356. <https://doi.org/10.1084/jem.185.2.351>
- Sakamoto, H., Kinjyo, I., Yoshimura, A., 2000. The janus kinase inhibitor, Jab/SOCS-1, is an interferon-gamma inducible gene and determines the sensitivity to interferons. *Leuk Lymphoma* 38, 49–58. <https://doi.org/10.3109/10428190009060318>
- Sakthivel, P., Bruder, D., 2017. Mechanism of granuloma formation in sarcoidosis. *Curr Opin Hematol* 24, 59–65. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000301>
- Sakthivel, P., Grunewald, J., Eklund, A., Bruder, D., Wahlström, J., 2016. Pulmonary sarcoidosis is associated with high-level inducible co-stimulator (ICOS) expression on lung regulatory T cells – possible implications for the ICOS/ICOS-ligand axis in disease course and resolution. *Clinical and Experimental Immunology* 183, 294–306. <https://doi.org/10.1111/cei.12715>
- Sarapultsev, A., Gusev, E., Komelkova, M., Utepova, I., Luo, S., Hu, D., 2023. JAK-STAT signaling in inflammation and stress-related diseases: implications for therapeutic interventions. *Mol Biomed* 4, 1–30. <https://doi.org/10.1186/s43556-023-00151-1>
- Sarkar, S., Pollack, B.P., Lin, K.T., Kotenko, S.V., Cook, J.R., Lewis, A., Pestka, S., 2001. hTid-1, a human DnaJ protein, modulates the interferon signaling pathway. *J Biol Chem* 276, 49034–49042. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103683200>
- Sasaki, K., Zhao, X., Pardee, A.D., Ueda, R., Fujita, M., Sehra, S., Kaplan, M.H., Kane, L.P., Okada, H., Storkus, W.J., 2008. Stat6 signaling suppresses VLA-4 expression by CD8+ T cells and limits their ability to infiltrate tumor lesions in vivo. *J Immunol* 181, 104–108. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.1.104>
- Sato, H., Woodhead, F.A., Ahmad, T., Grutters, J.C., Spagnolo, P., van den Bosch, J.M.M., Maier, L.A., Newman, L.S., Nagai, S., Izumi, T., Wells, A.U., du Bois, R.M., Welsh, K.I., 2010. Sarcoidosis HLA class II genotyping distinguishes differences of clinical phenotype across ethnic groups. *Human Molecular Genetics* 19, 4100–4111. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq325>
- Saxton, R.A., Tsutsumi, N., Su, L.L., Abhiraman, G.C., Mohan, K., Henneberg, L.T., Aduri, N.G., Gati, C., Garcia, K.C., 2021. Structure-based decoupling of the pro- and anti-inflammatory functions of interleukin-10. *Science* 371, eabc8433. <https://doi.org/10.1126/science.abc8433>

- Scadding, J.G., 1961. Prognosis of intrathoracic sarcoidosis in England. A review of 136 cases after five years' observation. *Br Med J* 2, 1165–1172. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.5261.1165>
- Scher, J.U., Joshua, V., Artacho, A., Abdollahi-Roodsaz, S., Öckinger, J., Kullberg, S., Sköld, M., Eklund, A., Grunewald, J., Clemente, J.C., Ubeda, C., Segal, L.N., Catrina, A.I., 2016. The lung microbiota in early rheumatoid arthritis and autoimmunity. *Microbiome* 4, 60. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0206-x>
- Schrezenmeier, E., Dörner, T., 2020. Mechanisms of action of hydroxychloroquine and chloroquine: implications for rheumatology. *Nat Rev Rheumatol* 16, 155–166. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-0372-x>
- Schupp, J.C., Tchaptchet, S., Lützen, N., Engelhard, P., Müller-Quernheim, J., Freudenberg, M.A., Prasse, A., 2015. Immune response to *Propionibacterium acnes* in patients with sarcoidosis – in vivo and in vitro. *BMC Pulmonary Medicine* 15, 75. <https://doi.org/10.1186/s12890-015-0070-7>
- Sepehri, M., Hutton Carlsen, K., Serup, J., 2016. Papulo-Nodular Reactions in Black Tattoos as Markers of Sarcoidosis: Study of 92 Tattoo Reactions from a Hospital Material. *Dermatology* 232, 679–686. <https://doi.org/10.1159/000453315>
- Seto, Y., Nakajima, H., Suto, A., Shimoda, K., Saito, Y., Nakayama, K.I., Iwamoto, I., 2003. Enhanced Th2 cell-mediated allergic inflammation in Tyk2-deficient mice. *J Immunol* 170, 1077–1083. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.2.1077>
- Shamaei, M., Mortaz, E., Pourabdollah, M., Garssen, J., Tabarsi, P., Velayati, A., Adcock, I.M., 2018. Evidence for M2 macrophages in granulomas from pulmonary sarcoidosis: A new aspect of macrophage heterogeneity. *Hum Immunol* 79, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2017.10.009>
- Shao, F., Pang, X., Baeg, G.H., 2020. Targeting the JAK/STAT Signaling Pathway for Breast Cancer. *Current Medicinal Chemistry* 28, 5137–5151.
