



**HAL**  
open science

# Prédiction de la réponse aux biomédicaments au cours de la polyarthrite rhumatoïde via l'étude des sous populations lymphocytaires

Sarah Salomon

► **To cite this version:**

Sarah Salomon. Prédiction de la réponse aux biomédicaments au cours de la polyarthrite rhumatoïde via l'étude des sous populations lymphocytaires. Rhumatologie et système ostéo-articulaire. 2016. dumas-01393480

**HAL Id: dumas-01393480**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01393480>**

Submitted on 7 Nov 2016

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

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

---

**Prédiction de la réponse aux biomédicaments  
au cours de la polyarthrite rhumatoïde  
via l'étude des sous populations lymphocytaires**

---

**Thèse**

Pour l'obtention du Diplôme d'état de Docteur en Médecine - Spécialité : Rhumatologie

Présentée et soutenue publiquement  
Le 2 septembre 2016  
Par **Sarah SALOMON**

**JURY**

Président du jury : Monsieur le Professeur Patrice FARDELLONE  
Membres du jury : Monsieur le Professeur Jean Pierre MAROLLEAU  
Monsieur le Professeur Cyril PAGE  
Madame le Docteur Brigitte GUBLER  
Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Vincent GOËB





### **Monsieur le Professeur Patrice FARDELLONE**

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier (Rhumatologie)

Chef du service de Rhumatologie

Pôle « Autonomie ».

Cher Président, Cher Maître,

Je vous remercie de présider le jury de ma thèse.

Dès mon arrivée dans votre service en 2010, lors de ma dernière année d'externat, vous avez conforté mon choix de spécialité. Référent reconnu, vous m'avez montré le chemin. Votre sérénité et bonne humeur au quotidien, avec toute l'équipe du service comme avec les patients m'ont fait d'ailleurs comprendre pourquoi l'on vous appelle le Professeur *Farandole*...

### **Monsieur le Professeur Jean-Pierre MAROLLEAU**

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier (Hématologie, transfusion)

Chef du Service d'hématologie clinique et de thérapie cellulaire

Chef du Pôle « Oncopôle ».

Cher Juge, Cher Maître,

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites de juger mon travail.

Je n'imaginai pas, alors que j'effectuais mon 1<sup>er</sup> stage de pré externe que vous seriez un de mes juges aujourd'hui.

C'est un réel plaisir d'échanger avec vous. Nos réunions de labo en master 2 restent pour moi une étape décisive dans mon parcours.

L'importance de l'hématologie dans ma thèse montre à quel point nos deux spécialités sont liées, et je m'efforcerai au cours de ma carrière de pérenniser cette collaboration.

## **Monsieur le Professeur Vincent GOËB**

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier (Rhumatologie)

Cher Directeur, cher Maître,

Je vous remercie de m'avoir accueillie dès mon arrivée dans le service et d'avoir eu confiance en moi.

Toujours disponible, précis, à l'écoute de chaque patient comme de chaque membre du service, vous portez votre équipe vers le haut et c'est un honneur pour moi de travailler à vos côtés.

Je vous remercie sincèrement pour ce que vous m'avez enseigné tout au long de ces années, l'attention que vous avez portée à mes questions, la rigueur avec laquelle vous y répondiez.

Je sais que notre passion commune pour la rhumatologie et la recherche nous réservent à l'avenir de beaux challenges à relever.

## **Monsieur le Professeur Cyril PAGE**

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier (Anatomie)

Cher Juge, Cher Maître,

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites de juger mon travail.

Ma thèse est peut-être même la première à laquelle vous participez en tant que professeur. Nous nous sommes rencontrés lors de mon premier stage d'externe en chirurgie. Vous avez vite jugé mon tempérament en me surnommant « Sara Connor » (cela me suit encore...).

Ce stage a beaucoup compté dans mon parcours.

Le rock métal diffusé dans votre bloc reste un souvenir incroyable. Que dire de votre timbre de voix et du tempo marqué par vos pieds...

## **Madame le Docteur Brigitte GUBLER**

Maître de conférences-Praticien Hospitalier (Immunologie)

Responsable du Centre d'Activité « Oncobiologie moléculaire »

Pôle « Biologie, pharmacie et santé des populations »

Cher Juge, Cher Maître,

Je suis touchée et fière que vous ayez accepté de juger mon travail et je vous en remercie.

Cela sans doute parce que vous êtes une femme, parce que votre parcours est atypique et parce que votre univers me passionne. Que seraient les spécialités médicales sans le travail en labo et la recherche ?...

Vous m'avez fait découvrir les paillasses et le labo d'immunologie dans le cadre de mon master 2 de recherche. Je sais combien ces moments ont été importants pour moi et le seront encore demain.

*Le travail présenté dans cette thèse est issu de mon Master 2 Recherche (« Biominéralisation, Morphogénèse et Pathologies inflammatoires», Paris, Mention bien) et a fait l'objet d'une communication orale lors du congrès Français de Rhumatologie 2015.*



## Remerciements

---

### **À mes parents,**

Je vous dédie cette thèse, aboutissement de ces longues années d'études qui n'auraient pas été possibles sans votre indéfectible soutien.

Merci pour tout l'amour que vous me portez et que je vois dans vos yeux depuis toujours.

### **À mon frère et ma sœur chéris, à tous les membres de ma famille, mes coloc adorées, mes amis, sur terre comme au ciel :**

Toutes celles et ceux qui ont cru en moi,

Toutes celles et ceux qui aiment comme moi la vie par dessus tout,

Toutes celles et ceux qui ont été là, alors que la tempête faisait rage dans ma vie.

### **À l'abbé André Dubled,** qui m'a permis de rester vraie.

### **À Isabelle ma marraine,** qui chemine avec moi.

### **À tous les médecins qui ont contribué à ma formation :**

Mon parrain Bruno Ranson qui a forcément influencé mon choix post-bac,

Valérie Tsing, pour m'avoir fait découvrir la médecine de ville pendant mon externat,

Tous les médecins du service, notamment Franck Grados, Isabelle Desailly-Henry, Rolin Bellony, Daciana Ursu, Pauline Lasselin, Marie-Astrid Boutry ...

Les rhumatologues de ville qui m'ont accordé leur confiance, tout particulièrement Hervé Courmont, Patrick Boumier, Thomas Ryckelynck...

Caroline Guignant et Pierre Morel, pour leur disponibilité et leur aide pour les statistiques.

### **À mes anciens co-internes déjà thésés :**

Marie, Germain, Jean-Baptiste, Nassima, Julien et Alice avec qui j'ai tant partagé.

### **Aux internes de rhumatologie du service :**

Thibault, Benjamin, Sarah, Clémence, Sanja, Maxime et Karine.

### **À l'ensemble du personnel médical, para-médical, aux agents des services hospitaliers, aux secrétaires du service** pour leur travail, leur patience, leur abnégation.





# Sommaire

---

1. INTRODUCTION .....	13
1.1 Généralités sur la polyarthrite rhumatoïde (PR).....	13
1.1.1 Définition et épidémiologie.....	
1.1.2 Physiopathologie et principaux mécanismes mis en jeu .....	
1.1.3 Prise en charge.....	
1.2 Les différentes sous populations lymphocytaires d'intérêt dans la PR.....	17
1.2.1 Les lymphocytes T régulateurs .....	
1.2.2 Les lymphocytes Th17.....	
1.2.3 Les lymphocytes B régulateurs.....	
1.3 Objectifs de l'étude CELyPOR .....	24
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	25
2.1 Étude CELyPOR.....	25
2.2.1 Plan de l'étude .....	
2.2.2 Critères d'évaluation.....	
2.2.3 Critères d'inclusion et de non inclusion .....	
2.2 Analyse quantitative des sous populations lymphocytaires par cytométrie en flux ...	27
2.2.1 Phénotypage lymphocytaire .....	
2.2.2 Populations lymphocytaires étudiées et stratégie de gating .....	
2.3 Analyse fonctionnelle des Breg par détection de leur production d'IL-10 .....	29
2.3.1 Recueil cellulaire.....	
2.3.2 Stimulation des PBMC pour la production d'IL-10 .....	
2.4 Analyse statistique .....	30

3. RÉSULTATS .....	31
3.1 <i>Caractéristiques des patients et témoins à l'inclusion</i> .....	31
3.2 <i>Sous populations lymphocytaires des patients et témoins à l'inclusion</i> .....	32
3.3 <i>Association entre le statut immunologique et radiographique et les sous populations lymphocytaires des patients à l'inclusion</i> .....	33
3.4 <i>Corrélation entre sous populations lymphocytaires chez les patients et témoins</i> .....	34
3.5 <i>Évolution des sous populations lymphocytaires sous biomédicament</i> .....	35
3.6 <i>Évolution des sous populations lymphocytaires selon le type de biomédicament</i> .....	37
3.7 <i>Taux initial et évolution des sous populations lymphocytaires selon la rémission DAS 28 à 6 mois</i> .....	38
3.8 <i>Taux initial et évolution des sous populations lymphocytaires selon la réponse EULAR à 6 mois</i> .....	39
3.9 <i>Taux initial des sous populations lymphocytaires selon la réponse EULAR à 6 mois par type de biomédicament</i> .....	41
3.10 <i>Détection de la production d'IL-10</i> .....	42
4. DISCUSSION .....	44
5. CONCLUSION .....	50
6. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	52

## Liste des abréviations

---

**AAN** : Anticorps anti-nucléaires  
**Ac** : Anticorps  
**ACPA** : Anticorps anti-peptides citrullinés  
**ACR** : *American College of Rheumatology*  
**ANCA** : Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles  
**ANSM** : Agence nationale de sécurité du médicament  
**Breg** : Lymphocyte B régulateur  
**CD** : *Cluster of Differentiation* (Antigène spécifique de surface)  
**CMF** : Cytométrie en flux  
**CMH** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
**CPA** : Cellule Présentatrice d'Antigène  
**CPG** : Cytosine-phospho-guanine  
**CPP** : Comité de Protection des Personnes  
**CRP** : Protéine C-Réactive  
**DAS 28** : *Disease Activity Score 28*  
**DMARD** : *Disease Modifying Anti Rheumatic Drug*  
**EULAR** : *European League Against Rheumatism*  
**FR** : Facteur rhumatoïde  
**GM-CSF** : *Granulocyte macrophage-Colony Stimulating Factor*  
**HLA** : *Human Leucocyte Antigen*  
**Ig** : Immunoglobuline  
**IL** : Interleukine  
**INF** : Interferon  
**LDA** : *Low disease activity*  
**MTX** : Méthotrexate  
**PBMC** : Cellules mononucléées du sang périphérique  
**PMA** : Phorbol 12-myristate 13-acétate  
**PR** : Polyarthrite rhumatoïde  
**SNP** : *Single Nucleotide Polymorphism*  
**T2T** : « Treat-to-target »  
**TLR** : *Toll Like Receptors*  
**TNF** : Tumor Necrosis Factor  
**Treg** : Lymphocyte T régulateur  
**Th** : Lymphocyte T de type Helper  
**VEGF** : *Vascular Endothelial Growth Factor*  
**VS** : Vitesse de sédimentation érythrocytaire



## 1. INTRODUCTION

---

### 1.1 Généralités sur la polyarthrite rhumatoïde

#### 1.1.1 Définition et épidémiologie

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est le rhumatisme inflammatoire chronique le plus fréquent de l'adulte, ayant une prévalence de 0,3 à 0,5 % et une incidence annuelle estimée de 20 à 50 cas pour 100 000 habitants. Cette pathologie auto-immune se caractérise par une synovite chronique dont l'évolution se fait par alternance de périodes de « poussées » et de « rémissions ». En l'absence de traitement efficace, cette maladie évolutive est responsable à long terme de destructions articulaires irréversibles sources de handicap fonctionnel et de dépendance sociale [1-2].

#### 1.1.2 Physiopathologie et principaux mécanismes immunologiques

La pathogénie de la PR est complexe (*figure 1*). Les facteurs étiologiques ne sont que partiellement identifiés mais il existe une interaction entre des facteurs génétiques prédisposants, des facteurs environnementaux et des facteurs hormonaux conduisant à une modification post-traductionnelle de certaines protéines (citrullination), et ainsi à une perte de la tolérance immunitaire à l'origine d'une auto-immunité cellulaire et humorale [1-2].

Les deux principales anomalies génétiques sont d'une part l'expression d'allèles *HLA-DRB1* partageant un motif commun appelé « épitope partagé » permettant la reconnaissance des antigènes peptidiques modifiés par une citrullination post-traductionnelle ; et d'autre part certains variants de type *Single Nucleotide Polymorphism* du gène *PTPN22* codant pour une tyrosine phosphatase impliquée dans la signalisation des lymphocytes T et B [2]. La présence de ces anomalies génétiques pourrait expliquer 50% du risque de développer une PR chez les patients porteurs d'anticorps anti-peptides citrullinés (ACPA).

Le tabagisme est le principal facteur de risque environnemental, doublant le risque de développer une PR chez les sujets porteurs d'ACPA. Les infections bactériennes parodontales à *Porphyromonas gingivalis* apparaissent également associées au développement d'une PR, par l'expression microbienne de *Peptidyl Arginine Désaminase* de type IV capable de déclencher la citrullination protéique [2].

Enfin, la prépondérance du sexe féminin parmi les sujets atteints suggère l'implication de facteurs hormonaux dans la pathogénie de la PR [1-2].

L'atteinte synoviale caractérisée par une inflammation, une hypervascularisation et une hypertrophie (« pannus »), est à l'origine des symptômes de la maladie. Elle résulte d'une infiltration de la synoviale par des leucocytes activés en périphérie via un facteur environnemental (« trigger »). L'infiltration des leucocytes est favorisée par l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion au niveau des microvaisseaux synoviaux, sous l'effet de certaines cytokines.

La production locale de cytokines pro-inflammatoires (Interleukine 1 et 6, *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ) et de facteurs de croissance (*Granulocyte macrophage-Colony Stimulating Factor*, *Vascular Endothelial Growth Factor*) par les leucocytes activés est responsable d'une modification du microenvironnement articulaire avec augmentation de la néoangiogenèse synoviale et modification du phénotype des synoviocytes articulaires. Ceux-ci vont produire à leur tour des cytokines pro-inflammatoires et des métalloprotéases, à l'origine de l'inflammation articulaire chronique, de la destruction cartilagineuse et de l'activation des ostéoclastes présents dans l'os sous-chondral responsables des lésions osseuses [2].

Au niveau immunologique, l'immunité adaptative occupe une place centrale et précoce dans la pathogenèse de la maladie, en particulier l'immunité humorale. Ceci est fortement suggéré par la présence chez les patients atteints de PR, d'ACPA et d'anticorps dirigés contre la fraction Fc des immunoglobulines, appelés Facteur Rhumatoïde (FR). Ces anticorps peuvent être présents plusieurs années avant la phase symptomatique de la maladie, témoignant de la présence de lymphocytes B autoréactifs.

La production d'auto-anticorps participe à l'inflammation synoviale et à la destruction ostéo-articulaire par l'activation des macrophages via les récepteurs Fc gamma et le système du complément. L'absence d'expression du CD20 sur les plasmocytes et l'efficacité des thérapies ciblées anti-CD20 (rituximab) chez certains patients suggèrent que le rôle de l'immunité humorale n'est pas limité à la production d'anticorps, et intervient dans la production de cytokines et dans la présentation antigénique par l'expression du CD80/CD86 permettant l'activation de lymphocytes T autoréactifs. L'évolution de la maladie semble caractérisée par une expansion du répertoire épitopique et une diversification isotypique [1-3].

Enfin, l'immunité innée est impliquée précocement dans l'évolution de la maladie par l'infiltration synoviale de cellules dendritiques plasmacytoïdes et de macrophages. Ces cellules sont responsables de la présentation antigénique et de l'activation lymphocytaire T CD4<sup>+</sup> par l'expression de molécules *HLA* de classe II et de molécules de co-stimulation.

Les macrophages activés par différentes voies produisent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1,-6,-12,-15,-18 et -23), des radicaux libres oxygénés et des enzymes protéolytiques à l'origine des lésions tissulaires par dégradation de la matrice extracellulaire [2].

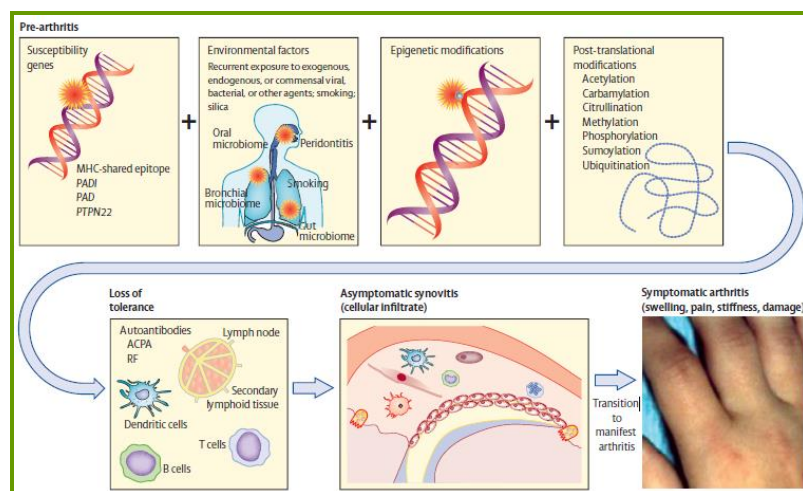


Figure 1 : Physiopathologie de la PR. D'après Smolen et al. Lancet 2016

### 1.1.3 Prise en charge

Le diagnostic de PR repose sur l'association de critères cliniques (nombre d'articulations douloureuses, gonflées et durée d'évolution), immunologiques (présence de FR et/ou d'ACPA), inflammatoires (élévation de la Vitesse de Sédimentation et de la Protéine C Réactive sérique), radiologiques et échographiques (érosions, synovites) faisant partie des critères de classification américano-européens établis par l'*European League Against Rheumatism* (EULAR) et l'*American College of Rheumatology* (ACR), actualisés en 2010 [4]. La prise en charge actuelle de la PR repose sur deux concepts autour desquels sont élaborées les recommandations de l'ACR (2012) [5] et de l'EULAR (2013) [6] : le concept de « *treat-to-target* » ou T2T (cible thérapeutique) et celui de « *tight control* » (contrôle serré).

