



**HAL**  
open science

# Prédiction de réponse aux biomédicaments dans les spondyloarthrites, selon les sous-populations lymphocytaires initialese

Thibault Rabin

► **To cite this version:**

Thibault Rabin. Prédiction de réponse aux biomédicaments dans les spondyloarthrites, selon les sous-populations lymphocytaires initialese. Rhumatologie et système ostéo-articulaire. 2018. dumas-02080008

**HAL Id: dumas-02080008**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02080008>**

Submitted on 26 Mar 2019

**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.

Université de Picardie Jules Verne  
Faculté de médecine

Année 2018

---

## **Thèse**

**Pour l'obtention du Diplôme d'Etat de docteur en médecine**

**Spécialité Rhumatologie**

N° 2018-90

---

**Présentée et soutenue le 12 septembre 2018**

**par**

**Thibault Rabin**

**Né le 03 septembre 1988 à Eaubonne**

---

**Prédiction de réponse aux biomédicaments dans les spondyloarthrites, selon  
les sous-populations lymphocytaires initiales**

---

**Président**

**Monsieur le professeur Patrice FARDELLONE**

**Membres du jury**

**Monsieur de professeur Jean-Pierre MAROLLEAU**

**Monsieur le professeur Vincent GOËB**

**Madame le docteur Brigitte GUBLER**

**Monsieur de docteur Jean SCHMIDT**

**Thèse réalisée sous la direction du Pr Vincent GOËB**

Monsieur le Professeur Patrice FARDELLONE  
Professeur des Universités-Praticien Hospitalier  
(Rhumatologie)  
Chef du service de Rhumatologie  
Pôle "Autonomie"

Professeur,

Je vous remercie pour l'aide financière de votre unité de recherche, sans laquelle ce travail n'aurait pu être possible.

Je vous remercie également pour votre sincère gentillesse, pour votre bienveillance à toute épreuve. C'est toujours un « voyage » que de partager avec vous ! J'ai là un *santoku* qui ne me couperait pas la parole. J'espère rester du bon côté du fil !

C'est pour moi un honneur et un grand plaisir que de vous avoir comme président du jury.

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 »

Professeur,

Je vous remercie pour l'intérêt que vous accordez à ce projet. Je vous remercie également pour l'aide financière de votre unité de recherche, qui m'a permis de réaliser mon master à l'EA4666. Il va sans dire que, sans ce travail préalable avec l'aide de l'équipe de recherche du laboratoire, rien n'aurait été possible.

Merci de me faire l'honneur de faire partie du jury.

Monsieur le Professeur Vincent GOEB  
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier  
(Rhumatologie)

Vincent,

Je te suis extrêmement reconnaissant de m'avoir offert l'opportunité unique d'un semestre en Angleterre, expérience qui a été extraordinairement enrichissante.

Merci également de ton soutien indéfectible et de tes inlassables encouragements, qui m'ont permis de garder confiance en ce travail lorsqu'il y a eu des difficultés. Merci pour la confiance que tu m'accordes.

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 »

Merci Brigitte pour l'aide précieuse et le soutien que tu m'as apporté tout au long de ce travail ! Merci de ta patience au début de ce projet qui n'a pas été facile à mettre en place. Merci d'être aussi chaleureuse et d'avoir été aussi disponible.

C'est pour moi un honneur de te compter parmi les membres du jury.

Monsieur le Docteur Jean SCHMIDT  
Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier  
(Médecine interne)

Merci Jean d'avoir répondu présent aussi spontanément. C'est pour moi un réel plaisir que de vous partager ce travail, tout comme j'ai énormément apprécié mon passage en médecine interne.

Merci de me faire l'honneur de faire partie du jury

Dr Frédérique Ponchel  
Associate Professor  
Head of Translational Research in Immune Mediated Inflammatory diseases  
Leeds Institute of Rheumatic and Musculoskeletal Medicine  
The University of Leeds  
Leeds  
UK

Frédérique,

Les mots me manquent pour t'exprimer toute ma gratitude.

Je te suis extrêmement reconnaissant pour tout ce que tu m'as appris, pour l'abnégation dont tu fais preuve. Tu n'as compté ni ton temps ni ton énergie pour m'aider, et c'est pour moi autant la preuve de ton professionnalisme que de ta sincère passion pour la recherche et l'enseignement.

Sans ton altruisme, depuis mon séjour en Angleterre jusqu'à l'aboutissement de ce travail, j'en serais toujours au point de départ. Je suis très fier et chanceux d'avoir fait ta connaissance.

Ce travail de thèse t'est dédié.



## Dédicaces

Un grand merci aux rhumatologues consultants qui m'ont aidé pour les inclusions et mes co-internes (et externes !) qui pour la plupart n'ont pas hésité à contribuer à ce travail.