- Sharma, O.P., 1998. Effectiveness of chloroquine and hydroxychloroquine in treating selected patients with sarcoidosis with neurological involvement. *Arch Neurol* 55, 1248–1254. <https://doi.org/10.1001/archneur.55.9.1248>
- Shawky, A.M., Almalki, F.A., Abdalla, A.N., Abdelazeem, A.H., Gouda, A.M., 2022. A Comprehensive Overview of Globally Approved JAK Inhibitors. *Pharmaceutics* 14, 1001. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14051001>
- Shigehara, K., Shijubo, N., Hirasawa, M., Abe, S., Uede, T., 1998. Immunolocalization of extracellular matrix proteins and integrins in sarcoid lymph nodes. *Virchows Arch* 433, 55–61. <https://doi.org/10.1007/s004280050216>
- Shimoda, K., van Deursent, J., Sangster, M.Y., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Tripp, R.A., Chu, C., Quelle, F.W., Nosaka, T., Vignali, D.A.A., Doherty, P.C., Grosveld, G., Paul, W.E., Ihle, J.N., 1996. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted State6 gene. *Nature* 380, 630–633. <https://doi.org/10.1038/380630a0>
- Shuai, K., 2000. Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* 19, 2638–2644. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203522>
- Shuai, K., Stark, G.R., Kerr, I.M., Darnell, J.E., 1993. A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon-gamma. *Science* 261, 1744–1746. <https://doi.org/10.1126/science.7690989>
- Siddiquee, K.A.Z., Turkson, J., 2008. STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors. *Cell Res* 18, 254–267. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.18>

- Silverstein, E., Pertschuk, L.P., Friedland, J., 1979. Immunofluorescent localization of angiotensin converting enzyme in epithelioid and giant cells of sarcoidosis granulomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 6646–6648. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.12.6646>
- Simoncic, P.D., Lee-Loy, A., Barber, D.L., Tremblay, M.L., McGlade, C.J., 2002. The T cell protein tyrosine phosphatase is a negative regulator of janus family kinases 1 and 3. *Curr Biol* 12, 446–453. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)00697-8](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00697-8)
- Sohn, S.J., Barrett, K., Van Abbema, A., Chang, C., Kohli, P.B., Kanda, H., Smith, J., Lai, Y., Zhou, A., Zhang, B., Yang, W., Williams, K., Macleod, C., Hurley, C.A., Kulagowski, J.J., Lewin-Koh, N., Dengler, H.S., Johnson, A.R., Ghilardi, N., Zak, M., Liang, J., Blair, W.S., Magnuson, S., Wu, L.C., 2013. A Restricted Role for TYK2 Catalytic Activity in Human Cytokine Responses Revealed by Novel TYK2-Selective Inhibitors. *J Immunol* 191, 2205–2216. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202859>
- Soler, P., Basset, F., 1976. Morphology and distribution of the cells of a sarcoid granuloma: ultrastructural study of serial sections. *Ann N Y Acad Sci* 278, 147–160. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1976.tb47026.x>
- Song, G.G., Kim, J.-H., Lee, Y.H., 2014. Associations between TNF- α -308 A/G and lymphotoxin- α +252 A/G polymorphisms and susceptibility to sarcoidosis: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 41, 259–267. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2859-x>
- Sonnenblick, A., Levy, C., Razin, E., 2004. Interplay between MITF, PIAS3, and STAT3 in mast cells and melanocytes. *Mol Cell Biol* 24, 10584–10592. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.24.10584-10592.2004>
- Sorenson, R.L., Stout, L.E., 1995. Prolactin receptors and JAK2 in islets of Langerhans: an immunohistochemical analysis. *Endocrinology* 136, 4092–4098. <https://doi.org/10.1210/endo.136.9.7649117>
- Souza, P.P.C., Brechter, A.B., Reis, R.I., Costa, C. a. S., Lundberg, P., Lerner, U.H., 2013. IL-4 and IL-13 inhibit IL-1 β and TNF- α induced kinin B1 and B2 receptors through a STAT6-dependent mechanism. *Br J Pharmacol* 169, 400–412. <https://doi.org/10.1111/bph.12116>
- Spagnolo, P., du Bois, R.M., 2007. Genetics of sarcoidosis. *Clinics in Dermatology* 25, 242–249. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2007.03.001>
- Stahl, N., Boulton, T.G., Farruggella, T., Ip, N.Y., Davis, S., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S., 1994. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* 263, 92–95. <https://doi.org/10.1126/science.8272873>
- Stanton, L.-A., Fenhalls, G., Lucas, A., Gough, P., Greaves, D.R., Mahoney, J.A., Helden, P.V., Gordon, S., 2003. Immunophenotyping of macrophages in human pulmonary tuberculosis and sarcoidosis. *Int J Exp Pathol* 84, 289–304. <https://doi.org/10.1111/j.0959-9673.2003.00365.x>
- Stark, G.R., Darnell, J.E., 2012. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity* 36, 503–514. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.013>
- Statement on Sarcoidosis, 1999. 160, 20.