L'objectif principal de cette prise en charge est de prévenir l'évolution vers une destruction articulaire irréversible et d'améliorer la qualité de vie des patients. Cet objectif peut être atteint par l'obtention d'une rémission clinique ou à défaut d'un niveau de faible activité de la maladie (*Low disease activity*), au moyen de traitements de fond anti-inflammatoires (*Disease Modifying Anti Rheumatic Drug* ou DMARD) répartis en deux classes distinctes. Les traitements de fond dits « synthétiques » (cDMARDs) ayant une action non ciblée sur plusieurs acteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans la pathogénie de la PR. Parmi eux, le méthotrexate (MTX) reste la pierre angulaire du traitement de la PR, le léflunomide, la salazopyrine et l'hydroxychloroquine pouvant aussi



être utilisés en remplacement ou en association avec le MTX. Ensuite, les traitements de fond dits « biologiques » ou « biomédicaments" (bDMARDs) ont une action ciblée sur un acteur cellulaire ou cytokinique, avec plusieurs classes thérapeutiques disponibles dont les anticorps monoclonaux dirigés contre le TNF- $\alpha$  (infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab, golimumab), contre le récepteur à l'IL-6 (tocilizumab) ou contre l'antigène transmembranaire CD20 (rituximab), ou encore l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (anakinra) et les inhibiteurs de la co-stimulation lymphocytaire avec la protéine de fusion Ig-CTLA4 (abatacept) [7].

La stratégie thérapeutique est guidée par la durée d'évolution, l'activité de la maladie et la présence de facteurs pronostiques péjoratifs. Elle repose dans tous les cas sur l'utilisation d'un traitement de fond synthétique en 1<sup>ère</sup> intention, avec possibilité de combinaison à d'autres cDMARDs ou bDMARDs si l'objectif de rémission clinique n'est pas atteint à 6 mois ou si la réponse est jugée insuffisante à 3 mois, ou d'emblée en cas de forte activité de la maladie et de facteurs pronostiques péjoratifs. Selon les concepts de T2T, de « *tight-control* » et les recommandations ACR/EULAR, il est essentiel que l'objectif thérapeutique soit atteint le plus précocement possible, par un contrôle de l'inflammation au moyen des différents DMARDs, et maintenu à long terme. La réponse au traitement doit donc être régulièrement évaluée, pour permettre un changement précoce de stratégie thérapeutique [5-6]. En pratique clinique, l'activité de la maladie, qui permet d'apprécier l'efficacité du traitement est évaluée sur le *Disease Activity Score 28* prenant en compte des paramètres cliniques (nombre d'articulations douloureuses et gonflées, utilisation d'une échelle visuelle analogique d'activité du rhumatisme) et biologiques (VS, CRP) [1, 5-6].

L'arrivée sur le marché des thérapies ciblées et la stratégie de T2T ont permis d'améliorer de façon significative la prise en charge de la PR, avec l'obtention possible d'une rémission clinique à long terme. Cependant, la PR reste une pathologie hétérogène et environ un 1/3 des patients présente une non réponse primaire ou un échappement à ces différents traitements, nécessitant une rotation de DMARDs afin de trouver la molécule la plus efficace, avec un risque d'évolution vers une destruction ostéoarticulaire irréversible. Cette variation interindividuelle de réponse est en partie expliquée par l'influence de l'âge, de la durée d'évolution de la maladie avant traitement, du sexe, du statut tabagique, des fonctions rénales et hépatiques sur la pharmacocinétique mais également par l'activité de la maladie et la physiopathologie de celle-ci, qui peut être différente d'un patient à l'autre au niveau des acteurs cellulaires et/ou moléculaires prédominants.

La recherche de biomarqueurs prédictifs de réponse aux traitements est ainsi cruciale pour la prise en charge personnalisée du patient, car outre le risque d'évolution de la maladie avec ses complications articulaires et générales, la prescription d'un traitement immunomodulateur peut être de plus à l'origine de complications infectieuses, potentiellement sévères, rendant la balance bénéfice-risque défavorable en cas de traitement inefficace pour le patient [8].

## ***1.2 Les différentes sous-populations lymphocytaires d'intérêt dans la PR***

### **1.2.1 Les lymphocytes T « régulateurs »**

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont classés en différents sous-types en fonction des cytokines qu'ils sécrètent et de leurs fonctions dans la réponse immunitaire. Cette classification, longtemps cantonnée à deux sous-types de lymphocytes T auxiliaires ou « helper » appelés Th1 et Th2, a récemment été enrichie par de nouvelles sous populations, notamment les lymphocytes T régulateurs, naturels ou induits, et les lymphocytes pro-inflammatoires Th17 [9].

Les lymphocytes T sont essentiels dans le contrôle de la réponse immunitaire et jouent un rôle important dans la pathogénie de la PR. Il a en effet été mis en évidence une infiltration synoviale de lymphocytes T oligoclonaux dirigés contre des auto-antigènes peptidiques citrullinés. Outre la coopération lymphocytaire T-B par des réactions locales antigènes-spécifiques de type « centre germinatif », les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont impliqués dans la production de cytokines exacerbant l'inflammation locale et conduisant aux modifications micro-architecturales articulaires [2]. De plus, une dérégulation lymphocytaire T est clairement établie avec un déséquilibre de la « balance » entre les lymphocytes auxiliaires CD4<sup>+</sup> Th1 et Th2 [9]. Le rôle des lymphocytes Th1 a été un des premiers rapporté avec la production d'INF- $\gamma$  qui amplifie l'activation des cellules présentatrices d'antigènes et la production de cytokines pro-inflammatoires. Les cytokines produites par les Th1 inhibent les lymphocytes Th2 et inversement [2].

### ***Définition et historique***

La modulation de la réponse lymphocytaire T repose en grande partie sur une sous-population de lymphocytes T appelée T régulateurs (Treg). Ils composent 5 à 10 % de la population des LT CD4<sup>+</sup> sanguins et sont définis par la présence membranaire de CD4 et CD25 (CD4<sup>+</sup> et CD25<sup>++</sup>) et intra-cellulaire du facteur de transcription *forkhead box protein 3* (FoxP3) [9].

Le rôle clef de lymphocytes T  $CD4^+CD25^+$  a d'abord été démontré chez la souris. Cette population empêche l'apparition d'une maladie auto-immune lorsqu'elle est transférée à des souris athymiques reconstituées avec des lymphocytes T  $CD4^+CD25^-$  [10]. Par la suite, plusieurs sous populations de lymphocytes Treg ont été décrites. Il existe des lymphocytes Treg naturels (nTreg) et des lymphocytes T induits (iTreg) en réponse à un antigène. Ils possèdent des propriétés immuno-régulatrices clés sur l'ensemble de la population T. L'action immunomodulatrice des Treg est due à des molécules membranaires comme CTLA4, GITR ou OX40 et à des cytokines comme l'IL-35, l'IL-10 et le TGF $\beta$  [9].

### ***État des connaissances sur les Treg dans la PR***

L'influence des Treg dans la PR a été observée dans des modèles expérimentaux murins puis chez l'homme [9].

Dans un modèle expérimental murin d'arthrite au collagène, la déplétion des cellules  $CD4^+CD25^+$  par un anticorps anti-CD25, 14 jours avant l'apparition des signes cliniques de la maladie, aggrave celle-ci et induit une augmentation des réponses immunes cellulaires et humorales [11] alors que le transfert adoptif est protecteur [12]. De même, l'absence de Treg chez la souris *K/BxN scurfy* induit une arthrite plus sévère et d'apparition plus précoce [13].

Chez l'homme, leur étude quantitative dans le sang périphérique aboutit quant à elle à des résultats variables [14,15]. La plupart des études montre, en revanche, une augmentation du nombre des cellules  $CD4^+CD25^+$  dans le liquide synovial de patients atteints de PR [16].

Au cours de la PR, on constate un déficit fonctionnel des Treg avec une altération de leur activité suppressive [9].

### ***Effet des traitements de la PR sur les Treg***

L'étude des lymphocytes T sous traitement a d'abord montré que les corticoïdes [17], le méthotrexate [18] et les anti-TNF- $\alpha$  [15] n'avaient pas d'influence sur le nombre de Treg dans le sang périphérique de PR.

Puis, l'étude fonctionnelle des Treg a montré qu'avant traitement par anti-TNF- $\alpha$  de patients présentant une PR active, les  $CD4^+CD25^+$  inhibaient la prolifération des Treg, mais pas la production de cytokines par les cellules T et les monocytes. Chez ces patients, les Treg avaient perdu la capacité de convertir les lymphocytes T  $CD4^+CD25^-$  (effecteurs, non régulateurs) en cellules T de phénotype suppressif. Ces déficits étaient levés chez les patients qui répondaient cliniquement aux anti-TNF- $\alpha$ . De plus, chez les répondeurs, le traitement entraînait une augmentation du nombre de Treg [19].

Il a ensuite été montré chez des patients atteints de PR d'évolution récente, traités par MTX, qu'un taux initial élevé de lymphocytes T naïfs était prédictif d'une meilleure réponse thérapeutique [20].

De même, la restauration quantitative des Treg sous traitement anti-TNF- $\alpha$  semble associée à une plus grande probabilité de rémission à long terme et offrirait des perspectives d'arrêt ou au moins de pauses thérapeutiques [21].

Des biomédicaments ciblant spécifiquement la costimulation des lymphocytes T sont utilisés avec succès au cours de la PR, tels que l'abatacept, biomédicament ciblant CD80/86 et reproduisant le rôle physiologique inhibiteur de CTLA4. Une augmentation des lymphocytes T, et notamment des Treg, a été décrite sous abatacept [22].

### 1.2.2 Les lymphocytes Th17

De façon plus récente, l'identification d'une nouvelle sous-population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> produisant l'IL-17, cytokine fortement pro-inflammatoire, les Th17 [23,24], a ouvert la voie à de nouvelles pistes physiopathologiques [25] et à de nouveaux traitements (sécukinumab, ixékizumab...) [26].

#### *Définition et historique*

L'existence puis la fonction et la génération des lymphocytes Th17, nouveau sous-type de lymphocytes T helper, distinct des lymphocytes Th1 et Th2, différenciés sous l'influence de l'IL-23 et produisant de l'IL-17, ont tout d'abord été montrées chez la souris [23, 24].

Une inflammation et des pathologies auto-immunes ont été induites in vivo suite à l'injection chez la souris de lymphocytes T générés in vitro en présence d'IL-23 qui produisent de l'IL-17 : ces lymphocytes ont alors été appelés lymphocytes Th17 [27].

Les lymphocytes Th17, sont caractérisés par une grande plasticité (possibilité de conversion en Th1). Caractérisés sur leur capacité à sécréter de l'IL-17A et IL-17F, ils peuvent également sécréter d'autres cytokines comme l'IL-21 (cette cytokine pouvant faire une boucle d'amplification de la génération des lymphocytes Th17 en présence de TGF $\beta$ ), l'IL-22, l'IL-26, l'IL-6, le TNF- $\alpha$  et le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) [28].

Comme pour les lymphocytes Th1 et Th2, aucun marqueur de surface spécifique des lymphocytes Th17 n'a été identifié à ce jour.

Cependant, la co-expression des récepteurs aux chimiokines CCR4 et CCR6 [29] ou l'expression de CCR2 en l'absence de CCR5 [30] semble permettre une discrimination des lymphocytes Th17 des autres sous-types de lymphocytes.

### ***État des connaissances sur les Th17 dans la PR***

Le rôle de l'IL-23 a été authentifié dans des modèles murins où l'arthrite au collagène n'était pas due à une réaction immunitaire de type TH1 via l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  mais de type TH17 via l'IL-23 [31]. À l'inverse, l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  ont plutôt un effet protecteur en inhibant la production d'IL-17 [32].

L'importance de l'IL-17 dans le développement des arthrites a été confirmée dans des modèles murins : des souris dont le gène de l'IL-17 a été invalidé développent moins d'arthrites que les souris sauvages, et un traitement par anticorps neutralisant l'IL-17 ou par récepteurs solubles de l'IL-17 diminue l'intensité de l'atteinte articulaire [33]. L'IL-17A est augmentée dans le sérum et le liquide synovial de patients atteints de PR [34]. Elle induit la production de cytokines pro-inflammatoires, chimiokines et métalloprotéases par les synoviocytes. Elle stimule la différenciation et l'activation des ostéoclastes par l'expression de RANK et RANK ligand, et favorise la néoangiogenèse synoviale par différents mécanismes [2,35]. Les Th2 peuvent réguler la conversion Th1-Th17 en l'inhibant via la synthèse d'IL-4.

Comme discuté précédemment, la tolérance périphérique est affectée au cours de la PR, avec une diminution du nombre de Treg circulants et un défaut fonctionnel des Treg présents au niveau synovial, incapables de bloquer la différenciation lymphocytaire T en Th1 et Th17. Les Treg présentent également une plasticité importante, et sont affectés par un environnement cytokinique défavorable à leur développement, aboutissant à leur conversion en Th17 [2, 35,36].

Enfin, il a été récemment décrit chez des patients atteints de PR une corrélation inverse entre le taux de Th17 circulant et leur titre d'ACPA, illustrant l'intrication de cette sous-population cellulaire T et de l'immunité humorale au cours de la maladie [37].

### ***Effet des traitements de la PR sur les Th17***

Le taux de Th17 serait augmenté dans le sang des patients atteints de PR débutante et est influencé par les traitements reçus, diminuant significativement sous méthotrexate [38] mais augmentant significativement chez les patients traités par anti-TNF- $\alpha$  et ne répondant pas à l'infliximab [39].

### 1.2.3 Les lymphocytes B « régulateurs »

Les lymphocytes B occupent eux-aussi une place importante dans la genèse de la PR. La production d'Ac variés au cours de la maladie (cf. supra), sans que leur rôle pathogène ou régulateur soit clairement identifié et demeure discuté [40], est là pour l'illustrer.

#### *Définition et historique*

Le terme de lymphocytes B régulateurs (Breg) désigne, par analogie aux Treg, une population de lymphocytes B possédant des propriétés immunorégulatrices [41], jouant un rôle dans la tolérance immunologique périphérique [42]. Un rôle immunosuppresseur des lymphocytes B avait été évoqué dans les années 1970, dans un modèle murin d'hypersensibilité de contact, où on observait une perte de l'effet suppresseur du transfert passif de splénocytes après déplétion en lymphocytes B [42-43]. Ce rôle a été démontré par la suite dans différents modèles murins de maladies auto-immunes. Ainsi, la rémission après injection de l'antigène responsable, chez des souris présentant une encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) et génétiquement déficientes en lymphocytes B, n'était pas aussi efficace que chez les souris sauvages [42]. L'absence de rémission après induction d'une EAE chez des souris déficientes en IL-10 a permis de mettre en évidence l'importance de cette cytokine dans la fonction régulatrice des Breg [42].

La fonction immunorégulatrice des Breg n'est pas seulement caractérisée par la sécrétion importante d'IL-10 par des cellules B, appelées B10, elle l'est aussi par la production (bien que plus faible) de TGF $\beta$ , d'IL-33 et d'IL-35 qui vont modifier l'environnement cytokinique et la balance entre Treg et Th1/Th17, ainsi que par des interactions cellulaires directes via les molécules de costimulation CD80/CD86 et CD28, et par la liaison de molécule du CMH II au TCR des lymphocytes T [42,45]. Les Breg peuvent induire l'anergie ou l'apoptose par des contacts cellulaires via les voies Fas-Fas ligand, CD40-CD40L.

Enfin, ils ont un effet suppresseur indirect par l'induction de Treg, médiée par contact cellulaire CD80/CD86-CD28, et par l'inhibition de la production d'IL-12 par les CPA, diminuant la différenciation lymphocytaire CD4<sup>+</sup> Th1 [42,45]. Au niveau de l'immunité innée, les Breg diminuent la présentation antigénique, l'expression des molécules de co-stimulation et la production cytokinique des CPA [42,45]. Ils interviendraient également dans l'homéostasie des cellules NK par la présentation antigénique non médiée par le CMH mais par l'expression du CD1d [47].



La fonction régulatrice des Breg ne semble pas « innée », contrairement aux Treg qui peuvent provenir de la maturation thymique ou être induits en périphérie. Différents signaux activateurs semblent nécessaires à l'acquisition des fonctions immunosuppressives des Breg par une population progénitrice (B10PRO) [46].

En pratique, l'un des challenges actuels dans l'étude de cette population, est que, contrairement aux Treg, les différents travaux réalisés sur les Breg tant chez la souris que chez l'homme, n'ont pas permis d'identifier de marqueurs phénotypiques spécifiques. Ainsi, l'étude du marquage de l'IL-10 intracellulaire reste le seul moyen actuel pour identifier l'ensemble des B10 qui constitue une population dont l'identification est principalement fonctionnelle. Ceux-ci partagent cependant des marqueurs de surface avec d'autres sous-populations B connues chez la souris avec des phénotypes de type  $CD19^+CD21^{hi}CD23^-IgM^{hi}CD1d^{hi}$ ,  $CD19^+CD21^{hi}CD23^{hi}IgM^{hi}CD1d^{hi}$  ou  $CD19^+CD5^+CD1d^{hi}$ .