Merci donc à vous belle ragazza ! Clémence, petite Sarah, Sanja, Karine, Valentine et Laure ! Vous êtes au top. Vous avez la classe et je vous adore !  
A mes boy-scouts : Maxouille et Jean-Marc aka Mokhtar !  
Vous êtes des co-internes de choc, et c'est rare !

Merci à mes frères (et sœurs) d'armes : Alice, Marie, Benjamin, JB et Germain. Vous m'avez soutenu toujours, vous êtes des chefs ! (Dans tous les sens du terme).  
A mes belles rencontres aussi : Julie (Blonde !), Charlène et Fanny.

Merci Sarah Salomon. Sans toi ce travail n'aurait probablement jamais vu le jour. Ton aide a été capitale à la mise en route du projet.

Merci à nos senseï : Franky « rayons X » Grados, qui a le don d'être partout à la fois sauf aux soirées (viens-tu au pot de thèse ?? Je parie 100 balles avec JM qu'il n'arrivera pas à te convaincre) ; Isabelle DH, dont la gentillesse et la disponibilité sont toujours appréciées.

Merci les filles d'HDJ dont l'aide a été indispensable dans ce travail ! Yasmina, Laïla, Elise, Jocelyne, Christine, Renée, Joëlle, Marilyne... Vous êtes en or.  
J'ai une pensée aussi pour maman Dodo et Corinne, à Zahia, Dalila, Julie, Françoise, Mélanie...

Merci à mes co-internes de médecine interne : les filles Audrey, Pauline, Mathilde la tricheuse. Vous êtes toutes belles. (C'est vrai !). J'ai vraiment adoré ce stage avec vous ! Merci aussi à Matthieu M. qui a contribué à ce travail.

Merci mes copains de la néphro ! Je suis drôlement content d'avoir choisi de vous rendre visite pour mon dernier stage ! Merci Mathilde, Ophélie et Pauline, ce master avec vous avait plus de saveur ! Merci aussi Maryam, Justine, Caro, Coco, Maïté ! Et Alex, Rémi, Gauthier, Dimitri.

Je remercie les laborantins !

Ericka Berthe pour son aide sur le cytomètre, pour sa compréhension et de m'avoir fait confiance pour trouver ma place dans l'organisation du laboratoire.

Merci aussi Magalie, Louison, Camille et les autres chercheurs qui m'ont tout appris concernant les manipulations, la reconstitution des tampons, les règles du laboratoire... Un autre monde.

A mes anciens colocs ! Alexis, JB, Cédric, Charles et Bastien ! L'expérience valait le détour. C'était génial de faire votre connaissance de cette manière.

J'ai une pensée toute particulière pour mes amis et compagnons de voyage : j'ai nommé les Brolando et les Jdel ! J'ai envie de vous dire... « De Alto Cedro voy para Marcané, Llego a Cueto, voy para Mayarí... ».

Mathilde et Clément (et Holi), les globes trotteurs invétérés ! Je crois que je ne me lasserai jamais d'apprécier un petit verre\* en votre compagnie (\*au choix bière-mojito-daiquiri frappé-rhum).

Delphine et JDK, quel bonheur de vous avoir. J'ai comme un craving d'un bon petit film sur grand écran !

Et n'oubliez pas la musique !

Aux filles « du Sénégal » vous êtes une rencontre incroyable ! J'ai nommé Sophie, Florence, Camille, Emilie et Charlotte. Je n'ai jamais été aussi fier que le jour où je me suis incrusté avec vous !

A mes super amies Camille et Chachouette ! Toutes les soirées qu'on passe ensemble ont quelque chose d'unique. Je ne m'en lasse jamais ! Vous êtes fantastiques !

Enfin une pensée pour mes amis de très longue date, mes frères, les quatre autres doigts de la main : Alex, Kevin, Rilou et Philo. 2/3 de vie qu'on se connaît, et encore pour longtemps je le sais. Je n'imagine pas une vie sans vous.

A ma famille, mon frère, mes parents que j'aime plus que tout.

A Léa, "how wonderful life is while you're in the world". You are my lucky star.

## Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS .....	2
Résumé .....	3
1. Introduction.....	4
1.1 Description clinique .....	4
1.2 Pathogénèse inflammatoire et immunologique .....	4
1.3 Le traitement et le recours aux biomédicaments.....	6
1.4 Le besoin clinique de biomarqueurs de prédiction de réponse aux biothérapies	7
2. Matériel et méthodes.....	10
2.1 Patients et données cliniques .....	10
2.2 Sujet contrôles .....	10
2.3 Analyse des sous-populations lymphocytaires (SPL).....	11
2.3.1 Protocole de laboratoire .....	12
2.3.2 Analyse par cytométrie en flux (CMF) .....	13
2.4 Validation des données des sujets contrôles.....	14
2.5 Méthodes statistiques .....	15
3 Résultats.....	17
3.1 Description du groupe de patients à l'inclusion .....	17
3.2 Description des populations de lymphocytes des patients SA et RPso à l'inclusion .....	19
3.3 Analyse de la réponse en fonction des paramètres cliniques initiaux. ....	26
3.4 Analyse de la réponse en fonction des fréquences initiales des SPL .....	30
4 Discussion .....	36
5 Conclusion .....	42
6 Références bibliographiques.....	43
7 Annexes.....	48

## LISTE DES ABREVIATIONS

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

ASAS : Assessment of SpondyloArthritis international Society

ASDAS : Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score

BASDAI : Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index

BASFI : Bath Ankylosing Spondylitis Fonctionnal Index

Breg : Lymphocyte B régulateur

CASPAR : Classification criteria for psoriatic arthritis

CD : cluster de différenciation

CMF : Cytométrie en flux

CRP : C Reactive Protein

bDMARD : biological Disease Modifying AntiRheumatic Drug

csDMARD : conventional synthetic Disease Modifying AntiRheumatic Drug

HLA : Human Leukocyte Antigen

IL : Interleukine

IRC : Inflammation-related cells

MTX : Méthotrexate

KIR : Killer-cell immunoglobuline-like receptor

PR : Polyarthrite rhumatoïde

RPso : Rhumatisme psoriasique

SA : Spondylarthrite ankylosante

SpA : Spondyloarthrites

SPL : Sous-populations lymphocytaires

Th : Lymphocyte T auxiliaire (T helper)

Treg : Lymphocyte T régulateur

VS : Vitesse de Sédimentation

## Résumé

**Introduction** : La prise en charge actuelle des spondyloarthrites (SpA) fait de plus en plus appel aux biomédicaments qui sont inefficaces chez 30-40% des patients. Les sous-populations lymphocytaires (SPL) dans les SpA ont été très peu étudiées en vue d'une analyse pronostique même si certaines sont impliquées dans la pathologie. L'objectif de cette étude était de déterminer si les SPL, avant l'initiation d'un biomédicament, pouvaient être associées avec la réponse à celui-ci afin d'identifier de potentiels biomarqueurs prédictifs pouvant être utilisés en routine.

**Matériel et méthodes** : Soixante-huit patients atteints de SpA traités par un biomédicament ont été inclus, ainsi 150 sujets contrôles indemnes de maladie inflammatoire chronique. Les paramètres cliniques couramment évalués au cours de la prise en charge des SpA (BASDAI, ASDAS) ont été colligés à l'initiation du traitement puis à 3 et 6 mois. La réponse clinique a été définie comme (1) le maintien du traitement ; (2) la diminution du BASDAI de 50% ou de 2 points ou (3) la diminution de l'ASDAS de 1.1 points. Différentes SPL (cellules T et B naïves, mémoires, régulatrices, Th17 et NK) ont été étudiées à l'inclusion suivant un protocole d'analyse de cytométrie en flux. Des tests de Mann-Whitney U, Chi<sup>2</sup> et des corrélations de Spearman ont été utilisés.

**Résultats** : Cinquante-trois patients étaient atteints de spondylarthrite ankylosante (SA) et 15 de rhumatisme psoriasique (RPso). Des fréquences significativement différentes de certaines SPL ont été retrouvées entre sujets atteints de SpA et sujets contrôles, notamment une hausse des cellules B ( $p < 0.0001$ ) et une baisse des CD8 mémoires ( $p < 0.0001$ ), en accord avec leur participation dans la pathologie. L'expression du récepteur de l'IL-6 (IL-6R) était plus forte sur ces mêmes SPL, confirmant un rôle potentiel de cette cytokine dans les SpA. Aucun paramètre clinique n'était associé avec la réponse au biomédicament. En revanche, une association avec une fréquence plus faible des cellules NK ( $p = 0.016$ ) était observée, plus particulièrement lorsqu'un anti-IL-17 était utilisé ( $p = 0.005$ ), mais pas pour les anti-TNF. Les fréquences d'autres SPL étaient aussi différentes en fonction de la réponse (tendances pour l'expression du KIR3DL2 sur les Th17, la balance des SPL CD8 naïves vs mémoires, l'expression de l'IL-6R sur les cellules B).

**Conclusion** : Ce travail a confirmé la dérégulation de certaines SPL dans les SPA. Il a aussi établi une association de plusieurs SPL avec la réponse clinique lorsqu'un anti-IL-17 était utilisé, mais pas un anti-TNF.