- Stephanou, A., Brar, B.K., Knight, R.A., Latchman, D.S., 2000. Opposing actions of STAT-1 and STAT-3 on the Bcl-2 and Bcl-x promoters. *Cell Death Differ* 7, 329–330. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400656>

- Strehlow, I., Schindler, C., 1998. Amino-terminal Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) Domains Regulate Nuclear Translocation and STAT Deactivation *. *Journal of Biological Chemistry* 273, 28049–28056. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.43.28049>
- Suzuki, H., Ota, M., Meguro, A., Katsuyama, Y., Kawagoe, T., Ishihara, M., Asukata, Y., Takeuchi, M., Ito, N., Shibuya, E., Nomura, E., Uemoto, R., Nishide, T., Namba, K., Kitaichi, N., Morimoto, S., Kaburaki, T., Ando, Y., Takenaka, S., Nakamura, J., Saeki, K., Ohno, S., Inoko, H., Mizuki, N., 2012. Genetic characterization and susceptibility for sarcoidosis in Japanese patients: risk factors of BTNL2 gene polymorphisms and HLA class II alleles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 7109–7115. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10491>
- Sverrild, A., Backer, V., Kyvik, K.O., Kaprio, J., Milman, N., Svendsen, C.B., Thomsen, S.F., 2008. Heredity in sarcoidosis: a registry-based twin study. *Thorax* 63, 894–896. <https://doi.org/10.1136/thx.2007.094060>
- Sweiss, N.J., Lower, E.E., Mirsaeidi, M., Dudek, S., Garcia, J.G.N., Perkins, D., Finn, P.W., Baughman, R.P., 2014a. Rituximab in the treatment of refractory pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir J* 43, 1525–1528. <https://doi.org/10.1183/09031936.00224513>
- Sweiss, N.J., Noth, I., Mirsaeidi, M., Zhang, W., Naureckas, E.T., Hogarth, D.K., Streck, M., Caligiuri, P., Machado, R.F., Niewold, T.B., Garcia, J.G.N., Pangan, A.L., Baughman, R.P., 2014b. Efficacy Results of a 52-week Trial of Adalimumab in the Treatment of Refractory Sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 31, 46–54.
- Sweiss, N.J., Salloum, R., Gandhi, S., Alegre, M.-L., Sawaqed, R., Badaracco, M., Pursell, K., Pitrak, D., Baughman, R.P., Moller, D.R., Garcia, J.G.N., Niewold, T.B., 2010. Significant CD4, CD8, and CD19 lymphopenia in peripheral blood of sarcoidosis patients correlates with severe disease manifestations. *PLoS One* 5, e9088. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009088>
- Swigris, J.J., Olson, A.L., Huie, T.J., Fernandez-Perez, E.R., Solomon, J., Sprunger, D., Brown, K.K., 2011. Sarcoidosis-related mortality in the United States from 1988 to 2007. *Am J Respir Crit Care Med* 183, 1524–1530. <https://doi.org/10.1164/rccm.201010-1679OC>
- Taflin, C., Miyara, M., Nochy, D., Valeyre, D., Naccache, J.-M., Altare, F., Salek-Peyron, P., Badoual, C., Bruneval, P., Haroche, J., Mathian, A., Amoura, Z., Hill, G., Gorochoy, G., 2009. FoxP3+ regulatory T cells suppress early stages of granuloma formation but have little impact on sarcoidosis lesions. *Am J Pathol* 174, 497–508. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080580>
- Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T., Akira, S., 1997. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3801–3804. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.8.3801>
- Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S., Nakanishi, K., Yoshida, N., Kishimoto, T., Akira, S., 1996. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 380, 627–630. <https://doi.org/10.1038/380627a0>
- Talreja, J., Talwar, H., Ahmad, N., Rastogi, R., Samavati, L., 2016. Dual Inhibition of Rip2 and IRAK1/4 Regulates IL-1 β and IL-6 in Sarcoidosis Alveolar Macrophages and Peripheral Blood Mononuclear Cells. *The Journal of Immunology* 197, 1368–1378. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600258>
- Tavee, J.O., Karwa, K., Ahmed, Z., Thompson, N., Parambil, J., Culver, D.A., 2017. Sarcoidosis-associated small fiber neuropathy in a large cohort: Clinical aspects and response to IVIG and anti-TNF alpha treatment. *Respir Med* 126, 135–138. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2017.03.011>

- Teirstein, A.T., Morgenthau, A.S., 2009. "End-stage" pulmonary fibrosis in sarcoidosis. *Mt Sinai J Med* 76, 30–36. <https://doi.org/10.1002/msj.20090>
- ten Hoeve, J., de Jesus Ibarra-Sanchez, M., Fu, Y., Zhu, W., Tremblay, M., David, M., Shuai, K., 2002. Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* 22, 5662–5668. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.16.5662-5668.2002>
- Tezera, L.B., Bielecka, M.K., Elkington, P.T., 2017. Bioelectrospray Methodology for Dissection of the Host-pathogen Interaction in Human Tuberculosis. *Bio Protoc* 7, e2418. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2418>