Chez l'homme, les phénotypes les plus fréquemment retrouvés comme associés à la production d'IL-10 sont  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ ,  $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$   $CD19^+CD5^+CD1d^+$  [48-52]. Plus récemment ont été décrits des phénotypes de B10  $CD19^+CD25^{hi}$ ,  $CD19^+Foxp3^+$  et  $CD19^+TIM1^+$  [53,54].

Chez l'homme, un défaut quantitatif ou fonctionnel en Breg a été mis en évidence dans différentes maladies auto-immunes (PR, Lupus Erythémateux Systémique, Thrombopénie auto-immune) et allergiques. Mais leur rôle immunorégulateur a également été étudié au cours d'hémopathies malignes (Leucémie Lymphoïde Chronique), de cancers, de la transplantation rénale, de certaines infections virales chroniques (Virus de l'immunodéficience Humaine, virus de l'Hépatite B) et de la grossesse [42,44-46] (figure 2).

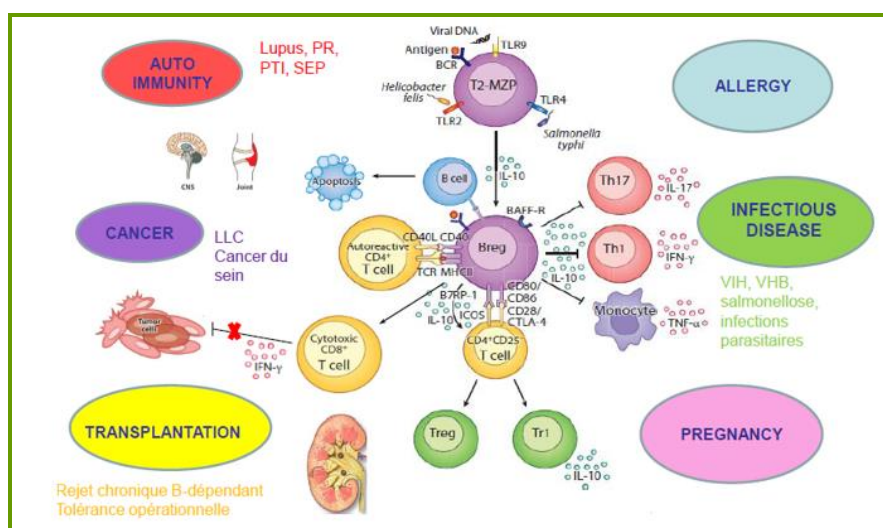


Figure 2 : Place centrale des Breg dans le système immunitaire. D'après Mauri et al. Annu Rev Immunol 2012

## ***État des connaissances sur les Breg dans la PR***

Les études réalisées dans des modèles d'arthrite induite par le collagène ont mis en évidence le rôle protecteur, sur le développement et l'évolution de la maladie, de lymphocytes B producteurs d'IL-10, induits par une stimulation antigène-spécifique et du CD40. Ces lymphocytes présentaient un phénotype T2-PZM ou ZM et étaient capables d'inhiber les réponses lymphocytaires T et la différenciation Th1 et Th17 [42,45,46].

Chez l'homme, l'IL-10 était connue pour ses propriétés immunosuppressives chez les patients atteints de PR, notamment par l'induction de Treg et l'inhibition de la différenciation Th17 [29]. Comme dans le modèle murin, les Breg seraient capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, la différenciation Th1 et Th17 et la production de cytokines pro-inflammatoires de ces sous populations très impliquées dans la pathogénie de la PR. Ils seraient fonctionnellement altérés chez les patients atteints de PR active, par une diminution de leur capacité à induire des Treg à partir de TCD4<sup>+</sup> et à empêcher la conversion des Treg en Th17 [50]. L'existence de Breg au cours de la PR a été décrite par l'étude de Iwata et al. [48]. Un défaut quantitatif et fonctionnel des Breg a été mis en évidence par la suite dans différentes études [50-52].

## ***Effet des traitements de la PR sur les Breg***

Une augmentation des Breg, identifiés par production d'IL-10 et le phénotype immature CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>, a été observée chez des patients traités par rituximab pour une myasthénie [55] et un pemphigus bulleux [56], de façon plus marquée chez les patients présentant une réponse complète par rapport aux patients non répondeurs. Une autre étude rapporte une diminution des lymphocytes B CD5<sup>+</sup> chez des patients atteints de vascularites à ANCA [57]. Après traitement par rituximab, les patients chez qui une normalisation du taux de leurs lymphocytes B CD5<sup>+</sup> était observée avaient une durée de réponse sans rechute plus importante que les patients conservant un taux bas ou une augmentation de moins de 30 % de leurs CD5<sup>+</sup>. De plus, une augmentation du taux de CD5<sup>+</sup> chez les patients traités était associée à une rechute de la maladie. Une corrélation était observée entre le taux de CD5<sup>+</sup> et celui des lymphocytes B CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> [58].

Au cours de la PR, dans l'étude de Daien et al. un taux initial élevé de Breg semblait prédictif de réponse clinique EULAR à 3 mois sous anti-TNF- $\alpha$  [52].



### ***1.3 Objectifs de l'étude CELyPOR :***

L'objectif principal de notre étude CELyPOR était de décrire ces différentes sous-populations lymphocytaires (B et T régulatrices, Th17) avant et sous administration d'un biomédicament au cours de la PR dans le but de rechercher une corrélation avec la réponse au traitement reçu.

Les objectifs secondaires de l'étude étaient de :

- Comparer le taux des différentes sous-populations lymphocytaires étudiées (B et T régulatrices, Th17) avant la mise en place du biomédicament chez des patients atteints de PR et des témoins non traités et indemnes de toute pathologie inflammatoire ou dysimmunitaire;
- Déterminer s'il existe une corrélation entre les différentes sous-populations lymphocytaires étudiées chez les patients et les témoins à l'inclusion puis après administration d'un biomédicament à 1, 3 et 6 mois de traitement ;
- Comparer le taux initial et l'évolution des différentes sous-populations lymphocytaires étudiées sous biomédicament en fonction du type de biomédicament administré ;
- Evaluer la capacité des Breg circulants à produire de l'IL-10 chez des patients atteints de PR avant et au cours de la prise d'un biomédicament et chez des témoins.

Le bénéfice principal attendu de l'étude CELyPOR serait une meilleure compréhension de l'impact des biomédicaments sur l'évolution de différentes sous populations lymphocytaires. Celle-ci pourrait aussi conduire à l'identification d'un marqueur biologique initial pouvant être utilisé comme biomarqueur prédictif de la réponse thérapeutique, et comme biomarqueur d'efficacité au cours du suivi.

## 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

---

### 2.1 Étude CELyPOR

#### 2.1.1 Plan de l'étude

Il s'agit d'une étude pilote monocentrique, prospective, descriptive, non randomisée, approuvée par le CCP Nord-Ouest 2 et l'ANSM (n°2015-000833-64). La durée prévue de l'étude était de 18 mois, avec une période d'inclusion de 12 mois et une durée de participation pour chaque patient de 6 mois. L'effectif prévu était de 30 patients et 15 témoins contrôles.

La stratégie thérapeutique était l'initiation ou le switch d'un biomédicament chez des patients atteints de PR active en accord avec les dernières recommandations ACR/EULAR. Le recrutement des patients a été réalisé dans le service de rhumatologie du CHU d'Amiens. Tout patient inclus a bénéficié d'une information orale et écrite avec recueil de consentement écrit.

Les patients remplissant les critères d'inclusion bénéficiaient lors de leur visite d'inclusion, avant la première administration du biomédicament, d'un examen clinique complet avec recueil des antécédents, allergies, traitements, de l'histoire de la maladie, de l'EVA douleur, EVA activité, du nombre de réveils nocturnes, de la durée de dérouillage matinal, mesure du poids, de la taille, détermination du nombre d'articulations douloureuses et gonflées, calcul du DAS 28 et du HAQ. Un bilan structural avec réalisation de radiographies standards des mains et des pieds (de face et de  $\frac{3}{4}$ ) et d'une échographie ostéo-articulaire était réalisé. Ils bénéficiaient également d'une prise de sang comprenant une numération de la formule sanguine, une électrophorèse des protéines sériques, une mesure des marqueurs de l'inflammation (VS, CRP), des immunoglobulines (IgA, M, G), un bilan hépatique, lipidique, immunologique (FR, ACPA). L'analyse quantitative des sous-populations lymphocytaires et fonctionnelle des Breg a été réalisée par nos soins dans le laboratoire d'immunologie du CHU d'Amiens. Les patients bénéficiaient d'un suivi avec réalisation du même bilan à 1, 3 et 6 mois de traitement sauf pour les bilans immunologique et structural qui n'étaient renouvelés qu'à 6 mois.

### 2.1.2 Critères d'évaluation

Compte-tenu des objectifs principaux et secondaires annoncés précédemment, les critères de jugement étaient :

#### *Le critère de jugement principal :*

- Le taux et la valeur absolue de lymphocytes B et T régulateurs circulant ainsi que des lymphocytes Th17 exprimés en pourcentage et en valeur absolue par mm<sup>3</sup>. Ce critère était mesuré par cytométrie en flux multicolore (CMF) à chaque temps de l'étude, c'est-à-dire à l'inclusion (M0), à 1 mois (M1), 3 mois (M3) et 6 mois de l'administration du biomédicament (M6).
- La réponse au traitement évaluée par la réponse clinique EULAR et la rémission DAS 28 à M6.

#### *Les critères d'évaluation secondaires :*

- Le statut auto-immun des patients par mesure du FR, des ACPA (anti-CCP).
- Le caractère érosif de la PR par la réalisation de clichés radiographiques et d'une échographie des mains et des pieds à M0 et M6.
- L'activité de la PR évaluée par le calcul du DAS 28 VS et CRP et du HAQ
- Le type de biomédicament administré : anti-cellulaire (abatacept) ou anti-TNF- $\alpha$ .
- Le taux de lymphocytes B IL10<sup>+</sup> mesuré par CMF à M0, M1, M3 et M6.

### 2.1.3 Critères d'inclusion et de non inclusion

Étaient inclus les patients majeurs présentant une PR répondant aux critères ACR/EULAR 2010 active malgré un traitement de fond conventionnel ou un biomédicament et dont le recours à une initiation ou un switch de tout biomédicament sauf le rituximab en association avec le MTX était préconisé selon les dernières recommandations ACR/EULAR et celles de la SFR. Les critères de non inclusion étaient l'incapacité de donner son consentement pour la participation à l'étude (curatelle/tutelle), une grossesse en cours ou envisagée, une contre-indication au biomédicament employé, une infection évolutive, la prise concomitante ou depuis moins de 3 mois d'une corticothérapie à dose supérieure à 10 mg/j, la prise concomitante d'autres traitements immunosuppresseurs. En cas de traitement antérieur par une autre biothérapie, celle-ci devait avoir été arrêtée depuis au moins 1 mois avant l'inclusion, 1 an pour le rituximab ( $\geq 5$  demi-vies en fonction des molécules).

Étaient inclus dans le groupe contrôle de témoins : des patients majeurs, hospitalisés dans le service de Rhumatologie du CHU d'Amiens pour une pathologie « mécanique » (ostéoporose, pathologie abarticulaire) ou une lombosciatique. Les critères de non inclusion étaient un antécédent de PR ou d'autre rhumatisme inflammatoire chronique, une pathologie auto-immune ou dysimmunitaire, allergique chronique, néoplasique ou infectieuse évolutive, la prise d'un traitement immunosuppresseur ou susceptible d'engendrer une lymphopénie.

## **2.2 Analyse quantitative des sous populations lymphocytaires par cytométrie en flux**

### **2.2.1 Phénotypage lymphocytaire**

Le phénotypage lymphocytaire était réalisé sur sang total prélevé dans un tube EDTA. Les anticorps monoclonaux conjugués à un fluorochrome ont été choisis après revue de la littérature. Ceux utilisés pour le phénotypage des lymphocytes B étaient les suivants : Ac anti IgD humain conjugué au FITC (fluorescéine-isothiocyanate) (clone IA6-2), CD24 humain conjugué au PC5.5 (phycoérythrine-cyanine) (clone ALB9), CD27 humain conjugué au PC7 (clone 1A4CD27), CD38 humain conjugué à l'APC (allophycocyanine) (clone LS198-4-3), CD19 de souris conjugué à l'APC-AlexaFluor 750 (clone J3.119), CD5 humain conjugué au PB (Pacific Blue) (clone BL1a), CD45 de souris conjugué au KO (Krome Orange) (clone J33), CD1d humain conjugué au PE (Phycoérythrine) (clone 51.1).

Pour les lymphocytes T : CD45Ra de souris conjugué au FITC (clone ALB11), CD45Ro de souris conjugué au PE (clone UCHL1), CD62L humain conjugué à l'ECD (clone DREG56), CD25 humain conjugué au PC5.5 (clone B1.49.9), CD161 humain conjugué au PC7 (clone 191B8), CD127 humain conjugué à l'APC-AlexaFluor 700 (clone R34.34), CD3 de souris conjugué à l'APC Alexa Fluor 750 (clone UCHT1), CD4 humain conjugué au PB (clone 13B8.2), CD45 de souris conjugué au KO (Krome Orange) (clone J33), CCR6 (CD196) humain conjugué à l'APC (clone G034E3). Tous les anticorps provenaient de chez Beckmann-Coulter® sauf CD1d-PE et CCR6-APC de chez BioLegend®.

Après marquage et incubation de 15 minutes à température ambiante dans l'obscurité, les cellules subissaient une lyse par TQPrep. L'acquisition des données était réalisée sur cytomètre Navios A80706 (3 lasers, 10 couleurs) et analysée sur logiciel Kaluza® (Beckman & Coulter®). La valeur absolue de lymphocytes par microlitre a été déterminée par l'utilisation de billes Flow count fluorospheres Beckmann-Coulter®. Un nombre minimum de 20 000 lymphocytes a été analysé pour chaque échantillon.

## 2.2.2 Populations lymphocytaires étudiées et stratégie de *gating*

En ce qui concerne la stratégie de *gating* des sous-populations lymphocytaires, les lymphocytes ont été identifiés à partir d'un histogramme biparamétrique sur la structure (*Side Scatter*, SS) et l'expression du CD45 puis sur la taille (*Forward Scatter*, FS) et la structure (SS). Les populations lymphocytaires T et B étaient respectivement identifiées sur l'expression monoparamétrique du CD3 et du CD19.

Pour les lymphocytes B (*figure 3*), la population  $CD5^+$  était sélectionnée en histogramme biparamétrique sur l'expression du CD19 et du CD5. L'expression conjointe du CD24 et CD27, ou du CD24 et CD38 était étudiée sur la population lymphocytaire B totale, de même que celle du CD5 et du CD1d. L'expression de l'IgD et du CD27 permettait d'identifier les populations naïves et mémoires. Les Breg étaient définis comme étant les populations  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$  (Breg 24-38) et  $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$  (Breg24-27).

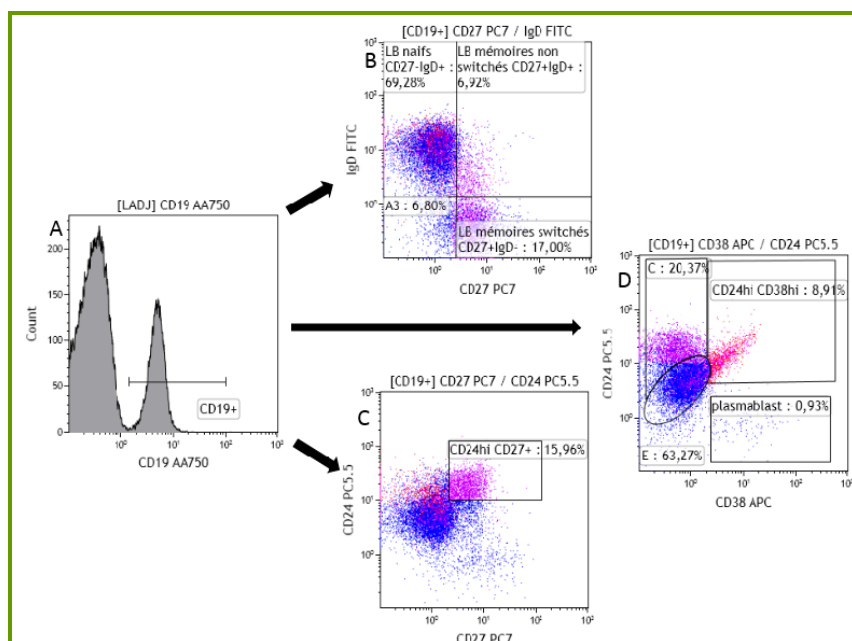


Figure 3 : Stratégie de *gating* des lymphocytes B (A : Expression monoparamétrique du CD19 ; B : Sous populations naïve  $CD27^-IgD^+$ , mémoire non switchée  $CD27^+IgD^+$ , mémoire switchée  $CD27^+IgD^-$  ; C : Breg 24-27 ; D : Breg 24-38)

Concernant les lymphocytes T (*figure 4*), les Treg étaient identifiés parmi les  $TCD4^+$  comme la population  $CD25^{hi}CD127^{low}$ . Enfin la population Th17 était identifiée parmi les  $TCD4$  mémoires ( $CD45RA^-$ ) sur l'expression du CD161 et du CD196 (CCR6), comme la population  $CD3^+CD4^+CD45RA^-CD161^+CCR6^+$ . Les populations  $TCD4^+$ , naïves, mémoires centrales et effectrices étaient identifiées sur l'expression du CD45RA/CD45RO et du CD62L.