**Mots-clés** : Sous-populations lymphocytaires, spondyloarthrite, biomédicament, réponse.

**Key-words**: Lymphocyte subsets, spondyloarthritis, biologics, response.

# 1. Introduction

## 1.1 Description clinique

Les spondyloarthrites (SpA) regroupent, au sein d'une même entité diagnostique, plusieurs rhumatismes inflammatoires chroniques invalidants qui partagent de nombreuses caractéristiques cliniques et radiologiques ainsi qu'un terrain génétique commun, l'association à l'allèle *HLA-B27*[1]. Elle comprend notamment la spondylarthrite ankylosante (SA), la plus fréquente, et le rhumatisme psoriasique (RPso). La prévalence globale de l'ensemble des SpA est de 0,35 % en France, le sex-ratio étant de 1,5. La majorité des cas débute chez l'adulte jeune (avant 35 ans)[2]. Il s'agit donc d'un problème de santé publique, du fait du coût de la maladie et du retentissement social, avec la perte d'activité professionnelle chez des sujets jeunes. La prévalence de la SA est variable suivant les populations étudiées. Une partie de cette variabilité est expliquée par la variabilité de la prévalence de l'allèle *HLA-B27*. Ces affections associent à divers degrés un syndrome axial (rachis et sacro iliaques), un syndrome périphérique articulaire et/ou enthésitique ainsi qu'un syndrome extra rhumatologique. Le caractère invalidant résulte de l'atteinte des enthèses, où l'inflammation conduit à une cicatrisation délétère, avec l'apparition d'enthésophytes et de syndesmophytes. Le diagnostic de la SA repose sur les critères de classification des formes axiale et périphérique qui ont été élaborés par le groupe international d'experts ASAS[3]. Ces critères sont basés sur les critères d'Amor et les critères de l'ESSG (European Spondylarthropathy Study Group), et recherchent la présence de différents symptômes tels que les lombalgies inflammatoires, les enthésites, les uvéites, le syndrome inflammatoire biologique ou la réponse aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), en association avec la présence du *HLA-B27*, et d'une sacro-iliite radiologique répondant aux critères de New York modifiés[3]. On établit ainsi un score diagnostique avec une sensibilité de 82.9% et une spécificité de 84.4%. Pour le RPso, le diagnostic repose sur les critères de classification CASPAR[4]. Le patient doit présenter au moins une atteinte articulaire inflammatoire, ainsi qu'au moins 3 critères parmi les suivants : présence de lésions de psoriasis, atteinte unguéale, négativité du facteur rhumatoïde, présence ou antécédent de dactylite, et un aspect radiologique de construction osseuse.

## 1.2 Pathogénèse inflammatoire et immunologique

La physiopathologie des SpA reste encore mal connue, et fait intervenir à la fois des mécanismes immunitaires et des facteurs bactériologiques propres à certains micro-organismes[1]. Le rôle des gènes d'histocompatibilité, et notamment la présence du *HLA-B27*,

est clairement associée aux SpA[1]. Le *HLA-B27* est un antigène de surface du complexe majeur d'histocompatibilité de type 1. Il existe d'autres déterminants génétiques, tels que les gènes *MICA*[5], avec l'implication de plusieurs cytokines pro inflammatoires, telles que le TNF-alpha, les interleukines (IL) 1, 17 et 23[6][7].