- Thierfelder, W.E., van Deursen, J.M., Yamamoto, K., Tripp, R.A., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Sangster, M.Y., Vignali, D.A., Doherty, P.C., Grosveld, G.C., Ihle, J.N., 1996. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 382, 171–174. <https://doi.org/10.1038/382171a0>
- Thieu, V.T., Yu, Q., Chang, H.-C., Yeh, N., Nguyen, E.T., Sehra, S., Kaplan, M.H., 2008. Signal transducer and activator of transcription 4 is required for the transcription factor T-bet to promote T helper 1 cell-fate determination. *Immunity* 29, 679–690. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.08.017>
- Thillai, M., Atkins, C.P., Crawshaw, A., Hart, S.P., Ho, L.-P., Kouranos, V., Patterson, K.C., Screaton, N.J., Whight, J., Wells, A.U., 2021. BTS Clinical Statement on pulmonary sarcoidosis. *Thorax* 76, 4–20. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2019-214348>
- Tkaczuk, J., Yu, C.-L., Baksh, S., Milford, E.L., Carpenter, C.B., Burakoff, S.J., McKay, D.B., 2002. Effect of anti-IL-2R α antibody on IL-2-induced Jak/STAT signaling. *Am J Transplant* 2, 31–40. <https://doi.org/10.1034/j.1600-6143.2002.020107.x>
- Tøndell, A., Moen, T., Børset, M., Salvesen, Ø., Rø, A.D., Sue-Chu, M., 2014. Bronchoalveolar Lavage Fluid IFN- Th17 Cells and Regulatory T Cells in Pulmonary Sarcoidosis. *Mediators of Inflammation* 2014, e438070. <https://doi.org/10.1155/2014/438070>
- Tuleta, I., Biener, L., Pizarro, C., Nickenig, G., Skowasch, D., 2018. Proangiogenic and Profibrotic Markers in Pulmonary Sarcoidosis, in: Pokorski, M. (Ed.), *Clinical Pulmonary Research, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 57–66. https://doi.org/10.1007/5584_2018_199
- Turkson, J., Kim, J.S., Zhang, S., Yuan, J., Huang, M., Glenn, M., Haura, E., Sefti, S., Hamilton, A.D., Jove, R., 2004. Novel peptidomimetic inhibitors of signal transducer and activator of transcription 3 dimerization and biological activity. *Mol Cancer Ther* 3, 261–269.
- Tussié-Luna, M.I., Bayarsaihan, D., Seto, E., Ruddle, F.H., Roy, A.L., 2002. Physical and functional interactions of histone deacetylase 3 with TFII-I family proteins and PIAS β . *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12807–12812. <https://doi.org/10.1073/pnas.192464499>
- Tzouvelekis, A., Ntoliou, P., Karameris, A., Koutsopoulos, A., Boglou, P., Koulelidis, A., Archontogeorgis, K., Zacharis, G., Drakopanagiotakis, F., Steiropoulos, P., Anevlavis, S., Polychronopoulos, V., Mikroulis, D., Bouros, D., 2012. Expression of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-

- 1a-Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Inhibitory Growth Factor (ING)-4- axis in sarcoidosis patients. *BMC Research Notes* 5, 654. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-654>
- Ueda-Hayakawa, I., Tanimura, H., Osawa, M., Iwasaka, H., Ohe, S., Yamazaki, F., Mizuno, K., Okamoto, H., 2013. Elevated serum BAFF levels in patients with sarcoidosis: association with disease activity. *Rheumatology* 52, 1658–1666. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ket186>
- Ungprasert, P., Crowson, C.S., Carmona, E.M., Matteson, E.L., 2018. Outcome of pulmonary sarcoidosis: a population-based study 1976–2013. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 35, 123–128. <https://doi.org/10.36141/svldd.v35i2.6356>
- Vadivel, C.K., Gluud, M., Torres-Rusillo, S., Boding, L., Willerslev-Olsen, A., Buus, T.B., Nielsen, T.K., Persson, J.L., Bonefeld, C.M., Geisler, C., Krejsgaard, T., Fuglsang, A.T., Odum, N., Woetmann, A., 2021. JAK3 Is Expressed in the Nucleus of Malignant T Cells in Cutaneous T Cell Lymphoma (CTCL). *Cancers (Basel)* 13, 280. <https://doi.org/10.3390/cancers13020280>
- Valeyre, D., Prasse, A., Nunes, H., Uzunhan, Y., Brillet, P.-Y., Müller-Quernheim, J., 2014. Sarcoidosis. *The Lancet* 383, 1155–1167. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60680-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60680-7)
- Van Nguyen, T., Angkasekwinai, P., Dou, H., Lin, F.-M., Lu, L.-S., Cheng, J., Chin, Y.E., Dong, C., Yeh, E.T.H., 2012. SUMO-specific protease 1 is critical for early lymphoid development through regulation of STAT5 activation. *Mol Cell* 45, 210–221. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.12.026>
- Velazquez, L., Fellous, M., Stark, G.R., Pellegrini, S., 1992. A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell* 70, 313–322. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90105-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90105-1)