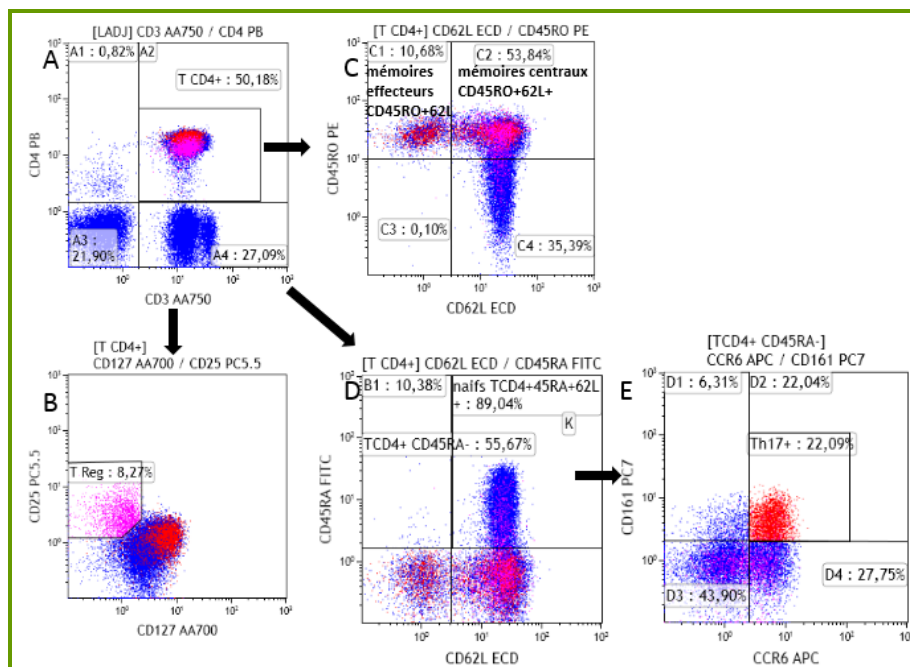


Figure 4 : Stratégie de gating des lymphocytes T (A :  $CD3^+CD4^+$  ; B : Treg  $CD25^{hi}CD127^{low}$  ; C : mémoires effecteurs  $CD45RO^+62L^-$ , mémoires centraux  $CD45RO^+62L^+$  ; D : Naïfs  $CD4^+45RA^+62L^+$  ; E : Th17 :  $CD45RA^-CD161^+CCR6^+$

## 2.3 Analyse fonctionnelle des Breg par détection de leur production d'IL-10

### 2.3.1 Recueil cellulaire

L'étude fonctionnelle de la production d'IL10 par les Breg a été réalisée sur sang frais, à partir de cellules mononucléées.

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont été isolées après gradient de Ficoll (milieu de séparation des lymphocytes, sterile filtered, densité 1,077+/-0,001, Eurobio®) à partir de sang veineux prélevé sur tube EDTA de 7,5mL. Le gradient de Ficoll était ensuite immédiatement débuté en conditions stériles. Après le dernier lavage, le culot cellulaire était ajusté dans un volume de 1mL de RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®). Une numération des PBMC ainsi isolés était effectuée sur automate Advia 2120i.

### 2.3.2 Stimulation des PBMC pour la production d'IL10

Après réalisation du gradient de Ficoll, les cellules mononucléées étaient utilisées pour détecter la production d'IL-10 par les lymphocytes B régulateurs. La quantité de milieu de culture était calculée afin d'obtenir une concentration cellulaire à  $2 \times 10^6$  cellules par mL. Le milieu de culture enrichi utilisé se composait de : RPMI 1640, 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Dominique Dutscher®), 100UI/mL de pénicilline-streptomycine

(Sigma-Aldrich®), 4mM/mL de L-Glutamine (GlutaMAX®, Invitrogen®) et 1mM/mL de pyruvate de sodium (Gibco by Life Technologies®).

Les cellules étaient dispensées dans des plaques 24 puits à raison de 1mL par puits avec de la Brefedine A (BFA, GolgiPlug, BD Biosciences®) à 1µL/mL. Pour les conditions stimulées, du CpG-B2006 (ODN7909, InVivogen,) à une concentration de 3 µg/mL, du PMA (Santa Cruz Biotechnology®) à 50ng/mL et de la ionomycine (Calbiochem®) à 1µg/mL étaient ajoutés.

Les cellules étaient ensuite incubées à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>, pendant 5 heures.

Une fois la mise en culture et la stimulation terminées, nous procédions à la technique de détection de la production d'IL-10 par les lymphocytes B régulateurs, qui se déroulait en 3 étapes principales avec le kit Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences®) :

- Marquage des antigènes de surface avec les anticorps suivants : CD3-PC7, CD19-A750 (Beckman-Coulter), et ajout d'un marqueur de viabilité (Fixable Viability Dye eFluor 450, eBioscience).
- Fixation et perméabilisation avec les solutions fournies dans le kit.
- Marquage de la cytokine d'intérêt intracellulaire avec l'anticorps anti-IL-10-PE (clone JES3-9D7, BD pharmingen®).

Les lymphocytes B régulateurs IL-10<sup>+</sup> étaient ensuite détectés par CMF grâce à l'expression conjointe du CD19 et de l'IL-10 (parmi les cellules vivantes et les singulets).

## 2.4 Analyse statistique

Les caractéristiques des patients étaient décrites en pourcentage pour les variables catégorielles et en médiane et 25<sup>ème</sup> et 75<sup>ème</sup> percentiles [interquartile range : IQR] pour les variables continues. Les différences de pourcentage ou de valeur absolue des populations lymphocytaires étaient évaluées par le test non paramétrique de Mann-Whitney, de Wilcoxon en cas de données appariées, ou par le test de Friedman en cas de comparaison multiple. Les corrélations entre les différentes sous-populations lymphocytaires (Breg, Treg et Th17) étaient évaluées en utilisant le test de Spearman. Un  $p < 0,05$  était considéré comme le seuil de significativité des tests statistiques avec si besoin, une correction par le nombre de tests effectués. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce aux logiciels Excel, SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), SAS 9.3 (*Statistical Analysis System*) pour T test et procédures GLM et mixte pour les modèles à analyses répétées.



### 3. RÉSULTATS

#### 3.1 Caractéristiques des patients et témoins à l'inclusion

Ont été inclus prospectivement 31 patients et 17 témoins dans le service de rhumatologie du CHU d'Amiens entre Novembre 2014 et Octobre 2015 dont les caractéristiques sont détaillées dans le tableau ci-dessous (*Tableau 1*). Il y a eu 2 patients sortis d'étude à M1 et 3 à M6. Il s'agissait d'une initiation de biomédicament pour 17 patients (54,8%) et d'un switch pour les 14 autres (45,16%). Les biomédicaments dispensés étaient l'abatacept pour 12 patients (38,7%), le tocilizumab pour 6 (19,4%), le golimumab pour 5 (16,1%), l'etanercept pour 6 (22,6%) et le certolizumab pour 1 des patients (3,2%). La valeur médiane de la VS était de 14 mm [IQR 6-31] et celle de la CRP à 7,9 mg/L [3-23,2]. La valeur médiane du HAQ était de 1,63 [1-2] et celle du DAS28 de 4,24 [3,70-5,32]. Il n'existait pas de différence significative entre les patients et les témoins en termes de sexe ( $p=0,367$ ), âge ( $p=0,131$ ), IMC ( $p=0,343$ ), d'antécédent de tabagisme ( $p=0,127$ ) et de consommation en paquet année ( $p=0,094$ ).

	Patients atteints de PR (n=31)	Témoins (n=17)	p
<b>Femmes</b>	58,1% (n=18)	41,2% (n=7)	0,367
<b>Age</b>	57 [48-61]*	41 [29-68]*	0,131
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	25,8 [22,2-33]*	24,0 [22,16-26,30]*	0,343
<b>ATCD de tabagisme</b>	48,4% (n=15)	23,5% (n=4)	0,127
<b>Consommation (paquet année)</b>	20 [11-28]*	0 [0-5]*	0,094
<b>PR récente ≤ 2 ans</b>	32,3% (n=10)	-	
<b>Anticorps</b>			
- <b>FR+</b>	74,2% (n=23)	-	
- <b>ACPA+</b>	80,6% (n=25)	-	
<b>Atteinte structurale (érosions)</b>	41,9% (n=13)	-	
<b>AINS</b>	12,9% (n=4)	-	
<b>Corticoïdes</b>	54,8% (n=17)	-	
<b>Posologie médiane (mg/j)</b>	5 [5-6]*	-	
<b>Méthotrexate</b>	64,5% (n=20)	-	
<b>Posologie médiane (mg/semaine)</b>	15 [10-20]*	-	
<b>Initiation (1<sup>ère</sup> ligne de biomédicament)</b>	54,8% (n=17)	-	
<b>Abatacept</b>	38,7% (n=12)	-	
<b>Tocilizumab</b>	19,4% (n=6)	-	
<b>Anti-TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Golimumab</b>	16,1% (n=5)	-
	<b>Etanercept</b>	22,6% (n=7)	-
	<b>Certolizumab</b>	3,2% (n=1)	-
<b>VS (mm)</b>	14 [6-31]*	-	
<b>CRP (mg/L)</b>	7,9 [3,0-23,2]*	-	
<b>DAS28</b>	4,24 [3,70-5,32]*	-	
<b>DAS28-CRP</b>	4,42 [3,69-5,11]*	-	
<b>HAQ</b>	1,63 [1-2]*	-	

Tableau 1 : Caractéristiques des patients et témoins à l'inclusion. \* Résultats exprimés en médiane et 25<sup>ème</sup> et 75<sup>ème</sup> percentiles. Test de Mann-Whitney pour les variables quantitatives ; test exact de Fisher pour les tests d'effectifs (H/F, antécédent de tabac).



### 3.2 Sous-populations lymphocytaires des patients et témoins à l'inclusion

Nous avons comparé le pourcentage et le nombre par  $\text{mm}^3$  de lymphocytes, lymphocytes B, Breg24-38, Breg24-27, Treg et Th17, entre les patients avant la mise en place du nouveau biomédicament et les témoins.

Concernant les lymphocytes totaux et lymphocytes B, il n'existait pas de différence significative en pourcentage ( $p=0,413$  et  $p=0,651$  respectivement) et valeur absolue ( $p=0,974$  et  $0,957$  respectivement).

Par contre, les Breg 24-38 (figure 5) étaient significativement abaissés chez les patients par rapport aux témoins en pourcentage et en valeur absolue ( $p<0,001$  et  $p=0,014$  respectivement). Pour les Breg 24-27, il n'existait aucune différence significative en pourcentage ( $p=0,612$ ) ou en valeur absolue ( $p=0,185$ ).

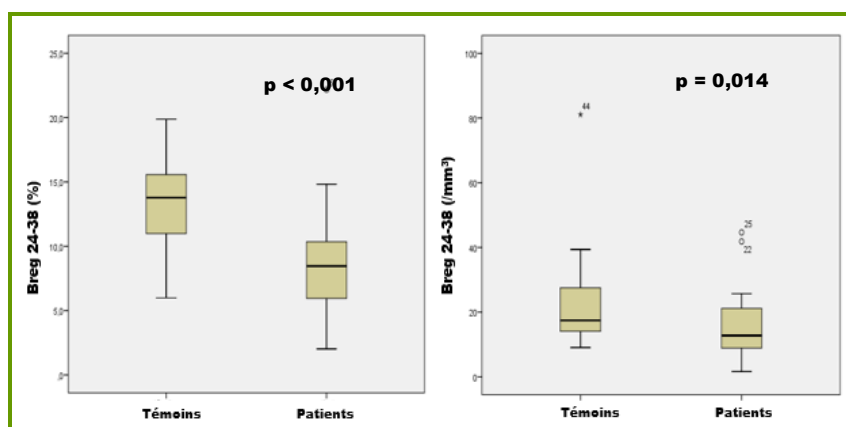


Figure 5 : Comparaison de l'expression des Breg24-38 à l'inclusion en pourcentage (%) et valeur absolue (cellules/ $\text{mm}^3$ ) chez les patients ( $n=31$ ) et les témoins ( $n=17$ ) ; représentation par box-plots avec médiane et IQR ; différence observée entre les 2 groupes selon le test de Mann-Whitney.

Concernant les Th17 (figure 6), ils étaient significativement plus élevés en pourcentage ( $p=0,036$ ) mais pas en valeur absolue ( $p=0,539$ ) chez les témoins.

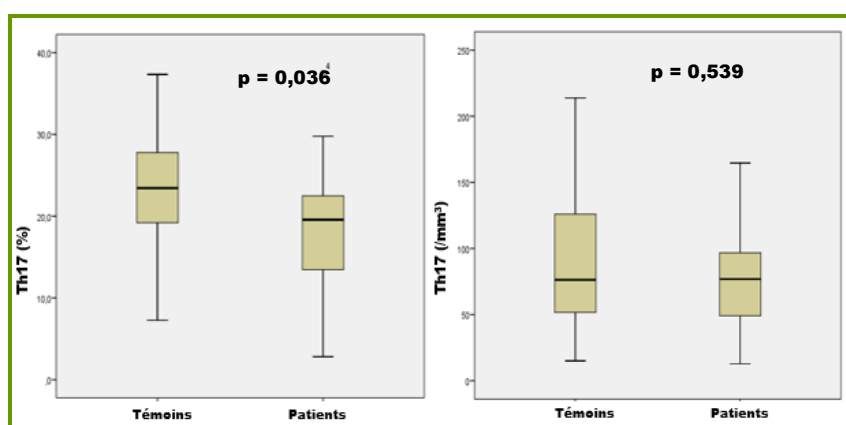


Figure 6 : Comparaison de l'expression des Th17 à l'inclusion en pourcentage (%) et valeur absolue (cellules/ $\text{mm}^3$ ) chez les patients ( $n=31$ ) et les témoins ( $n=17$ ) ; représentation par box-plots avec médiane et IQR ; différence observée entre les 2 groupes selon le test de Mann-Whitney.

Concernant les Treg, il n'y avait pas de différence significative entre les témoins et les patients tant en pourcentage ( $p=0,223$ ) qu'en valeur absolue ( $p=0,371$ ).

Les données précédentes sont récapitulées dans le tableau 3.

Populations lymphocytaires	Patients (n=31)	Témoins (n=17)	p
<b>Lymphocytes</b>			
(%)	23,8 [17,0-30,0]	18,6 [13,6-28,5]	0,413
(/mm <sup>3</sup> )	1600 [1300-2000]	1700 [1050-1950]	0,974
<b>TCD4+</b>			
(%)	53,5 [47,0-60,9]	51,7 [44,8-58,1]	0,779
(/mm <sup>3</sup> )	723 [569-1081]	739 [549-955]	0,821
<b>Treg</b>			
(%)	6,4 [4,9-8,1]	7,1 [6,3-8,3]	0,223
(/mm <sup>3</sup> )	49 [35-65]	56 [44-68]	0,371
<b>Th17</b>			
(%)	19,6 [13,2-22,7]	23,4 [18,6-28,4]	0,036*
(/mm <sup>3</sup> )	77 [45-97]	76 [51-135]	0,539
<b>Lymphocytes B</b>			
(%)	11,1 [8,2-17,6]	10,0 [7,3-14,4]	0,651
(/mm <sup>3</sup> )	156 [95-278]	151 [122-195]	0,957
<b>Breg24-38</b>			
(%)	8,5 [5,9-10,5]	13,8 [10,9-15,6]	<0,001**
(/mm <sup>3</sup> )	13 [9-22]	17 [14-31]	0,014*
<b>Breg24-27</b>			
(%)	16,3 [13,1-28,6]	18,8 [11,9-24,5]	0,612
(/mm <sup>3</sup> )	33 [20-45]	23 [19-34]	0,185

Tableau 3 : Mesure des lymphocytes totaux, Treg, Th17, lymphocytes B, Breg24-38, Breg24-27 en valeur absolue (cellule par mm<sup>3</sup>) et pourcentage des patients et témoins à l'inclusion ; expression en médiane et IQR ; différence observée entre les 2 groupes selon le test de Mann-Whitney. \*  $p<0,05$  \*\* $p<0,001$ .

### 3.3 Association entre le statut immunologique et radiographique des patients et les sous populations lymphocytaires à l'inclusion

Nous avons comparé le pourcentage et le nombre par mm<sup>3</sup> de Breg24-38, Breg24-27, Treg et Th17, avant la mise en place du biomédicament, entre les patients présentant un FR positif (n=23) ou négatif (n=8), des ACPA positifs (n=25) ou négatifs (n=6) et une atteinte structurale (n=13) ou non (n=18).

Il existait une association inverse entre la présence de FR et le taux de Breg 24-38 en valeur absolue ( $p=0,016$ ) avec une médiane à 10,99/mm<sup>3</sup> [8,12-16,58] pour les patients FR positif *versus* 23,1/mm<sup>3</sup> [16,03-24,74] pour les patients FR négatif (figure 7). Ceci n'était pas retrouvé pour les autres sous populations lymphocytaires.