La cible anatomique principale du processus inflammatoire des SpA est l'enthèse (zone d'insertion des tendons sur l'os)[1], siège d'une infiltration lymphocytaire pro-inflammatoire constituée principalement de lymphocytes T. Ces derniers sont majoritairement représentés par les lymphocytes T-CD8[8] contrairement à d'autres rhumatismes inflammatoires associés aux T-CD4 telle que la PR. Les premières hypothèses pathogéniques impliquent la participation d'un peptide arthritogène, pouvant être un antigène bactérien[1][9], entraînant une réponse immunitaire en relation avec le *HLA-B27*[1][9][10], conduisant à la sécrétion de cytokines déterminantes pour le développement de lymphocytes T auxiliaires 17 (T helper ou Th17) pathogéniques[10]. Il existe d'autres hypothèses pathogéniques : (i) l'hypothèse du mimétisme moléculaire, offrant un stimulus au *HLA-B27* et conduisant à une auto-immunité ; (ii) un défaut de conformation (ou « misfolding ») de la molécule *HLA-B27*, qui conduit à son accumulation dans le réticulum endoplasmique et à un stress ; et (iii) la capacité du *HLA-B27* à former des homodimères de chaînes lourdes. Cet homodimère appelé « B27<sup>2</sup> » est capable de se lier au récepteur KIR3DL2 (killer-cell Ig-like receptor). Ce récepteur, normalement exprimé par les lymphocytes « natural killer » (NK), est également exprimé par certains lymphocytes T CD4, induisant leur survie, leur prolifération dans le sang et le liquide synovial, et augmentant leur production d'IL-17[10], les assimilant ainsi à des cellules polarisées CD4+Th17. L'IL-17 appartient à une famille spécifique de cytokines (IL-17A à F) dont elle possède l'activité inflammatoire la plus puissante[11]. Elle est produite majoritairement par les lymphocytes Th17 activés sous l'effet de cytokines pro-inflammatoires. Son récepteur, l'IL-17R, est exprimé sur de nombreuses cellules de l'immunité innée et adaptative, et induit un signal pro-inflammatoire[12]. L'activation naturelle de la voie Th17/IL-17 joue un rôle clé dans la lutte contre les infections, son but primordial, mais ce rôle évolutif est dérégulé et devient délétère dans le cas de maladies chroniques. Selon le contexte cytokinique et la pression exercée par l'environnement extérieur, les cellules Th17, grâce à leur plasticité intrinsèque, peuvent évoluer d'un profil protecteur (dans le cas d'infections) vers un profil pro-inflammatoire destructeur. Ce profil pro-inflammatoire résulte préférentiellement d'un contexte incluant l'IL-23[13]. Les effets de l'IL-17 sont la production d'autres cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF $\alpha$ , IL-

1β)[12], de facteurs de croissance (ex : granulocyte–macrophage colony-stimulating factor)[12], le recrutement d'autres cellules immunitaires (neutrophiles, lymphocytes, macrophages) sur le site de l'inflammation[12]. Dans le cas des maladies musculo-squelettiques, l'activation de la voie Th17 conduit à la destruction osseuse et cartilagineuse via l'activation du système RANK/RANKL[12]. Dans certaines conditions, l'IL-17 est aussi impliquée dans des mécanismes conduisant à la formation osseuse aberrante dans les spondyloarthrites, mais ces mécanismes ne sont pas totalement élucidés. L'IL-17 agit en synergie avec le TNF-alpha pour perpétuer l'inflammation conduisant à la chronicité[14]. On note également le rôle essentiel de l'IL-23, produite principalement par les cellules dendritiques et les macrophages, dans la différenciation et la pérennité du phénotype Th17[13]. La plasticité des cellules Th17 s'étend au phénotype Th1 et à leur habilité à être régulées par des lymphocytes T régulateurs CD4+ (Treg), impliqués dans la régulation des réponses T ayant échappé à la tolérance du soi (auto-immunité)[13]. La plasticité des cellules Th17/Th1 et leur relation avec les Treg les placent donc au centre d'une balance où des mécanismes bénéfiques ou délétères peuvent évoluer selon les cas, et aboutir à des maladies inflammatoires chroniques telles que les SpA[13].

L'implication de la voie IL-17 dans la physiopathologie de la SpA a été suggérée initialement par des taux élevés d'IL-17 et IL-23 dans le sérum des patients[6], ce taux étant corrélé à la présence d'enthésites[15]. La fréquence des cellules Th17 est augmentée dans le sang[6] en relation directe avec l'activité clinique, à l'inflammation (CRP), à l'atteinte synoviale (échographie doppler) et à l'atteinte structurale (radiographies)[16].

D'autres voies cytokiniques ont également été étudiées avec notamment la participation de l'IL-6, détectée dans les articulations sacro-iliaques des patients atteints de SpA. Cependant, son rôle n'est pas totalement élucidé[17]. Enfin, même si elles sont moins fréquentes, certaines études[18][19] ont rapporté l'implication des lymphocytes B dans la physiopathologie des SpA, concernant aussi bien les sous-populations régulatrices que mémoires, bien que leur intérêt en pratique clinique ne soit pas clairement défini.

### 1.3 Le traitement et le recours aux biomédicaments

La prise en charge actuelle[20] des SpA fait appel aux AINS et aux antalgiques en première indication. En cas de contrôle insuffisant, il est recommandé d'utiliser des traitements de fond. Certains traitements d'action lente, les *DMARDs* (Disease Modifying Anti Rheumatic Drugs)



peuvent être utilisés en particulier en cas d'atteinte principalement périphérique. Un traitement médicamenteux fait néanmoins partie d'une prise en charge globale avec en particulier une place importante dévolue à la rééducation, notamment pour les atteintes axiales, et à l'éducation du patient, l'utilisation de moyens physiques, l'indication de traitements locaux (infiltration de dérivés cortisoniques) et rarement de la chirurgie. Le traitement doit être instauré le plus précocement possible. L'objectif est d'éviter l'apparition rapide de l'ankylose rachidienne, ainsi que l'atteinte des hanches, voire l'atteinte restrictive pulmonaire, qui grève considérablement le pronostic fonctionnel. On distingue 2 catégories de DMARDs en fonction de leur mécanisme d'action :