- Velazquez, L., Mogensen, K.E., Barbieri, G., Fellous, M., Uzé, G., Pellegrini, S., 1995. Distinct domains of the protein tyrosine kinase tyk2 required for binding of interferon-alpha/beta and for signal transduction. *J Biol Chem* 270, 3327–3334. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.7.3327>
- Verbsky, J.W., Bach, E.A., Fang, Y.F., Yang, L., Randolph, D.A., Fields, L.E., 1996. Expression of Janus kinase 3 in human endothelial and other non-lymphoid and non-myeloid cells. *J Biol Chem* 271, 13976–13980. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.24.13976>
- Villarino, A.V., Kanno, Y., O’Shea, J.J., 2017. Mechanisms and consequences of Jak–STAT signaling in the immune system. *Nat Immunol* 18, 374–384. <https://doi.org/10.1038/ni.3691>
- Vinkemeier, U., Cohen, S.L., Moarefi, I., Chait, B.T., Kuriyan, J., Darnell, J.E., 1996. DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *EMBO J* 15, 5616–5626.
- Vinkemeier, U., Moarefi, I., Darnell, J.E., Kuriyan, J., 1998. Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4. *Science* 279, 1048–1052. <https://doi.org/10.1126/science.279.5353.1048>
- von Freeden-Jeffry, U., Vieira, P., Lucian, L.A., McNeil, T., Burdach, S.E., Murray, R., 1995. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 181, 1519–1526. <https://doi.org/10.1084/jem.181.4.1519>
- Vorselaars, A.D.M., Verwoerd, A., van Moorsel, C.H.M., Keijsers, R.G.M., Rijkers, G.T., Grutters, J.C., 2014. Prediction of relapse after discontinuation of infliximab therapy in severe sarcoidosis. *Eur Respir J* 43, 602–609. <https://doi.org/10.1183/09031936.00055213>
- Wakao, H., Gouilleux, F., Groner, B., 1995. Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *EMBO J* 14, 854–855. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07064.x>

- Walker, L.S.K., Sansom, D.M., 2011. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat Rev Immunol* 11, 852–863. <https://doi.org/10.1038/nri3108>
- Wang, A., Singh, K., Ibrahim, W., King, B., Damsky, W., 2020. The Promise of JAK Inhibitors for Treatment of Sarcoidosis and Other Inflammatory Disorders with Macrophage Activation: A Review of the Literature. *Yale J Biol Med* 93, 187–195.
- Wang, S., Liu, M., Li, X., Zhang, J., Wang, F., Zhang, C., Roden, A., Ryu, J.H., Warrington, K.J., Sun, J., Matteson, E.L., Tschumperlin, D.J., Vassallo, R., 2022. Canonical and noncanonical regulatory roles for JAK2 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *The FASEB Journal* 36, e22336. <https://doi.org/10.1096/fj.202101436R>
- Wang, S.-W., Sun, Y.-M., 2014. The IL-6/JAK/STAT3 pathway: potential therapeutic strategies in treating colorectal cancer (Review). *Int J Oncol* 44, 1032–1040. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2259>
- Watford, W.T., O’Shea, J.J., 2006. Human tyk2 kinase deficiency: another primary immunodeficiency syndrome. *Immunity* 25, 695–697. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.10.007>
- Wei, J.J., Kallenbach, L.R., Kreider, M., Leung, T.H., Rosenbach, M., 2019. Resolution of cutaneous sarcoidosis after Janus kinase inhibitor therapy for concomitant polycythemia vera. *JAAD Case Reports* 5, 360. <https://doi.org/10.1016/j.jdc.2019.02.006>
- Welham, M.J., Learmonth, L., Bone, H., Schrader, J.W., 1995. Interleukin-13 signal transduction in lymphohemopoietic cells. Similarities and differences in signal transduction with interleukin-4 and insulin. *J Biol Chem* 270, 12286–12296. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.20.12286>
- Wennerström, A., Pietinalho, A., Lasota, J., Salli, K., Surakka, I., Seppänen, M., Selroos, O., Lokki, M.-L., 2013. Major histocompatibility complex class II and BTNL2 associations in sarcoidosis. *Eur Respir J* 42, 550–553. <https://doi.org/10.1183/09031936.00035213>
- West, N.R., 2019. Coordination of Immune-Stroma Crosstalk by IL-6 Family Cytokines. *Front Immunol* 10, 1093. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01093>
- Wilks, A.F., Harpur, A.G., Kurban, R.R., Ralph, S.J., Zürcher, G., Ziemiecki, A., 1991. Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol Cell Biol* 11, 2057–2065. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.4.2057-2065.1991>
- Wills, A.B., Adjemian, J., Fontana, J.R., Steiner, C.A., Daniel-Wayman, S., Olivier, K.N., Prevots, D.R., 2018. Sarcoidosis-associated Hospitalizations in the United States, 2002 to 2012. *Ann Am Thorac Soc* 15, 1490–1493. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201806-401RL>