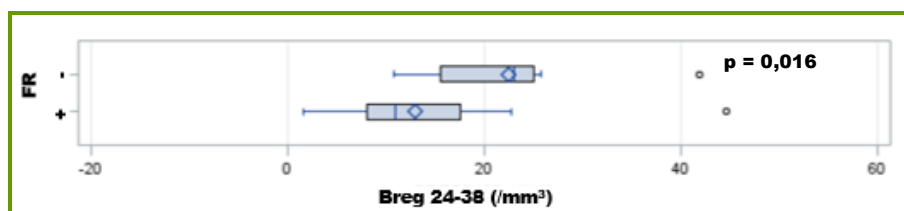


Figure 7 : Comparaison du taux de Breg 24-38 à l'inclusion en valeur absolue (cellules/mm<sup>3</sup>) chez les patients FR positif (n=23) et les patients FR négatif (n=8) ; représentation par box-plots avec médiane et IQR ; différence observée entre les 2 groupes selon le T test.

Par contre, il n'existait pas d'association entre la présence d'ACPA ou le caractère érosif initial de la PR et les différentes sous populations lymphocytaires.

### 3.4 Corrélation entre sous populations lymphocytaires chez les patients et témoins

Nous avons ensuite testé une éventuelle corrélation entre Breg, Treg et Th17 en pourcentage et valeur absolue, chez les patients aux différents temps de traitement et chez les témoins à l'inclusion.

Chez les témoins à l'inclusion (n=17), il existait une corrélation positive entre Treg (Figure 8) et Breg 24-38 en valeur absolue (r=0,50 et p=0,041). Il existait également une corrélation positive entre Treg et Th17 en valeur absolue (r=0,740 et p=0,001). Concernant les Breg 24-27 il n'existait pas de corrélation avec les Th17, Treg ni les Breg 24-38 en valeur absolue comme en pourcentage.

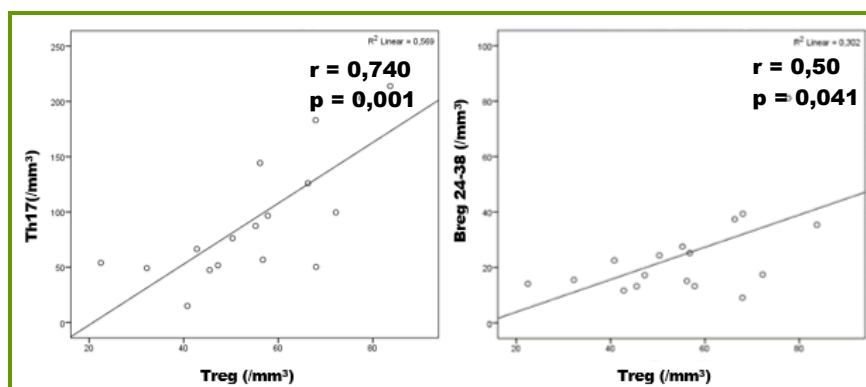


Figure 8 : Corrélation entre Treg et Th17 et Treg et Breg24-38 en valeur absolue (cellules/mm<sup>3</sup>) à l'inclusion chez les témoins (n=17).

Chez les patients (Figure 9), à l'inclusion (n=31), il existait une corrélation positive entre Treg et Th17 en valeur absolue (r= 0,579 et p=0,001). Il existait également une corrélation inverse entre Breg 24-27 et Breg 24-38 en pourcentage (r=-0,368 et p=0,041) mais une corrélation positive en valeur absolue (r=0,399 et p=0,026). Il existait par ailleurs une corrélation positive entre Breg 24-27 et Th17 en valeur absolue (r=0,375 et p=0,037). Il n'existait pas de corrélation entre Breg (24-38 et 24-27) et Treg ni entre Breg 24-38 et Th17.

Après 1 (n=29), 3 (n=29) et 6 mois (n=26) de traitement, il n'existait pas non plus de corrélation entre Breg (24-38 et 24-27) et Treg.

Il existait une corrélation entre Treg et Th17 en valeur absolue à M1 (r=0,466 et p=0,011) et M6 (r=0,497 et p=0,010) mais pas à M3.

Il existait par ailleurs une corrélation inverse entre Breg 24-27 et 24-38 en pourcentage à M1 ( $r=-0,396$  et  $p=0,033$ ), M3 ( $r=-0,445$  et  $p=0,016$ ), M6 ( $r=-0,682$  et  $p<0,001$ ). Il existait une corrélation entre Breg 24-38 et Th17 à M1 ( $r=0,385$  et  $p=0,039$ ) en valeur absolue et à M3 en pourcentage ( $r=0,383$  et  $p=0,040$ ) mais pas à M6. Il existait une corrélation entre Breg 24-27 et Th17 uniquement à M1 en valeur absolue ( $r=0,513$  et  $p=0,004$ ).

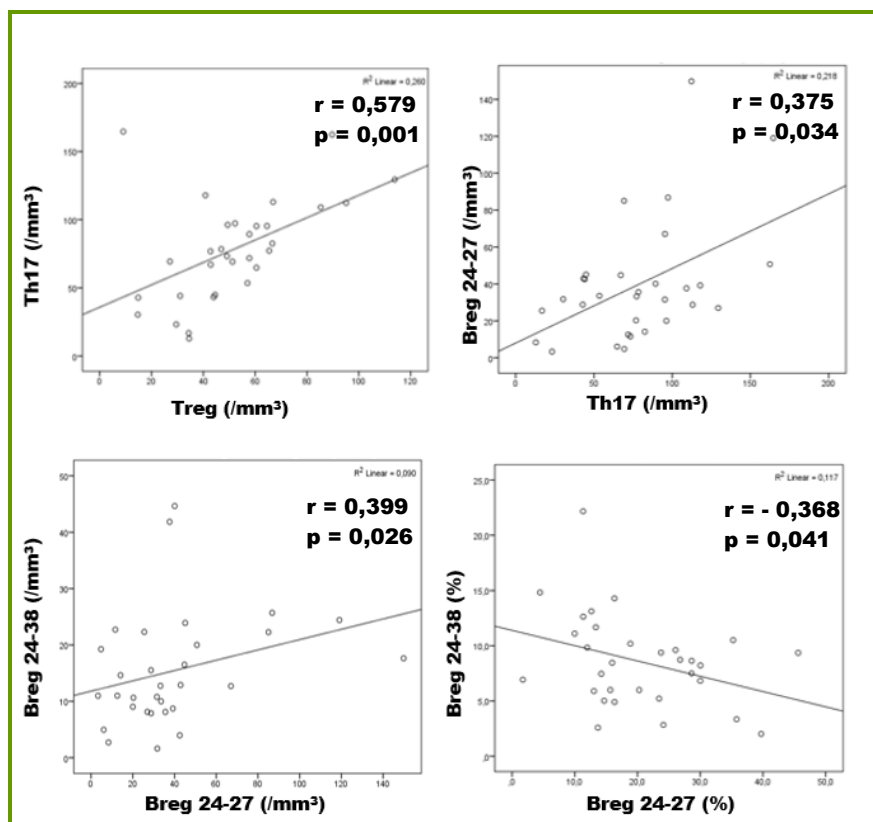


Figure 9 : Corrélation entre Treg et Th17, Breg24-27 et Th17 en valeur absolue (cellules/mm<sup>3</sup>) et Breg 24-38 et Breg 24-27 en valeur absolue et pourcentage (cellules/mm<sup>3</sup>) à l'inclusion chez les patients (n=31) selon le test de corrélation de Spearman.

### 3.5 Évolution des sous populations lymphocytaires sous biomédicament

Nous avons comparé chez les patients l'évolution des lymphocytes totaux, B, Breg24-38, Breg24-27, Treg et Th17, entre M0 (n=31), M1 (=29), M3 (=26) et M6 (=26).

Il n'existait pas d'évolution statistiquement significative en pourcentage comme en valeur absolue entre les différents temps de traitement concernant les lymphocytes totaux ( $p=0,140$ ,  $p=0,117$ ) lymphocytes B ( $p=0,077$ ,  $p=0,989$ ), Breg 24-38 ( $p=0,099$ ,  $p=0,489$ ), Breg 24-27 ( $p=0,246$ ,  $p=0,813$ ) et Th17 ( $p=0,928$ ,  $p=0,958$ ).

Concernant les Treg (figure 10), il existait globalement une différence significative en pourcentage ( $p=0,048$ ) mais pas en valeur absolue ( $p=0,702$ ), entre les 4 temps de mesure (M0, M1, M3 et M6), cette différence provenant d'une diminution statistiquement significative entre M0 et M1 ( $p=0,008$ ) puis d'un retour aux valeurs initiales.

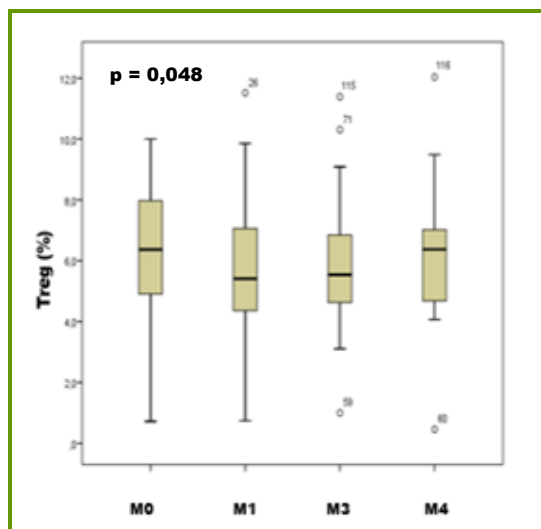


Figure 10 : Evolution des Treg chez les patients sous biomédicament en pourcentage (%) entre M0 (n=31), M1 (n=29), M3 (n=29) et M6 (n=26) ; représentation par box-plots avec médiane et IQR. Test de Kruskal-Wallis puis test de Wilcoxon ensuite si résultat significatif.

Les données précédentes sont récapitulées dans le tableau 4.

Populations lymphocytaires	Patients M0 (n=31)	Patients M1 (n=29)	Patients M3 (n=29)	Patients M6 (n=26)	p (6 mois)
<b>Lymphocytes</b>					
(%)	23,8 [18,2-29,9]*	29,8 [17,9-36,7] *	28,9 [22,9-33,4] *	29,55 [20,95-36,8] *	0,140
(/mm)	1600 [1300-2000]*	1600 [1300-2200] *	1900 [1500-2300] *	1550 [1300-1900] *	0,117
<b>Lymphocytes B</b>					
(%)	11,07 [8,28-16,05]*	11,60 [8,94-17,47]*	12,42 [8,44-15,96]*	10,365 [8,38-14,52]*	0,077
(/mm <sup>3</sup> )	156,15 [95,5-270,2]*	201,57 [143,02-314,80]*	192,63 [122,65-260,56]*	180,66 [119,86-255,99]*	0,989
<b>Breg24-38</b>					
(%)	8,46 [5,95-10,35]*	6,43 [4,31-9,92]*	8,54 [6,35-12,5]*	9,35 [5,93-12,65]*	0,099
(/mm)	12,75 [8,88-21,15]*	13,47 [8,85-24,43]*	15,29 [9,06-28,36]*	15,81 [8,40-22,83]*	0,489
<b>Breg24-27</b>					
(%)	16,34 [13,2-27,71]*	18,53 [15,02-31,61]*	20,16 [14,81-30,26]*	23,33 [14,02-33,00]*	0,246
(/mm <sup>3</sup> )	33,26 [20,1-43,84]*	34,87 [23,29-65,00]*	35,22 [22,38-66,29]*	35,54 [17,28-55,98]*	0,813
<b>Treg</b>					
(%)	6,37 [4,91-7,98]*	5,41 [4,36-7,06]*	5,54 [4,63-6,85]*	6,38 [4,87-7,02]*	0,048 ↓ entre M0 et M1 0,008
(/mm <sup>3</sup> )	49,40 [37,6-62,52]*	40,36 [30,60-60,24]*	47,7 [35,89-65,28]*	51,20 [34,97-66,14]*	0,702
<b>Th17</b>					
(%)	19,57 [13,4-22,48]*	19,0 [12,87-24,39]*	19,01 [14,63-23,90]*	19,50 [14,40-25,85]*	0,928
(/mm <sup>3</sup> )	76,85 [49,1-96,77]*	76,4 [47,75-112,7]*	77,10 [61,80-113,43]*	77,27 [65,66-91,44]*	0,958

Tableau 4 : Evolution des populations lymphocytaires (Lymphocytes B, Breg 24-38, Breg 24-27, Treg et Th17) en valeur absolue (cellules/mm<sup>3</sup>) et pourcentage (%) des patients aux différents temps de traitement M0 (n=31), M1 (n=29), M3 (n=29) et M6 (n=26) et différence observée; expression en médiane et IQR, Test de Kruskal-Wallis puis test de Wilcoxon ensuite si résultat significatif.

### 3.6 Évolution des sous populations lymphocytaires selon le type de biomédicament

Nous avons décrit l'évolution des Breg, Treg et Th17 selon le type de traitement reçu : d'abord (i) abatacept (n=12), traitement dit "à visée anti-cellulaire" *versus* les autres biomédicaments (n=19) à visée "anti-cytokinique" (anti-TNF- $\alpha$  (n=13) et tocilizumab (n=6)) puis (ii) anti-TNF- $\alpha$  (n=13) vs abatacept et tocilizumab (n=18).

Sous abatacept, on observait que le pourcentage de Treg diminuait significativement ( $p < 0,0001$ ) avec le temps passant d'une médiane de 6,37 % [5,26-7,53] à M0 à 4,68 % [4,32-5,70] à M6 (figure 11). Par contre, les autres sous populations lymphocytaires (Th17, Breg 24-38 et Breg 24-27) ne variaient pas significativement sous traitement.

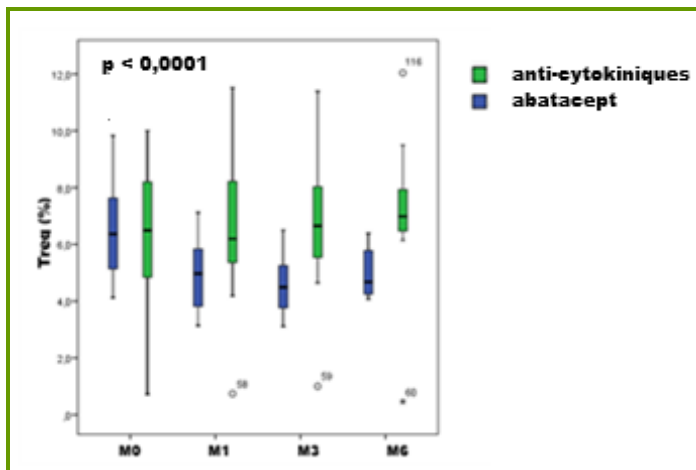


Figure 11 : Evolution des Treg en pourcentage (%) entre M0 et M6 chez les patients traités par abatacept (n=12) versus anti cytokiniques (n=17); représentation par box-plots avec médiane et IQR ; procédure GLM puis mixte SAS.

Sous anti-TNF- $\alpha$ , le pourcentage de Treg augmentait significativement avec le temps ( $p=0,005$ ) passant d'une médiane de 6,49 % [4,77-8,49] à M0 à 7,13 % [6,69-7,95] à M6 (figure 12). Les autres sous population lymphocytaires n'évoluaient pas significativement.

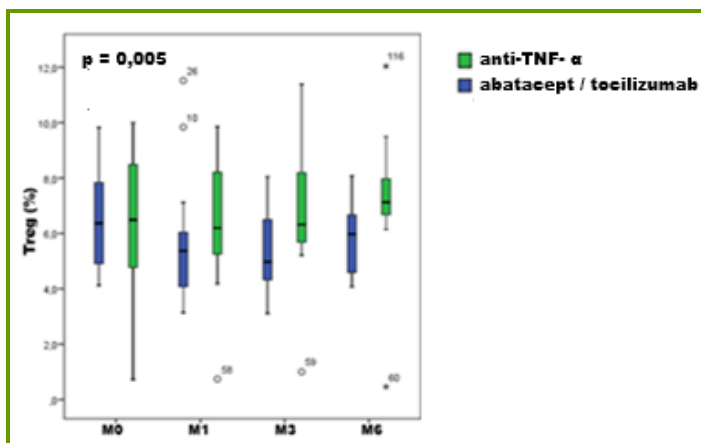


Figure 12 : Evolution des Treg en pourcentage (%) entre M0 et M6 chez les patients traités par anti-TNF- $\alpha$  (n=13) versus un autre biomédicament (n=18); représentation par box-plots avec médiane et IQR ; procédure GLM puis mixte SAS.

### 3.7 Taux initial et évolution des sous populations lymphocytaires selon la rémission DAS28 à M6

Nous avons cherché à déterminer si le taux initial des différentes sous-populations lymphocytaires avant traitement était associé à rémission DAS28 à M6. Puis, nous avons observé l'évolution de ces différentes populations à M1, M3 et M6 selon le statut de rémission DAS28 à M6 atteinte (n=7) ou non (n= 19).

Un taux initial élevé de Breg 24-27 en pourcentage était significativement associé à une rémission DAS28 à M6 (p=0,04) (figure 13) avec une médiane de 24,13 % [20,04-27,34] pour les patients en rémission à M6 vs 15,66 % [12,31-27,72] pour les autres. Par contre, les taux initiaux des autres sous populations n'étaient pas associés à une rémission DAS28 à M6.