➤ Les DMARDs synthétiques (csDMARDs), conventionnels ou ciblés sont des molécules de synthèse, exerçant une activité anti-inflammatoire par des mécanismes propres à chaque molécule. On utilise principalement la sulfasalazine, surtout efficace sur les arthrites périphériques. Son action sur les formes axiales semble plus modeste voire inexistante pour certains. Le méthotrexate et le léflunomide peuvent aussi être utilisés dans les formes périphériques, en particulier dans le RPso.

➤ Les DMARDs biologiques (bDMARDs) ou biomédicaments. Ils sont de prescription initiale hospitalière. On utilise en première intention les anti-TNF, ces traitements ayant fait la preuve de leur efficacité. Il en existe 5 formulations qui ont chacun leurs propres dosages et modes d'administration : l'infliximab, l'adalimumab, l'étanercept, le certolizumab et le golimumab. En cas d'échec aux anti-TNF il existe de nouvelles alternatives thérapeutiques : les anti-IL-17, tels que le sécukinumab ou l'ixékizumab, et les anti-IL-23 (ustékinumab).

Les recommandations internationales d'utilisation des biomédicaments dans la SpA se basent sur plusieurs paramètres que sont : le diagnostic avéré, une maladie active (selon le score BASDAI), l'échec du traitement conventionnel (AINS, csDMARDs) et l'absence de contre-indication. La connaissance de facteurs prédictifs de réponse aux biomédicaments permettrait une meilleure utilisation de ces traitements très coûteux (>10.000 €/an selon la HAS).

#### 1.4 Le besoin clinique de biomarqueurs de prédiction de réponse aux biothérapies

Par son évolution clinique et les différents profils de réponse aux traitements existants, l'hétérogénéité des SpA nécessite une prise en charge individualisée. Alors que le recours à un biomédicament est bien codifié, il n'existe à ce jour aucun paramètre biologique validé et pertinent pour guider le clinicien dans le choix des biomédicaments ou le suivi de leur efficacité.

En effet, cette efficacité est actuellement jugée sur des éléments cliniques (métrologies, BASDAI, ASDAS), radiologiques ou sur des marqueurs d'inflammation systémique peu spécifiques. Or, une mauvaise réponse thérapeutique peut conduire à des ankyloses articulaires irréversibles et s'accompagner d'effets indésirables potentiellement graves avec notamment un risque infectieux plus important. De plus, les biomédicaments restent inefficaces chez 30-40% des patients[21] et sont beaucoup plus onéreux que les traitements conventionnels. L'identification de biomarqueurs théranostiques permettrait au patient d'éviter un traitement inefficace, et à l'échelle de la communauté de réduire les coûts. Les principaux biomarqueurs associés aux SpA sont résumés dans le **tableau 1.1**. Le principal biomarqueur diagnostic reste l'association épigénétique au *HLA-B27* (odds ratio = 60). Les biomarqueurs associés à l'activité et la progression structurale sont principalement des protéines. Il existe d'autres marqueurs génétiques mis en évidence par des études *GWAS* (Genome Wide Association Study), mais beaucoup plus faiblement associés à la maladie (**Tableau 1.2**, Odds ratio entre 1 et 2). Certains de ces marqueurs sont utilisés pour définir la réponse clinique (telles que la VS et la CRP), et leur réduction/augmentation permet de suivre l'évolution de la maladie sous biomédicament. Un travail récemment effectué à Amiens sur l'implication des cellules Breg et Th17 dans la PR suggère des variations de fréquences de ces sous-populations lymphocytaires (SPL) associées à la réponse aux biothérapies[22]. Il s'agit là d'une piste de recherche dans les rhumatismes de type SpA que nous avons choisi d'explorer. L'intérêt repose également sur le fait qu'il n'existe à l'heure actuelle aucune étude d'analyse globale des SPL.

Les hypothèses à étayer étaient qu'il existe potentiellement des variations des SPL chez les sujets atteints de SpA, avec une possible utilité clinique. Parmi les SpA, nous avons choisi d'étudier les SA et les RPso, malgré l'hétérogénéité potentielle entre ces deux groupes sur le plan des mécanismes immunitaires.

Les objectifs de cette étude étaient :

- 1) De décrire différentes SPL impliquées dans la pathogénie de la SpA avant la mise en route d'un biomédicament chez les sujets atteints de SpA, et de les comparer avec les SPL de sujets sains.
- 2) D'observer une corrélation avec la réponse clinique au traitement par biomédicament, et d'identifier de potentiels biomarqueurs prédictifs pouvant être utilisés en routine.