- Wilsher, M.L., 1998. Seasonal clustering of sarcoidosis presenting with erythema nodosum. *Eur Respir J* 12, 1197–1199. <https://doi.org/10.1183/09031936.98.12051197>
- Wojtan, P., Mierzejewski, M., Osińska, I., Domagała-Kulawik, J., 2016. Macrophage polarization in interstitial lung diseases. *Cent Eur J Immunol* 41, 159–164. <https://doi.org/10.5114/ceji.2016.60990>
- Wu, C.-H., Chung, P.-I., Wu, C.-Y., Chen, Y.-T., Chiu, Y.-W., Chang, Y.-T., Liu, H.-N., 2017. Comorbid autoimmune diseases in patients with sarcoidosis: A nationwide case-control study in Taiwan. *J Dermatol* 44, 423–430. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.13654>
- Xaus, J., Besalduch, N., Comalada, M., Marcoval, J., Pujol, R., Mañá, J., Celada, A., 2003. High expression of p21Waf1 in sarcoid granulomas: a putative role for long-lasting inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 74, 295–301. <https://doi.org/10.1189/jlb.1202628>

- Xu, X., Fu, X.Y., Plate, J., Chong, A.S., 1998. IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res* 58, 2832–2837.
- Xu, X., Sun, Y.L., Hoey, T., 1996. Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science* 273, 794–797. <https://doi.org/10.1126/science.273.5276.794>
- Yan, H., Piazza, F., Krishnan, K., Pine, R., Krolewski, J.J., 1998. Definition of the interferon-alpha receptor-binding domain on the TYK2 kinase. *J Biol Chem* 273, 4046–4051. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.7.4046>
- Yanagishita, T., Watanabe, D., Akita, Y., Nakano, A., Ohshima, Y., Tamada, Y., Matsumoto, Y., 2007. Construction of novel in vitro epithelioid cell granuloma model from mouse macrophage cell line. *Arch Dermatol Res* 299, 399–403. <https://doi.org/10.1007/s00403-007-0778-1>
- Yang, E., Wen, Z., Haspel, R.L., Zhang, J.J., Darnell Jr., J.E., 1999. The Linker Domain of Stat1 Is Required for Gamma Interferon-Driven Transcription. *Molecular and Cellular Biology* 19, 5106–5112. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.7.5106>
- Yang, I.V., Konigsberg, I., MacPhail, K., Li, L., Davidson, E.J., Mroz, P.M., Hamzeh, N., Gillespie, M., Silveira, L.J., Fingerlin, T.E., Maier, L.A., 2019. DNA Methylation Changes in Lung Immune Cells Are Associated with Granulomatous Lung Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 60, 96–105. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0177OC>
- Yang, I.V., Pedersen, B.S., Rabinovich, E., Hennessy, C.E., Davidson, E.J., Murphy, E., Guardela, B.J., Tedrow, J.R., Zhang, Y., Singh, M.K., Correll, M., Schwarz, M.I., Geraci, M., Sciurba, F.C., Quackenbush, J., Spira, A., Kaminski, N., Schwartz, D.A., 2014. Relationship of DNA Methylation and Gene Expression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 190, 1263–1272. <https://doi.org/10.1164/rccm.201408-1452OC>
- Yang, J., Huang, J., Dasgupta, M., Sears, N., Miyagi, M., Wang, B., Chance, M.R., Chen, X., Du, Y., Wang, Y., An, L., Wang, Q., Lu, T., Zhang, X., Wang, Z., Stark, G.R., 2010. Reversible methylation of promoter-bound STAT3 by histone-modifying enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 21499–21504. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016147107>
- Yang, W., Zhu, G., Qin, M., Li, Z., Wang, B., Yang, J., Wang, T., 2021. The Effectiveness of Ruxolitinib for Acute/Chronic Graft-versus-Host Disease in Children: A Retrospective Study. *Drug Des Devel Ther* 15, 743–752. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S287218>
- Yao, Q., Ji, Q., Zhou, Y., 2023. Pulmonary Function in Pulmonary Sarcoidosis. *J Clin Med* 12, 6701. <https://doi.org/10.3390/jcm12216701>
- Yasukawa, H., Misawa, H., Sakamoto, H., Masuhara, M., Sasaki, A., Wakioka, T., Ohtsuka, S., Imaizumi, T., Matsuda, T., Ihle, J.N., Yoshimura, A., 1999. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J* 18, 1309–1320. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.5.1309>
- Yeh, T.C., Dondi, E., Uze, G., Pellegrini, S., 2000. A dual role for the kinase-like domain of the tyrosine kinase Tyk2 in interferon-alpha signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8991–8996. <https://doi.org/10.1073/pnas.160130297>
- Yoon, H.-Y., Kim, H.M., Kim, Y.-J., Song, J.W., 2018. Prevalence and incidence of sarcoidosis in Korea: a nationwide population-based study. *Respir Res* 19, 158. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0871-3>

- Young, R.C., Rachal, R.E., Cowan, C.L., 1984. Sarcoidosis--the beginning: historical highlights of personalities and their accomplishments during the early years. *J Natl Med Assoc* 76, 887–896.