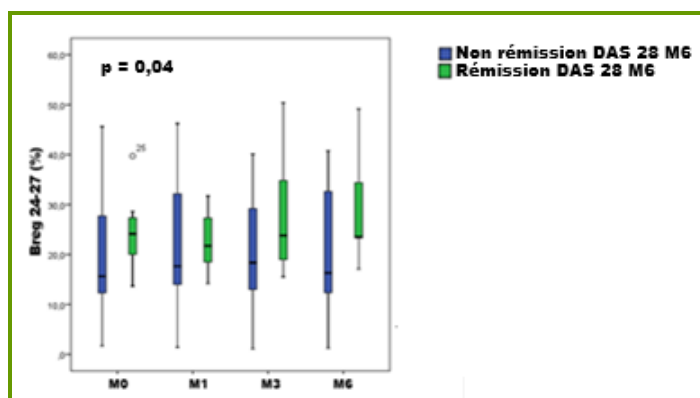


Figure 13 : Taux initial et évolution des Breg 24-27 en pourcentage (%) entre M0 et M6 chez les patients en rémission DAS 28 (n=7) ou non (n=19) à M6 ; représentation par box-plots avec médiane et IQR ; différence observée entre les 2 groupes selon le test de Mann-Whitney à M0 puis procédure GLM et mixte SAS.

Concernant les Treg en pourcentage (figure 14), on observait une différence statistiquement significative d'évolution sous traitement chez les patients en rémission DAS28 vs les autres (p=0,01). Cette évolution correspondait à une augmentation des Treg chez les patients en rémission à M6 avec une médiane passant de 4,76 % [4,48-7,89] à M0 à 6,90 % [6,43-7,52] à M6.

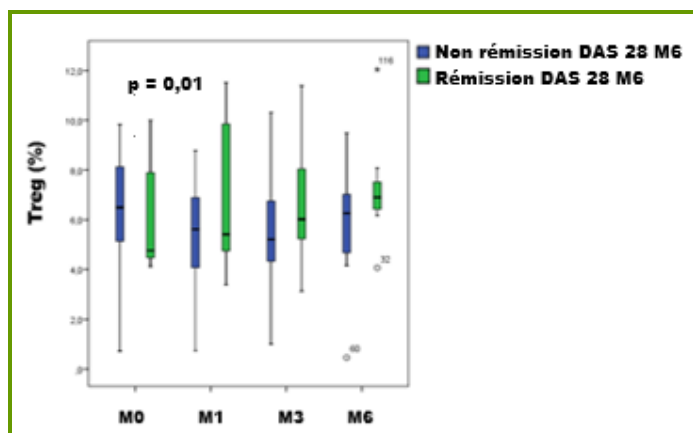


Figure 14 Taux initial et évolution des Treg en pourcentage (%) entre M0 et M6 entre les patients en rémission DAS 28 (n=7) ou non (n=19) à M6 ; représentation par box-plots avec médiane et IQR. différence observée entre les 2 groupes selon le test de Mann-Whitney à M0 puis procédure GLM et mixte SAS.

Concernant les autres sous populations lymphocytaires, il n'y avait pas de différence significative d'évolution sous traitement selon la rémission DAS28 obtenue ou non à M6.

### 3.8 Taux initial et évolution des sous populations lymphocytaires selon la réponse EULAR à M6

Nous avons cherché à déterminer si le taux initial des différentes sous-populations lymphocytaires avant traitement était associé à une réponse EULAR à M6. Puis, nous avons observé l'évolution de ces différentes sous populations lymphocytaires à M1, M3 et M6 selon la réponse EULAR à M6 avec un groupe non répondeur et répondeur modéré (n=17) *versus* un groupe bon répondeur (n=9).

Une tendance était observée en faveur d'un taux plus élevé de Breg 24-27 en pourcentage à chacun des temps de traitement chez les patients obtenant une bonne réponse EULAR à M6 *versus* les autres (p=0,07) (figure 15). Un taux initial élevé de Breg 24-27 en pourcentage était associé à une bonne réponse EULAR à M6 mais de façon non statistiquement significative (p=0.13) avec une médiane à M0 de 26,79 % [24,13-28,64] pour les patients bons répondeurs *versus* 14,22 % [11,66-22] pour les patients non répondeurs et répondeurs modérés à M6 (figure 15). Il n'y avait pas de différence significative d'évolution sous traitement selon la réponse EULAR à M6.

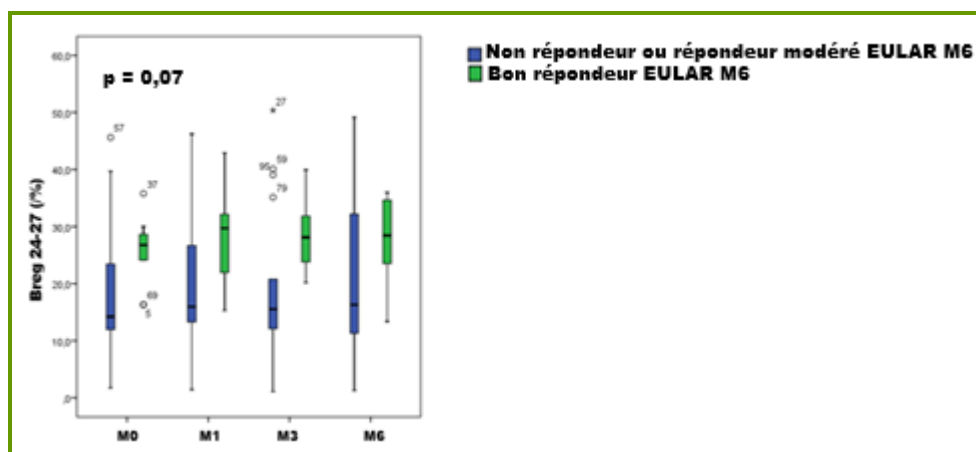


Figure 15 : Taux initial et évolution des Breg 24-27 en pourcentage à M0, M1, M3 et M6 chez les patients bon répondeurs EULAR à M6 (n=9) ou non (n=17); représentation par box-plots avec médiane et IQR ; différence observée entre les 2 groupes selon le test de Mann-Whitney à M0 puis procédure GLM et mixte SAS.



Concernant les Th17, un taux initial bas en pourcentage avant traitement était significativement associé à une bonne réponse EULAR à M6 ( $p=0,007$ ) avec une médiane à M0 de 13,73% [12,1-19,57] pour les patients bons répondeurs *versus* 20,66% [17,92-26,39] pour les non répondeurs et répondeurs modérés EULAR à M6. La même tendance s'observait en valeur absolue ( $p=0,06$ ) avec une médiane à M0 de 13,73/mm<sup>3</sup> [12,1-19,57] pour les patients bons répondeurs *versus* 20,66/mm<sup>3</sup> [17,92-26,39] pour les patients non répondeurs et répondeurs modérés EULAR à M6 (figure 16). De même, on observait un taux significativement plus bas de Th17 en pourcentage à chacun des temps de traitement chez les patients obtenant une bonne réponse EULAR à M6 *versus* les autres ( $p=0,009$ ) et la même tendance était observée en valeur absolue ( $p=0,06$ ). Il n'y avait pas de différence significative d'évolution sous traitement selon la réponse EULAR à M6.

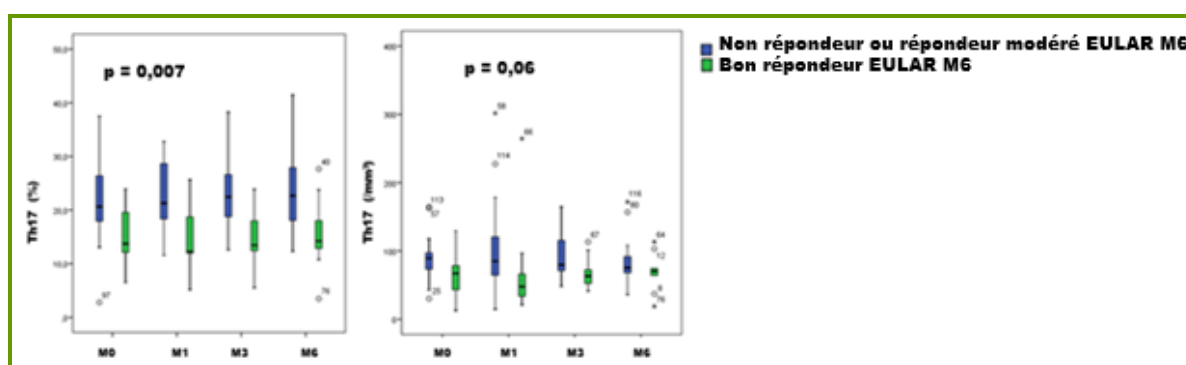


Figure 16 : Taux initial et évolution des Th17 en valeur absolue (cellules/mm<sup>3</sup>) et pourcentage(%) entre M0, M1, M3 et M6 chez les patients bon répondeurs EULAR à M6 ( $n=9$ ) ou non ( $n=17$ ); représentation par box-plots avec médiane et IQR ; différence observée entre les 2 groupes selon le test de Mann-Whitney à M0 puis procédure GLM et mixte SAS.

Concernant les Breg 24-38 et les Treg, leur taux initial n'était pas associé à la réponse EULAR à M6 et il n'y avait pas de différence significative d'évolution sous traitement selon le statut bon répondeur EULAR ou non obtenu à M6.

### 3.9 Taux initial des sous populations lymphocytaires selon la réponse EULAR à M6 par type de biomédicament

Nous avons cherché à déterminer si le taux initial des différentes sous-populations lymphocytaires était associé à une réponse EULAR à M6 selon le type de biomédicament reçu, à savoir : abatacept (n=10), anti-cytokiniques (anti-TNF- $\alpha$  et tocilizumab, (n=16)) et anti-TNF- $\alpha$  seuls (n=10). Le nombre de patients bon répondeurs EULAR à M6 sous abatacept, tocilizumab et anti-TNF- $\alpha$  était respectivement de 4 (3 non répondeurs, 3 répondeurs modérés) 2 (0 non répondeurs, 4 répondeurs modérés), et 3 (3 non répondeurs, 4 répondeurs modérés).

Sous abatacept (figure 17), un taux initial élevé de Breg 24-27 en pourcentage était significativement associé à une bonne réponse EULAR à M6 ( $p=0,01$ ) avec une médiane à M0 pour les bons répondeurs de 26,79 % [26,61-30,43] contre 13 % [10,32-15,42] pour les non-répondeurs et répondeurs modérés EULAR à M6. Les taux initiaux des autres sous populations lymphocytaires n'étaient pas associés à cette réponse.

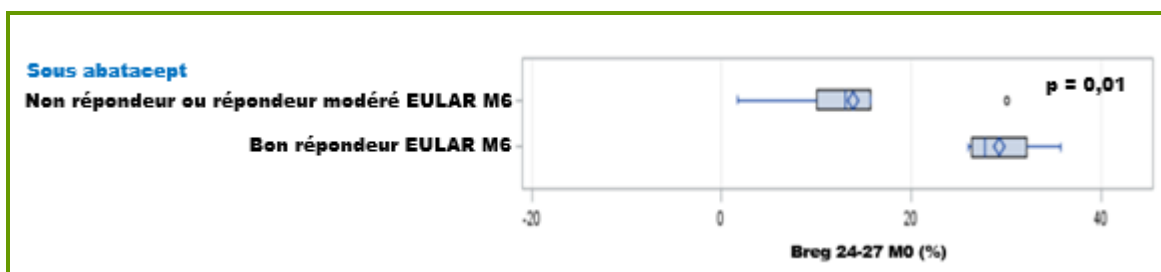


Figure 17 : Comparaison du taux de Breg 24-27 en pourcentage à M0 entre les patients bon répondeurs EULAR à M6 (n=4) ou non (n=6) sous abatacept; représentation par box-plots avec médiane et IQ ; différence observée entre les 2 groupes selon le T test.

Sous anti-cytokiniques (figure 18), un taux initial bas de Th17 était significativement associé à une bonne réponse EULAR à M6 ( $p=0,048$ ) avec une médiane de Th17 à M0 pour les bons répondeurs de 13,73 % [12,1-21,13] versus 20,62 % [18,55-25,08] pour les non-répondeurs et répondeurs modérés. Les taux initiaux des autres sous populations lymphocytaires n'étaient pas associés à cette réponse.

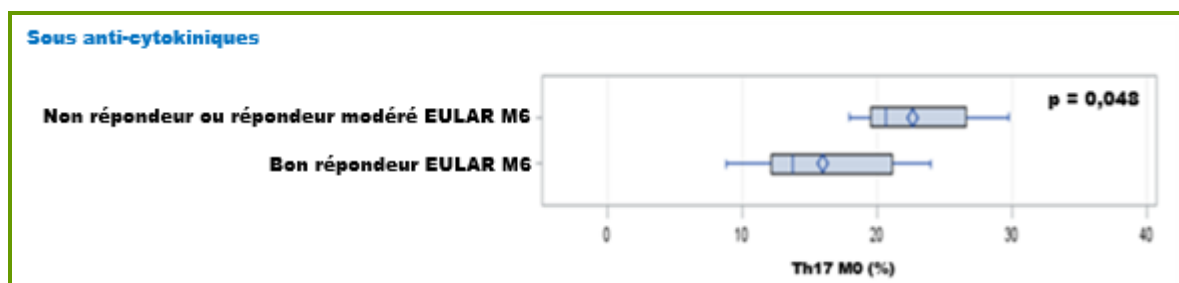


Figure 18 : Comparaison du taux de Th17 en pourcentage à M0 entre les patients bon répondeurs EULAR à M6 (n=5) ou non (n=11) sous anti-cytokiniques; représentation par box-plots avec médiane et IQR ; différence observée entre les 2 groupes selon le T test.

### 3.10 Détection de la production d'IL-10 sur PBMC

Une détection de la production d'IL-10 sur PBMC in vitro a également été effectuée chez 9 témoins, 11 patients à M0, 10 à M1, 14 à M3 et 13 à M6.

Le taux de cellules B CD19<sup>+</sup> productrices d'IL-10 obtenues par culture sur PBMC n'était pas différent entre les patients (n=10) et les témoins (n=7) à l'inclusion (p=0,845) (figure 19).

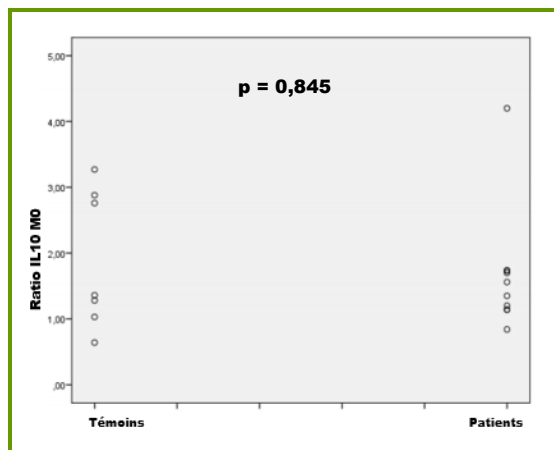


Figure 19 : Taux de cellules B CD19<sup>+</sup> productrices d'IL-10 obtenues par culture sur PBMC chez les patients (n=10) et les témoins (n=7) à l'inclusion ; représentation en ratio (taux de cellules B CD19<sup>+</sup> stimulées productrices d'IL-10/ taux de cellules B CD19<sup>+</sup> stimulées productrices d'IL-10) ; Test de Mann-Whitney.

Chez les patients (n=10) comme chez les témoins (n=7) à l'inclusion, il n'existait pas de corrélation entre le taux de cellules B CD19<sup>+</sup> productrices d'IL-10 obtenues par culture sur PBMC et les Breg 24-27 et 24-38 en pourcentage (p=0,713 r=-0,134 et p=0,448 r=-0,0271 respectivement) comme en valeur absolue (p=0,920 r=0,036 et p=0,841 r=-0,073 respectivement) (figure 20). Les résultats étaient similaires à M1 (n=10) pour les Breg 24-27 et 24-38 en pourcentage (p=0,777 r=-0,103 et p=0,96 r=-0,018 respectivement) comme en valeur absolue (p=0,212 r=0,556 et p=0,829 r=-0,079 respectivement).

Mêmes résultats à M3 (n=14) pour les Breg 24-27 et 24-38 tant en pourcentage (p=0,240 r=0,336 et p=0,805 r=0,073 respectivement) qu'en valeur absolue (p=0,748 r=0,095 et p=0,446 r=-0,222 respectivement). Les résultats étaient similaires à M6 (n=13) pour les Breg 24-27 et 24-38 en pourcentage (p=0,280 r=0,324 et p=0,578 r=-0,17 respectivement) comme en valeur absolue (p=0,681 r=0,126 et p=0,789 r=-0,082 respectivement).

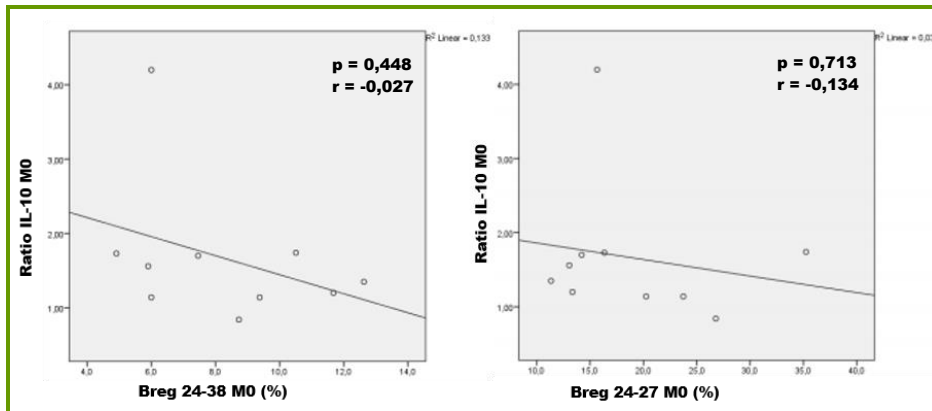


Figure 20 : Corrélation entre le taux de cellules B CD19<sup>+</sup> productrices d'IL-10 et le pourcentage de Breg 24-38 et 24-27 chez les patients à l'inclusion selon le test de corrélation de spearman.