**Tableau 1.1 :** Liste des principaux marqueurs diagnostics, d'activité de la maladie, de progression structurale.

Biomarqueurs	Génétique	Imagerie	Protéines	Articles
Diagnostic	HLA-B27	IRM	Anti-CD74	Van der Linden et al, Arthritis Rheum 1984 Rudwaleit et al, Ann Rheum Dis 2009 Baraliakos et al, Ann Rheum Dis 2014
Activité de la maladie			CRP, VS MMP3 MMP8, MMP9 IL-17, IL-23 Leptine TNF-alpha YKL-40 IL-6	Spoorenberg et al, J Rheumatol 1999 Pedersen et al, Ann Rheum Dis 2011 Mattey et al, Arthritis Res Ther 2012 Xueyi et al, J Clin Immunol 2013 Park et al, Scand J Rheumatol 2007 Bal et al, Clin Rheumatol 2007 Pedersen et al, Clin Rheumatol 2010 Gratacós et al, Br J Rheumatol 1994
Progression structurale			IL-6 CTX-I, CTX-II Dkk-1 VEGF Calprotectine	Pedersen et al, Arthritis Rheum 2011 Arends et al, PLoSOne 2014 ; Vosse et al, Rheumatology 2008 Heiland et al, Ann Rheum Dis 2012 Poddubnyy et al, Ann Rheum Dis 2014 Turina et al, Ann Rheum Dis 2014
Réponse au traitement			CRP, VS, SAA Calprotectine	De Vries et al, Arthritis Rheum 2009 Turina et al, Arthritis Res Ther 2014

**Tableau 1.2 :** Principaux biomarqueurs génétiques associés à la SpA, autres que *HLA-B27*

Biomarqueurs	Génétiques	Source
Impliqués dans l'immunité médiée par les Th17	IL-23R TYK2 IL-6R IL-1R1/IL-1R2 IL-12B	Cortes et al, Nat Genet 2013 Reveille, Clin Rheumatol 2015
Impliqués dans la présentation antigénique	ERAP1 UBE2E3 UBE2L3 NPEPPS	
Impliqués dans la fonction T CD8	RUNX3 EOMES IL-7R	
Impliqué dans la détection microbienne	CARD9 NOS2	

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1 Patients et données cliniques

Entre février 2017 et novembre 2017 ont été colligées, à l'occasion d'un soin courant, les données des patients atteints de SpA répondant aux critères de classification ASAS[23][24], présentant une maladie active malgré le traitement de fond conventionnel synthétique (csDMARDs) ou biologique (bDMARDs), et pour lesquels le recours à un biomédicament est préconisé selon les recommandations ASAS[25]. L'autorisation de collecter ces données a été accordée, et le projet a été enregistré au sein du registre informatique et liberté du CHU, sous le numéro d'enregistrement CHU T201.

Les critères d'exclusion comprenaient l'utilisation concomitante, ou depuis moins de 3 mois, d'une corticothérapie à dose supérieure à 10 mg/jour, ou d'un traitement immunosuppresseur autre que les csDMARDs couramment utilisés dans la pathologie (méthotrexate, sulfasalazine). En cas de traitement antérieur par un biomédicament, celui-ci devait avoir été arrêté pour une période correspondant à au moins 5 demi-vies de la molécule utilisée (soit 4 à 12 semaines selon la molécule).

Différents paramètres cliniques ont été enregistrés à l'inclusion (M0) : âge, indice de masse corporelle, traitements antérieurs, statut tabagique, présence d'une atteinte inflammatoire du rachis ou des articulations sacro-iliaques à l'IRM, caractère inflammatoire des douleurs et leurs localisations (axiales ou périphériques), scores d'activité (BASDAI, ASDAS VS/CRP) et de retentissement fonctionnel (BASFI). Les paramètres biologiques de l'inflammation tels que la vitesse de sédimentation (VS) et la protéine C-réactive (CRP) ainsi que la présence ou non de l'allèle *HLA-B27* ont été également enregistrés.

L'efficacité du biomédicament a été évaluée pour chaque patient à 3 mois et à 6 mois de traitement (M3, M6). La réponse clinique au traitement a été définie comme 1) le maintien du traitement à M6, 2) une baisse relative du BASDAI de 50% ou de 2 points en valeur absolue sur une échelle de 0 à 10[26] ou 3) par une diminution de l'ASDAS : amélioration cliniquement importante (>1.1)[26]. Ces données sont résumées dans le **tableau 3.1** chapitre Résultats.