- Zhang, H., Costabel, U., Dai, H., 2021. The Role of Diverse Immune Cells in Sarcoidosis. *Frontiers in Immunology* 12.
- Zhang, M., Zhang, S., 2020. T Cells in Fibrosis and Fibrotic Diseases. *Frontiers in Immunology* 11.
- Zhong, Z., Wen, Z., Darnell, J.E., 1994. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 264, 95–98. <https://doi.org/10.1126/science.8140422>
- Zhou, E.-R., Arce, S., 2020. Key Players and Biomarkers of the Adaptive Immune System in the Pathogenesis of Sarcoidosis. *Int J Mol Sci* 21, 7398. <https://doi.org/10.3390/ijms21197398>
- Zhou, T., Casanova, N., Pouladi, N., Wang, T., Lussier, Y., Knox, K.S., Garcia, J.G.N., 2017. Identification of Jak-STAT signaling involvement in sarcoidosis severity via a novel microRNA-regulated peripheral blood mononuclear cell gene signature. *Sci Rep* 7, 4237. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04109-6>
- Zhou, T., Zhang, W., Sweiss, N.J., Chen, E.S., Moller, D.R., Knox, K.S., Ma, S.-F., Wade, M.S., Noth, I., Machado, R.F., Garcia, J.G.N., 2012. Peripheral blood gene expression as a novel genomic biomarker in complicated sarcoidosis. *PLoS One* 7, e44818. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044818>
- Zhu, M., John, S., Berg, M., Leonard, W.J., 1999. Functional association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFN γ -mediated signaling. *Cell* 96, 121–130. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80965-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80965-4)
- Ziegenhagen, M.W., Rothe, M.E., Zissel, G., Müller-Quernheim, J., 2002. Exaggerated TNF α release of alveolar macrophages in corticosteroid resistant sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 19, 185–190.
- Zimmermann, A., Knecht, H., Häsler, R., Zissel, G., Gaede, K.I., Hofmann, S., Nebel, A., Müller-Quernheim, J., Schreiber, S., Fischer, A., 2017. Atopobium and Fusobacterium as novel candidates for sarcoidosis-associated microbiota. *Eur Respir J* 50, 1600746. <https://doi.org/10.1183/13993003.00746-2016>
- Zissel, G., Homolka, J., Schlaak, J., Schlaak, M., Müller-Quernheim, J., 1996. Anti-inflammatory cytokine release by alveolar macrophages in pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 154, 713–719. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.154.3.8810610>
- Zissel, G., Müller-Quernheim, J., 2015. Cellular Players in the Immunopathogenesis of Sarcoidosis. *Clin Chest Med* 36, 549–560. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2015.08.016>
- Zouein, F.A., Duhé, R.J., Booz, G.W., 2011. JAKs go nuclear: Emerging role of nuclear JAK1 and JAK2 in gene expression and cell growth. *Growth Factors* 29, 245–252. <https://doi.org/10.3109/08977194.2011.614949>
- Zoya Qureshy, Jennifer R. Grandis, Daniel E. Johnson, 2020. Targeting the JAK/STAT pathway in solid tumors. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment* 6, null-null. <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2020.58>

Résumé

La sarcoïdose est une granulomatose d'étiologie inconnue, caractérisée par la formation de granulomes immuns dans divers organes, principalement les poumons. La présentation clinique et l'évolution de la sarcoïdose sont variables. L'analyse génomique du sang périphérique des patients a montré que la voie de signalisation JAK/STAT est significativement représentée dans la sarcoïdose et est associée à la gravité de la maladie. Cependant, l'expression spatiale et temporelle des membres de la voie JAK/STAT dans le granulome est encore mal connue. Nous émettons l'hypothèse que l'activation de la voie JAK/STAT dans les granulomes de la sarcoïdose induit leur formation et/ou leur persistance. Premièrement, nous avons réalisé une cartographie de l'expression des membres de la voie JAK/STAT dans le granulome, sur des biopsies de patients atteints de sarcoïdose. Parmi les kinases JAKs activées, seule pJAK2 est détectée, principalement dans les LTCD3⁺. Seule la localisation nucléaire de pJAK2 a été observée, suggérant l'activation d'une voie JAK2 non canonique. D'autre part, seules pSTAT1, pSTAT3 et pSTAT5 sont détectées dans les granulomes, principalement dans les cellules de la lignée myéloïde CD68⁺. Deuxièmement, nous avons étudié l'activation de la voie JAK/STAT *in vitro* dans des cultures de lymphocytes circulants de patients atteints de sarcoïdose et de témoins. La voie non canonique de pJAK2 semble être exclusive aux lymphocytes des granulomes, tandis que, les lymphocytes circulants présentent une activation de la voie canonique JAK2/STAT1, et cela semble être associé à la sévérité de la maladie. Troisièmement, à