Il n'existait pas de différence significative du taux de cellules B CD19<sup>+</sup> productrices d'IL-10 à M0 entre les patients en rémission DAS28 (n=3) ou non (n=4) à M3 (p=0,081) (figure 21). Les résultats étaient similaires pour les patients répondeur EULAR (n=4) ou non (n=4) à M3 (p=0,081).

On retrouvait les mêmes résultats pour le taux de cellules B CD19<sup>+</sup> productrices d'IL-10 à M1 entre les patients en rémission DAS28 (n=5) ou non (n=4) (p=1). Les résultats étaient similaires pour les patients répondeur EULAR (n=5) ou non (n=4) à M3 (p=1).

On retrouvait les mêmes résultats pour le taux de cellules B CD19<sup>+</sup> productrices d'IL-10 à M3 entre les patients en rémission DAS28 (n=8) ou non (n=6) (p=0,519). Les résultats étaient similaires pour les patients répondeur EULAR (n=8) ou non (n=6) à M3 (p=0,519).

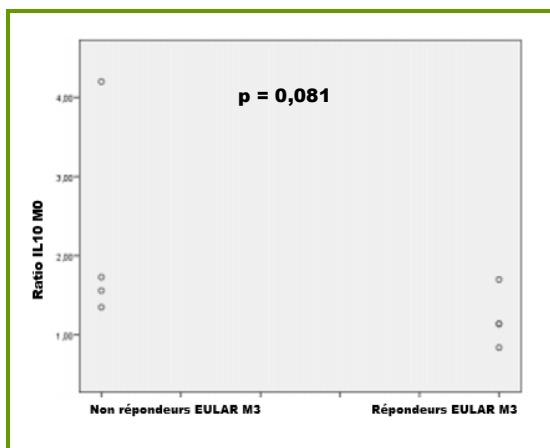


Figure 21 : Comparaison du taux de cellules B CD19<sup>+</sup> productrices d'IL-10 obtenues par culture sur PBMC entre les patients répondeurs EULAR à M3 (n=4) et les autres (n=4) à l'inclusion ; représentation en ratio (taux de cellules B CD19<sup>+</sup> stimulées productrices d'IL-10/ taux de cellules B CD19<sup>+</sup> stimulées productrices d'IL-10) ; différence observée entre les 2 groupes selon le test de Mann-Whitney.

## 4. DISCUSSION

---

Les avancées dans la compréhension de la physiopathologie de la PR ont permis le développement de thérapies ciblées (biomédicaments) sur différents acteurs cellulaires ou solubles du système immunitaire. Il s'y associe une meilleure prise en charge des patients grâce aux stratégies thérapeutiques de « *T2T* » et de « *tight control* » dont l'objectif à long terme est l'obtention d'une rémission durable avec un minimum de traitement, tout en préservant le capital articulaire des patients, but aujourd'hui atteint chez une majorité d'entre eux [1-2, 5-6].

Cependant, on constate une réponse hétérogène non prédictible aux biomédicaments avec une inefficacité primaire touchant environ un tiers des patients en première ligne de biomédicament. Ceci souligne l'importance d'identifier des marqueurs prédictifs de réponse thérapeutique précoce, afin d'éviter la prescription de thérapies coûteuses et inefficaces chez certains patients et de les exposer inutilement à des effets secondaires potentiellement graves. L'identification de tels marqueurs, qu'ils soient cliniques ou biologiques, constitue actuellement un des principaux enjeux de la recherche sur la PR [5-43].

Notre travail a pour but d'améliorer notre compréhension de l'effet des biomédicaments sur les Breg, Treg et Th17, sous populations lymphocytaires immunorégulatrices et impliquées dans de nombreuses pathologies humaines en particulier auto-immunes comme la PR. A l'heure actuelle, il s'agit d'une des premières études s'intéressant à l'effet des biomédicaments utilisés dans le traitement de la PR sur les Breg en particulier, et sur ces 3 lignées cellulaires de façon concomitante. En effet les précédentes études réalisées sur le rôle des Breg au cours de la PR n'incluaient pas ou peu de patients sous biomédicaments ou n'étaient pas limitées à la PR incluant des patients atteints d'autres pathologies auto-immunes. Certaines études portant sur les Breg chez l'homme incluaient des patients atteints de PR traités par biomédicament mais l'étude de l'impact de ces traitements sur les Breg ne constituaient pas l'objectif principal de l'étude [48-52]. D'autres études se sont intéressées aux Treg [15,17-19, 21,22] et aux Th17 [38,39] mais de façon indépendante.

Dans notre étude, les patients inclus correspondaient à la population rencontrée en pratique courante avec près de 2/3 de femmes et une médiane d'âge proche de 60 ans. Un tiers des PR évoluait depuis moins de 2 ans. Il s'agissait de PR considérées comme "actives" avec une médiane de DAS 28 à 4,24 ; immunopositives pour les 3/4 et érosives chez pour près de 50% des patients.

Une corticothérapie était associée chez la moitié des patients mais avec une posologie faible d'environ 5mg/j. La moitié des patients bénéficiait d'une initiation de biomédicament et l'autre d'un remplacement (*switch*) en association au MTX pour 2/3 d'entre eux avec une posologie médiane de 15 mg/semaine, principalement pour des phénomènes d'intolérance à plus forte posologie. Le biomédicament, choisi à l'appréciation du clinicien et selon les dernières recommandations ACR/EULAR et de la SFR, était un anti-TNF- $\alpha$  dans près de la moitié des cas, les autres molécules utilisées étant l'abatacept et le tocilizumab.

Concernant les Breg, dans notre étude, les Breg 24-38 étaient significativement réduits chez les patients par rapport aux témoins, tant en pourcentage qu'en valeur absolue. Il n'existait pas de différence significative pour les Breg 24-27. D'autres études ont également rapporté une diminution quantitative des Breg chez les patients atteints de PR active par rapport aux sujets sains et aux patients avec une maladie inactive [49-51,63]. Cette population cellulaire pourrait ainsi représenter un marqueur objectif d'activité de la maladie alors que les index d'activité actuel incluent, notamment pour le DAS28, une évaluation (EVA) d'activité de la maladie ressentie par le patient lui-même et que ce paramètre subjectif peut parfois prêter à discussion, particulièrement dans les phases d'évaluation précoce des traitements instaurés. Cependant, si cette diminution des Breg était observée dans la plupart des études pour les sous-populations IL-10<sup>+</sup>CD5Cd1d<sup>hi</sup> et IL-10<sup>+</sup>TIM-1<sup>+</sup> [50,51], IL10<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> [49] et CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> [63], une autre étude ne retrouvait pas de différence en valeur absolue ou en proportion des différentes sous-populations étudiées [52]. De plus, dans notre travail, il existait une corrélation positive entre Breg 24-38 et Treg en valeur absolue chez les témoins mais celle-ci n'était pas retrouvée chez les patients aussi bien à l'inclusion que sous traitement. On pourrait ainsi s'interroger sur un éventuel dysfonctionnement de coordination Breg 24-38 / Treg chez les patients atteints de PR, peut être justement du fait d'une diminution du taux de Breg 24-38.

Dans notre étude, les Breg 24-38 étaient également plus bas chez les patients avec FR. Un autre travail a également retrouvé une corrélation négative entre la proportion de Breg et le taux de FR et aussi avec celui des ACPA [50]. Le rôle précis de ces anticorps dans la PR est encore discuté, mais il est avéré que leur présence chez les patients est un marqueur de mauvais pronostic de la maladie. Ainsi, les Breg 24-38, abaissés chez les patients par rapport aux sujets sains et chez les patients FR+ *versus* FR-, pourraient être considérés comme une sous population lymphocytaire « protectrice ».

Par ailleurs, il n'existait pas d'évolution des Breg sous biomédicament, tout biomédicament confondu ni en fonction du type de biomédicament ou de la réponse au traitement.

Dans l'étude de Liang Ma *et al*, portant sur des patients atteints de PR, on constatait au contraire une augmentation des Breg à M3 même si leur proportion restait toujours inférieure à celle des sujets contrôles [51] mais ces patients étaient traités par DMARDs conventionnels et non par biomédicaments.

Dans notre travail, la rémission DAS28 à M6 était associée à une proportion significativement plus élevée de Breg 24-27 à l'inclusion. De même, en cas de bonne réponse EULAR à M6, un pourcentage de Breg 24-27 plus élevé que chez les non répondeurs était retrouvé à l'inclusion (mais de façon non significative). Ceci n'était pas retrouvé pour les Breg 24-38.

Dans la littérature, un taux initial élevé de Breg CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> et CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> semble prédictif de bonne réponse clinique EULAR à 3 mois sous anti-TNF- $\alpha$  [52]. L'activité de la maladie évaluée par le DAS28 était négativement corrélée à la proportion de Breg CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> et CD5<sup>+</sup>CD1d<sup>hi</sup> [52] et IL-10<sup>+</sup>CD5Cd1d<sup>hi</sup> et IL-10<sup>+</sup>TIM-1<sup>+</sup> [50,51]. Notons cependant qu'une autre étude retrouvait au contraire une proportion plus importante de Breg CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> chez les patients atteints d'une maladie auto-immune active par rapport aux sujets sains et aux patients avec une maladie inactive [48].

Dans une étude rétrospective portant sur patients atteints de PR traités par abatacept, le taux initial de Breg 24-27 avant traitement n'était significativement pas différent entre les patients répondeurs et les non répondeurs EULAR à M6 [63] alors que dans notre travail un taux initial élevé de Breg 24-27 en pourcentage était significativement associé à une bonne réponse EULAR à M6 sous abatacept.

Ainsi, les Breg 24-27, plus élevés à l'inclusion chez les patients en rémission DAS 28 à M6 ainsi que chez les patients bons répondeurs EULAR à M6 pourraient représenter un biomarqueur prédictif de réponse au traitement et notamment sous abatacept. Il sera très intéressant de les utiliser au quotidien de façon prospective pour confirmer ce premier résultat prometteur.

Concernant les Treg, il n'existait pas de différence statistiquement significative entre les patients et les témoins à l'inclusion. Dans la littérature, si certaines études rapportaient davantage de Treg chez les sujets sains par rapport aux patients atteints de PR, d'autres trouvaient comme ici des taux similaires [14,15,61]. Ces divergences peuvent s'expliquer par les différences de marquage et de définition des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.



En effet, à présent, il est bien établi que parmi les CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, seules les cellules exprimant de grandes quantités de CD25 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) sont suppressives, alors que celles qui expriment des quantités intermédiaires de CD25 sont en réalité des CD4 effectrices. La plupart des études montre en revanche clairement une augmentation du nombre des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dans le liquide synovial de PR [16].

Concernant l'évolution des Treg sous traitement, tout biomédicament confondu, nous ne retrouvons par d'évolution entre M0 et M6. Il existait simplement une diminution significative en pourcentage entre M0 et M1 avant restauration puis retour aux valeurs initiales.

Cependant, en analysant les résultats obtenus par patient selon le type de traitement reçu, anti-cytokinique (anti-TNF- $\alpha$  et tocilizumab) *versus* anti-cellulaire (abatacept), pour une valeur équivalente de Treg à l'inclusion, il existait une diminution en pourcentage des Treg sous abatacept mais une augmentation sous anti-TNF- $\alpha$ . Ceci pourrait être expliqué par la levée sous traitement de la répression exercée sur ces cellules par cette cytokine pro-inflammatoire majeure, comme déjà décrit par d'autres équipes [19,21] même si d'autres ne retrouvaient aucune évolution des Treg sous anti-TNF- $\alpha$  [15]. Dans notre étude, le taux initial de Treg n'était pas prédictif de rémission DAS 28 ou de réponse EULAR à M6. Par contre, on constatait une évolution significative des Treg sous biomédicament avec une restauration chez les patients en rémission DAS 28 à M6.

Dans la littérature, leur taux est décrit comme plus élevé à l'inclusion chez les patients en rémission DAS 28 à M6 et une restauration de ces cellules sous anti-TNF- $\alpha$  est associée à une plus grande probabilité de rémission à long terme [21]. D'autres auteurs retrouvaient également une augmentation des Treg sous anti-TNF- $\alpha$  [19] et sous abatacept [22] chez les patients bons répondeurs. Dans une autre étude portant sur des femmes enceintes atteintes de PR au cours du 3ème trimestre de leur grossesse, il existait une étroite corrélation inverse entre le taux de Treg circulant et l'activité de la maladie, suggérant le rôle protecteur de ces cellules [60,61] ou tout du moins leur reflet de la quiescence du rhumatisme.

Ainsi, ceci confirme l'intérêt prédictif d'observer ces cellules quant à la possibilité d'induire une rémission en cas d'augmentation de leur taux sous traitement. Les Treg pourraient donc être utilisés comme biomarqueur d'efficacité du traitement au cours du suivi des patients.

Concernant les Th17, ils étaient significativement plus élevés chez les témoins par rapport aux patients en pourcentage mais pas en valeur absolue.

Dans un autre travail, les auteurs retrouvaient au contraire une élévation des Th17 chez les patients atteints de PR récente [38].



Dans notre étude nous ne retrouvons pas d'association entre le taux de cette sous population lymphocytaire et la présence ou non d'ACPA alors qu'il avait été précédemment décrit une corrélation inverse entre le taux de Th17 circulant et le titre d'ACPA [37].

Par ailleurs, chez les patients à l'inclusion, il existait une corrélation positive entre la valeur absolue de Breg 24-27 et Th17 qui n'était pas retrouvée chez les témoins. Celle-ci n'était pas non plus retrouvée après 3 et 6 mois de traitement. Il semblerait donc exister une corrélation pathologique entre les Breg 24-27 et les Th17 chez les patients atteints de PR qui disparaîtrait sous traitement.

Dans la littérature, alors qu'il est décrit une diminution des Th17 sous MTX [38], il est intéressant de noter qu'ils augmentent chez les patients ne répondant pas à l'infliximab [39]. Cette augmentation des Th17 pourrait être secondaire à une réponse immunologique aberrante sous traitement, exacerbée via la mise en route d'autres voies inflammatoires non-TNF- $\alpha$  dépendantes, conduisant à une activité plus élevée de la maladie, voire à des réactions "paradoxaes" sous traitement.

Dans notre travail, les patients bons répondeurs EULAR à M6 avaient significativement une proportion moindre de Th17 par rapport aux non répondeurs et répondeurs modérés, à l'inclusion comme à tous les temps de traitement. Ainsi, une proportion initiale faible de Th17 était associée à une bonne réponse clinique EULAR à 6 mois. Ceci se vérifiait sous anti-cytokiniques avec une proportion de Th17 initialement significativement plus basse chez les patients répondeurs EULAR à M6 sous ce type de traitement. Ceci n'était par contre pas retrouvé sous abatacept.

Il est par ailleurs intéressant de noter que le taux de Th17 n'évoluait pas au cours du traitement, que les patients y répondent ou non, reflet possible d'une absence d'implication déterminante de cette population cellulaire dans cette pathologie. La corrélation positive entre les valeurs absolues des Treg et Th17, tant chez les témoins que chez les patients, décrite ci-dessus, est de nature à renforcer cette hypothèse. Elle contribuerait à expliquer les résultats décevants observés lors des essais cliniques des traitements ciblant l'IL-17 chez des patients atteints de PR [62].

Ainsi, un autre résultat particulièrement intéressant de notre étude est d'observer que les Th17, plus bas à l'inclusion chez les patients répondeurs EULAR à M6, pourraient représenter un biomarqueur prédictif de réponse au traitement, notamment aux "anti-cytokiniques".

Un autre objectif de notre travail était l'étude fonctionnelle des Breg en nous limitant à la mesure de leur production d'IL-10 après stimulation *in vitro*. Celle-ci reste l'une des principales caractéristiques fonctionnelles des Breg et l'un des objectifs de notre étude était d'observer leur évolution sous biomédicament, plutôt que d'en décrire les mécanismes. En effet, si des anomalies fonctionnelles des Breg au cours de la PR ont été décrites dans la littérature, ce n'est pas le cas de leur évolution sous biomédicament. Dans notre travail, le taux de cellules B CD19<sup>+</sup> productrices d'IL-10 obtenues par culture sur PBMC n'était pas différent entre les témoins et les patients à l'inclusion. Il n'existait pas de corrélation entre le taux de cellules B CD19<sup>+</sup> productrices d'IL-10 obtenues par culture sur PBMC et les Breg 24-27 et 24-38. Le taux de ces cellules n'était pas différent en fonction de la réponse ou non au traitement et de la rémission DAS28 obtenue ou pas.

Cependant, seuls 9 témoins et 11 patients ont bénéficié de cette détection à l'inclusion puis 10 à M1, 14 à M3 et 13 à M6. Ainsi, ces résultats portant sur peu de patients peuvent difficilement être analysés et discutés du fait d'un manque de puissance statistique.

Une des limites de notre travail est le peu de sujets étudiés. Malgré la fréquence relative de la PR, le nombre de patients en situation d'initiation ou de switch de biomédicament et respectant les critères d'inclusion et de non inclusion, reste faible dans un service unique de rhumatologie. Ceci explique la durée de la période d'inclusion prévue pour l'étude CELyPoR, proche des études réalisées sur les Breg au cours de la PR [50-52]. De plus un délai supplémentaire est nécessaire avant l'inclusion pour les patients auparavant traités par un biomédicament, laissant s'écouler 5 demi-vies, afin que le traitement précédant n'influence pas les paramètres étudiés sous la nouvelle thérapie.

Par ailleurs, ce travail nous a permis de mettre en place un protocole d'analyse phénotypique des Breg en cytométrie en flux, utilisant les marqueurs phénotypiques les plus fréquemment utilisés, ainsi que leur analyse fonctionnelle avec la détection de l'IL-10 intracellulaire sur PBMC après une phase d'activation *ex vivo*. Ce protocole pourrait être appliqué à d'autres pathologies humaines, dans des domaines autres que l'auto-immunité comme la transplantation d'organes, les cancers ou les infections.

## 5. CONCLUSION

---

Ce travail avait pour but de décrire l'évolution de différentes sous populations lymphocytaires (Breg, Treg et Th17) sous biomédicament au cours de la PR et d'étudier s'il existait une corrélation entre le taux de ces cellules et la réponse clinique. C'est une des premières études s'intéressant à l'effet des biomédicaments sur ces 3 lignées cellulaires de façon concomitante.

Nous avons constaté une diminution des Breg 24-38 chez les patients atteints de PR par rapport aux sujets sains et chez les PR immunopositives *versus* immunonégatives. Les Breg 24-38 pourraient ainsi être considérés comme une sous population lymphocytaire "protectrice". Seuls les Treg évoluaient significativement sous biomédicament avec une augmentation associée à une rémission DAS 28 à M6. Ils pourraient ainsi être utilisés comme biomarqueur d'efficacité au cours du suivi. Par ailleurs, une proportion initiale élevée de Breg 24-27 était associée à une rémission DAS 28 à M6 et une bonne réponse EULAR à M6 sous abatacept. Un taux initial bas de Th17 était quant à lui prédictif de bonne réponse EULAR à M6 et notamment sous anti-cytokiniques. Les Breg 24-27 et les Th17 pourraient ainsi être utilisés comme biomarqueurs prédictifs de réponse thérapeutique sous biomédicament au cours de la PR et guider le clinicien dans ses choix d'options thérapeutiques.

Cette étude est donc une première approche vers une médecine personnalisée alors qu'à ce jour seuls le FR et les ACPA sont utilisés. Il semblerait ainsi judicieux qu'en cas de taux initial élevé de Breg 24-27, chez un patient présentant une PR active, d'initier plutôt un biomédicament de type abatacept alors qu'en cas de taux initial bas de Th17, d'initier un anti-cytokinique. S'agissant d'une étude pilote, il est indispensable que d'autres études puissent conforter ces premiers résultats.



## 6. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

1. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016;S0140-6736 :30173-8.
2. Mc Innes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011;365:2205-19.
3. Finnegan A, Ashaye S, Hamel KM. B effector cells in rheumatoid arthritis and experimental arthritis. *Autoimmunity* 2012;45:353-63.
4. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO et al. rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1580-8.
5. Singh JA, Furst DE, Bharat A, Curtis JR, Kavanaugh AF, Kremer JM, et al. 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res* 2012;64:625-39.
6. Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, Buch M, Burmester G, Dougados M, et al. EULAR. Recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drug. *Ann Rheum Dis* 2014;73:492-509.
7. Stoff er MA, Schoels M, Smolen JS, et al. Evidence for treating rheumatoid arthritis to target: results of a systematic literature search update. *Ann Rheum Dis* 2016;75:16–22.
8. Daïen CI, Morel J. Predictive factors of response to biological disease modifying antirheumatic drugs: towards personalized medicine. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: 386148.
9. Boissier MC1, Assier E, Biton J, Denys A, Falgarone G, Bessis N. Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2009;76:10-4.
10. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151–64.
11. Morgan ME, Suttmuller RP, Witteveen HJ, et al. CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1452–60.
12. Morgan ME, Flierman R, van Duivenvoorde LM, et al. Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory Tcells. *Arthritis Rheum* 2005;52:2212–21.
13. Nguyen LT, Jacobs J, Mathis D, et al. Where FoxP3-dependent regulatory T-cells impinge on the development of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:509–20.
14. Lawson CA, Brown AK, Bejarano V, et al. Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4+CD25high regulatory T-cell population in peripheral blood. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45: 1210–7.
15. Van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, et al. CD4+CD25+ regulatory T-cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum* 2004;50:2775–85.
16. Mottonen M, Heikkinen J, Mustonen L, et al. CD4+CD25+ T-cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T-cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2005;140:360–7.
17. Cao D, van Vollenhoven R, Klareskog L, et al. CD25brightCD4+ regulatory T-cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res Ther* 2004; 6:R335–46.
18. De Kleer IM, Wedderburn LR, Taams LS, et al. CD4+CD25bright regulatory T-cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J Immunol* 2004;172:6435–43.

19. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, et al. Compromised function of regulatory T-cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF-alpha therapy. *J Exp Med* 2004;200:277-85
20. Ponchel F, Goëb V, Parmar R, El-Sherbiny Y, Boissinot M, El Jawhari J, Burska A, Vital EM, Harrison S, Conaghan PG, Hensor E, Emery P. An immunological biomarker to predict MTX response in early RA. *Ann Rheum Dis* 2014;73:2047-53.
21. Saleem B, Keen H, Goeb V, Parmar R, Nizam S, Hensor EM, Churchman SM, Quinn M, Wakefield R, Conaghan PG, Ponchel F, Emery P. Patients with RA in remission on TNF blockers: when and in whom can TNF blocker therapy be stopped? *Ann Rheum Dis* 2010;69:1636-42.
22. Bonelli M1, Göschl L1, Blüml S1, Karonitsch T1, Hirahara K2, Ferner E1, Steiner CW1, Steiner G1, Smolen JS1, Scheinecker C. Abatacept (CTLA-4Ig) treatment reduces T cell apoptosis and regulatory T cell suppression in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2016;55:710-20.
23. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123-32.
24. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005;6:1133-41.
25. Sundrud MS, Trivigno C. Identity crisis of Th17 cells: many forms, many functions, many questions. *Semin Immunol* 2013;25:263-72.
26. Calderón-Gómez E, Bassolas-Molina H, Mora-Buch R, Dotti I, Planell N, Esteller M, Gallego M, Martí M, García-Martín C, Martínez-Torró C, Ordás I, Singh S, Panés J, Benítez-Ribas D, Salas A. Commensal-specific CD4+ Cells From Patients With Crohn's Disease Have a T-helper 17 Inflammatory Profile. *Gastroenterology* 2016; S0016-5085:34576-0.
27. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005;201:233-40.
28. Lubberts E. IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis? *Cytokine* 2008;41:84-91.
29. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 2007;8:639-46.
30. Sato W, Aranami T, Yamamura T. Cutting edge: Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5- phenotype. *J Immunol* 2007;178:7525-9.
31. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003;198:1951-7.
32. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 2008;223:87-113.
33. Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Coenende Roo CJ, Joosten LA, et al. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum* 2004;50:650-9.
34. Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, et al. Human interleukin-17: a T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1999;42:963-70
35. Furst DE, Emery P. Rheumatoid arthritis pathophysiology: update on emerging cytokine and cytokine-associated cell targets. *Rheumatology (Oxford)* 2014;53:1560-9.

36. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, et al. Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med* 2014;20:62-8.
37. Kotake S, Nanke Y, Yago T, Kawamoto M, Kobashigawa T, Yamanaka H. Ratio of Circulating IFN $\gamma$  (+) "Th17 Cells" in Memory Th Cells Is Inversely Correlated with the Titer of Anti-CCP Antibodies in Early-Onset Rheumatoid Arthritis Patients Based on Flow Cytometry Methods of the Human Immunology Project. *Biomed Res Int* 2016;2016:9694289.
38. Kotake S, Nanke Y, Yago T, Kawamoto M, Kobashigawa T, Yamanaka H. Elevated Ratio of Th17 Cell-Derived Th1 Cells (CD161(+)Th1 Cells) to CD161(+)Th17 Cells in Peripheral Blood of Early-Onset Rheumatoid Arthritis Patients. *Biomed Res Int* 2016;2016:418602.
39. Talotta R, Berzi A, Atzeni F, Batticciotto A, Clerici M, Sarzi-Puttini P, Trabattoni D. Paradoxical Expansion of Th1 and Th17 Lymphocytes in Rheumatoid Arthritis Following Infliximab Treatment: a Possible Explanation for a Lack of Clinical Response. *J Clin Immunol* 2015;35:550-7.
40. Klareskog L, Amara K, Malmström V. Adaptive immunity in rheumatoid arthritis: anticitrulline and other antibodies in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2014;26:72-9.
41. Berthelot JM, Jamin C, Amrouche K, Le Goff B, Maugars Y, Youinou P. Regulatory B cells play a key role in immune system balance. *Joint Bone Spine*. 2013;80:18-22.
42. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol* 2012; 30:221-41.
43. Garraud O, Borhis G, Badr G, Degrelle S, Pozzetto B, Cognasse F, Richard Y. Revisiting the B-cell compartment in mouse and humans: more than one B-cell subset exists in the marginal zone and beyond. *BMC Immunol* 2012;13:63.
44. Neta R, Salvin SB. Specific suppression of delayed hypersensitivity: the possible presence of a suppressor B cell in the regulation of delayed hypersensitivity. *J. Immunol* 1974;113:1716-25.
45. Rosser EC, Blair PA, Mauri C. Cellular targets of regulatory B cell-mediated suppression. *Mol Immunol* 2014;62:296-304.
46. Kalampokis I, Yoshizaki A, Tedder TF. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. *Arthritis Res Ther* 2013;15 Suppl 1:S1.
47. Bosma A, Abdel-Gadir A, Isenberg DA, Jury EC, Mauri C. Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells. *Immunity* 2012;36:477-90.
48. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, Szabolcs PM, Bernstein SH, Magro CM, Williams AD, Hall RP, St Clair EW, Tedder TF. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 2011;117:530-41.
49. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* 2010;32:129-40.
50. Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, Mauri C. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med* 2013;5:173ra23.
51. Ma L, Liu B, Jiang Z, Jiang Y. Reduced numbers of regulatory B cells are negatively correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2014;33:187-95.
52. Daien CI, Gailhac S, Mura T, Rachel A, Combe B, Hahne M, Morel J. Regulatory B10 cells are decreased in patients with rheumatoid arthritis and are inversely correlated with disease activity. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:2037-46.

53. Elizabeth C. Rosser, Claudia Mauri Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity* 2015;42:607-612.
54. Bouaziz JD, Calbo S, Maho-Vaillant M, et al. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. *Eur J Immunol* 2010;40:2686-91.
55. Sun F, Ladha SS, Yang L, Liu Q, Shi SX, Su N, Bompreszi R, Shi FD. Interleukin-10 producing-B cells and their association with responsiveness to rituximab in myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2014;49:487-94.
56. Colliou N, Picard D, Caillot F, Calbo S, Le Corre S, et al. Long-term remissions of severe pemphigus after rituximab therapy are associated with prolonged failure of desmoglein B cell response. *Sci Transl Med* 2013;5:175ra30.
57. Bunch DO, McGregor JG, Khandoobhai NB, Aybar LT, Burkart ME et al. Decreased CD5<sup>+</sup> B cells in active ANCA vasculitis and relapse after rituximab. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013;8:382-91.
58. Roll P, Palanichamy A, Kneitz C, Dorner T, Tony HP. Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:2377-86.
59. Alunno A, Manetti M, Caterbi S, Ibba-Manneschi L, Bistoni O, Bartoloni E, Valentini V, Terenzi R, Gerli R. Altered Immunoregulation in Rheumatoid Arthritis: The Role of Regulatory T Cells and Proinflammatory Th17 Cells and Therapeutic Implications. *Mediators Inflamm* 2015;751793.
60. Forger F, Marcoli N, Gadola S, et al. Pregnancy induces numerical and functional changes of CD4+CD25 high regulatory T-cells in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:984-90.
61. Boissier MC, Assier E, Falgarone G, et al. Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm. *Joint Bone Spine* 2008;75:373-5.
62. Genovese MC1, Durez P, Richards HB, Supronik J, Dokoupilova E, Mazurov V, Aelion JA, Lee SH, Coddling CE, Kellner H, Ikawa T, Hugot S, Mpofu S. Efficacy and safety of secukinumab in patients with rheumatoid arthritis: a phase II, dose-finding, double-blind, randomised, placebo controlled study. *Ann Rheum Dis* 2013;72:863-9.
63. Gazeau P, Devauchelle-Pensec V, Pochard P, Pers JO, Saraux A, Renaudineau Y, Cornec D. Abatacept efficacy in rheumatoid arthritis is dependent upon baseline blood B-cell levels. *Rheumatology.* 2016;55:1138-40.



## Prédiction de la réponse aux biomédicaments au cours de la polyarthrite rhumatoïde via l'étude des sous populations lymphocytaires

**Introduction :** Au cours de la polyarthrite rhumatoïde (PR), la réponse hétérogène aux biomédicaments rend nécessaire d'identifier des biomarqueurs prédictifs de réponse thérapeutique. L'objectif de cette étude était de décrire l'état initial et l'évolution des lymphocytes B et T régulateurs (Breg et Treg) et Th17 sous biomédicament dans le but de rechercher une corrélation avec la réponse au traitement.

**Matériels et méthodes :** Il s'agissait d'une étude pilote monocentrique, prospective, non randomisée. Étaient inclus des PR ACR/EULAR 2010 actives dont le recours à une initiation ou un switch de tout biomédicament sauf le rituximab était nécessaire. Le groupe contrôle comprenait des patients indemnes de toute pathologie auto-immune. Un phénotypage lymphocytaire B et T ainsi qu'une analyse de la production d'IL-10 ont été réalisés à l'inclusion (M0) chez les patients et témoins puis à 1 (M1), 3 (M3) et 6 mois de traitement (M6). Le critère de jugement principal était le pourcentage et la valeur absolue de Breg 24-27 (CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>), 24-38 (CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>), Treg (CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>) et Th17 (CD45RA<sup>-</sup>CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>) mesurés à chaque temps et comparés à la réponse au traitement évaluée par la réponse EULAR à M6 et la rémission DAS 28.

**Résultats :** Entre novembre 2014 et octobre 2015, 31 patients et 17 témoins ont été inclus. Il existait à M0 une diminution des Breg24-38 chez les PR en pourcentage ( $p < 0,001$ ) et valeur absolue ( $p = 0,014$ ) et chez les PR immunopositives *versus* immunonégatives ( $p = 0,016$ ). Seuls les Treg évoluaient sous biomédicament ( $p = 0,048$ ) avec une augmentation en pourcentage associée à une rémission DAS 28 à M6 ( $p = 0,01$ ). Un taux initial élevé de Breg 24-27 était associé à une rémission DAS 28 à M6 ( $p = 0,04$ ) et à une bonne réponse EULAR à M6 sous abatacept ( $p = 0,01$ ). Un taux initial bas de Th17 était associé à une bonne réponse EULAR à M6 ( $p = 0,007$ ) et sous anti-cytokiniques ( $p = 0,048$ ).

**Conclusion :** Un taux initial élevé de Breg 24-27, bas de Th17 et une augmentation des Treg sous biomédicament sont prédictifs de bonne réponse au traitement au cours de la PR.

**Mots clés :** Lymphocytes B régulateurs, Th17, Lymphocytes T régulateurs, Polyarthrite rhumatoïde, Biomédicaments, Rémission, Réponse, Abatacept

## Prediction of response to biologics in rheumatoid arthritis through the study of lymphocyte subpopulations

**Background:** There is an unpredictable heterogeneous response to biologics in rheumatoid arthritis (RA), hence the need for predictive biomarkers of therapeutic response. The objective of this study was to describe the evolution of regulatory B and T cells (Treg and Breg) and Th17 at baseline and under biologics in order to find a correlation with the response to treatment.

**Methods:** Single-center pilot study, prospective, non-randomized. Were included active RA (ACR/EULAR 2010) treated with (initiation or switch) any approved biologic except rituximab. Were included in the control group, patients without any autoimmune disease. B and T phenotyping and analysis of the production of IL-10 were performed at baseline (M0) in patients and controls and at 1 (M1), 3 (M3) and 6 months of treatment (M6). The primary endpoint was the percentage and the absolute value of 24-27 Breg (CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>), 24-38 Breg (CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>), Treg (CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>) and Th17 (CD45RA<sup>-</sup>CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>) measured at each time and compared with the response treatment evaluated by the EULAR response and DAS 28 remission at M6.

**Results:** Between November 2014 and October 2015, 31 patients and 17 controls were included. In patients, there was a decrease of 24-38 Breg at MO in percentage ( $p < 0.001$ ) and absolute value ( $p = 0.014$ ), and in immunopositive RA *versus* immunonegative ( $p = 0.016$ ). Only Treg evolved in biologics ( $p = 0.048$ ) with an increase associated with DAS 28 remission at M6 ( $p = 0.01$ ). High initial proportion of 24-27 Breg was associated with remission DAS 28 at M6 ( $p = 0.04$ ) and good EULAR response at M6 under abatacept ( $p = 0.01$ ). Low initial proportion of Th17 was associated with a good EULAR response at M6 ( $p = 0.007$ ) and under anti-cytokine drugs ( $p = 0.048$ ).

**Conclusion:** A high initial rate of 24-27 Breg, low of Th17, and increased of Treg under biologics are predictive of a good treatment response in RA patients.

**Key words:** Regulatory B cells, Th17, Regulatory T cells, Rheumatoid arthritis, Biologics, Remission, Response, Abatacept