l'aide d'une analyse multivariée, nous avons comparé l'activation des membres détectés dans le granulome de différents organes, puis associé à la sévérité de la maladie en utilisant deux approches distinctes : (i) en associant les niveaux d'expression des protéines aux caractéristiques cliniques des patients et (ii) en examinant leur relation avec les stades d'évolution des granulomes. L'expression des 4 protéines est plus élevée dans les biopsies pulmonaires (AUC=0.83) et cutanées (AUC=0.89) et est en moyenne associée à la persistance de la maladie (COS \geq 5, $p < 0.001$). Deux signatures prédominantes sont identifiées dans les lymphocytes/myéloïdes : pJAK2 / pSTAT1-pSTAT5 dans le poumon (AUC=0.84) et pJAK2 / pSTAT3-pSTAT5 dans la peau (AUC=0.80). Enfin, nous montrons une corrélation positive significative entre l'expression de pSTAT1 ($p < 0,05$), pSTAT3 ($p < 0,05$), pSTAT5 ($p < 0,01$) et la présence du stade considéré comme précoce dit "floride".

En résumé, nos résultats montrent un profil d'expression de la voie JAK/STAT différent entre les lymphocytes circulants et ceux des granulomes. La voie canonique JAK2/STAT1 activée dans les lymphocytes circulants est associée à la sévérité de la maladie. En revanche, dans le granulome, la voie non canonique pJAK2 exprimée dans les lymphocytes et potentiellement la voie canonique impliquant l'activation de STAT1, STAT3 et STAT5 dans les cellules myéloïdes sont associées à la sévérité des organes les plus affectés, à savoir : le poumon et la peau. Cependant, leur expression est uniquement corrélée avec le développement des granulomes et sans lien apparent avec la persistance et le stade fibreux.

Abstract

Sarcoidosis is a granulomatosis of unknown etiology, characterized by the formation of immune granulomas in various organs, principally the lungs. The clinical presentation and evolution of sarcoidosis are variable. Genomic analysis of patients' peripheral blood has shown that the JAK/STAT signaling pathway is significantly represented in sarcoidosis and is associated with disease severity. However, the spatial and temporal expression of JAK/STAT pathway members in the granuloma is still poorly understood. We hypothesize that activation of the JAK/STAT pathway in sarcoidosis granulomas induces their formation and/or persistence. Firstly, we mapped the expression of members of the JAK/STAT pathway in the granuloma, on biopsies from patients with sarcoidosis. Among the activated JAKs kinases, only pJAK2 is detected, mainly in LTCD3⁺. Only nuclear localization of pJAK2 was observed, suggesting activation of a non-canonical JAK2 pathway. On the other hand, only pSTAT1, pSTAT3 and pSTAT5 were detected in granulomas, mainly in cells of the CD68⁺ myeloid lineage. Secondly, we studied activation of the JAK/STAT pathway in vitro in circulating lymphocyte cultures from sarcoidosis patients and controls. The non-canonical pJAK2 pathway appears to be exclusive to granuloma lymphocytes, whereas, circulating lymphocytes show activation of the canonical JAK2/STAT1 pathway, and this appears to be associated with disease severity. Thirdly, using multivariate analysis, we compared protein activation detected in granuloma from different organs, then associated with disease severity using two distinct approaches: (i) associating protein expression levels with patients' clinical characteristics and (ii) examining their relationship with granuloma progression stages. Expression of the 4 proteins is higher in lung (AUC=0.83) and skin (AUC=0.89) biopsies, and is on average associated with disease persistence (COS \geq 5, $p < 0.001$). Two predominant signatures are identified in lymphocytes/myeloid cells: pJAK2 / pSTAT1-pSTAT5 in lung (AUC=0.84) and pJAK2 / pSTAT3-pSTAT5 in skin (AUC=0.80). Finally, we show a significant positive correlation between the expression of pSTAT1 ($p < 0.05$), pSTAT3 ($p < 0.05$), pSTAT5 ($p < 0.01$) and the presence of the early "florid" stage.

In summary, our results show a different JAK/STAT pathway expression profile between circulating and granuloma lymphocytes. The canonical JAK2/STAT1 pathway activated in circulating lymphocytes is associated with disease severity. In granuloma, on the other hand, the non-canonical pJAK2 pathway expressed in lymphocytes and potentially the canonical pathway involving activation of STAT1, STAT3 and STAT5 in myeloid cells are associated with the severity of the organs most affected : lung and skin. However, their expression is only correlated with granuloma development, with no apparent link to persistence and fibrotic stage.