### 2.2 Sujet contrôles

Des sujets indemnes de toute pathologie rhumatismale et immunologique ont été inclus dans un groupe contrôle, afin de permettre une correction sur l'âge de l'analyse de certaines SPL tels que les lymphocytes T naïfs et mémoires.

### 2.3 Analyse des sous-populations lymphocytaires (SPL)

Une analyse quantitative des SPL sur sang frais a été effectuée à M0. Les SPL étudiées sont résumées dans le **tableau 2.1**, ainsi que le niveau d'expression de différents marqueurs sur certaines sous-populations.

**Tableau 2.1** : Sous-populations lymphocytaires étudiées et expression de certains marqueurs.

SPL	Marqueurs	SPL	Marqueurs	SPL	Marqueurs	SPL	SPL
<b>TCD4</b>		<b>TCD8</b>		<b>B</b>		<b>NK</b>	<b>NKT</b>
<b>Naïves</b>	IL-6R	<b>Naïves</b>	IL-6R	<b>Naïves</b>			
<b>Mémoires</b>	IL-6R	<b>Mémoires</b>	IL-6R	<b>Mémoires</b>			
<b>IRC</b>	IL-6R	<b>IRC</b>	IL-6R	<b>Régulatrices</b>			
<b>Régulatrices</b>	Hélios						
<b>Th17</b>	KIR3DL2			<b>Total</b>	IL-6R		

IRC: « inflammation related cells ». Th17: T-helper 17. NKT : natural killer T. IL-6R : interleukin-6 Receptor. KIR : killer-cell immunoglobulin-like receptor.

**Tableau 2.2** : Couples d'anticorps/fluorochromes pour chaque marqueur utilisés dans le profilage des SPL : 1 profil par colonne, nom du clone et quantité utilisée.

Panels Fluoro chromes	Lymphocytes	Th17	LT régulateurs	LB	LT naïfs
V500	CD4 (RPA-T4) 5µl	CD4 (RPA-T4) 5µl	CD4 RPA-T4) 5µl	CD19 (HIB19) 5µl	CD4 (RPA-T4) 5µl
A488 / FITC	CD3 (UCHT1) 5µl	CXCR3 (1C6/CXCR3) 5µl	FoxP3 (259D/C7) 10µl	CD24 (ML5) 10µl	CD3 (UCHT1) 5µl
PE		KIR3DL2 (539304) 5µl	CD3 (HIT3a) 5µl	CD27 (M-T271) 5µl	CD45RA (HI100) 5µl
APC	CD56 (NCAM16.2) 5µl	CD161 (DX12) 15µl	Helios (22F6) 10µl	CD126 (M5) 5µl	CD126 (M5) 5µl
PerCP Cy5.5		CCR6 (11A9) 5µl	CD127 (eBioRDR5) 10µl		CD8 (RPA-T8) 5µl
A700	CD8 (RPA-T8) 5µl	CD8 (RPA-T8) 5µl		CD38 (HIT2) 5µl	
PE Cy7	CD19 (SJ25C1) 5µl		CD25 (M-A251) 10µl		CD62L (DREG-56) 5µl

### 2.3.1 Protocole de laboratoire

Différents anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes ont été utilisés pour le phénotypage des sous populations lymphocytaires et sont résumés dans le **tableau 2.2**, avec le volume de solution commerciale : Becton Dickinson (BD) pour tous sauf Helios (Miltenyi) et KIR3DL2 (R&D Systems). Les cellules étudiées seront donc reconnues à l'aide d'un ou plusieurs marqueurs spécifiques. Ces marqueurs peuvent être détectés en cytométrie en flux (CMF) grâce à des anticorps/molécules spécifiques couplés à des fluorochromes.

Pour effectuer ce phénotypage lymphocytaire, 4 ml de sang du patient sont prélevés sur un tube EDTA. Deux étapes de lyse des érythrocytes (RCL) sont effectuées à l'aide d'une solution hypotonique constituée d'ammonium chloride (Sigma) à 8.99 g/l et de bicarbonate de potassium (Sigma) à 1 g/l et de Na/EDTA à 0.5 M. Pour cela, on dépose 3 ml de sang total dans un tube Falcon de 50 ml, complété avec du tampon RCL jusqu'à 45 ml et on incube à 37°C pendant 5 minutes. On centrifuge pendant 8 minutes à 500 rcf. Le culot de cellules obtenu est remis en suspension. Les cellules sont ensuite lavées dans une solution de phosphate salin (PBS Corning) puis remises en suspension dans 250 µl de tampon de saturation (« Blocking buffer »), contenant 100 µl d'IgG humaines (sigma) et 300 µl de sérum de souris (Sigma) dans 1100 µl de tampon FACS (PBS +1% BSA), afin de réduire les liaisons non spécifiques des anticorps.

L'étape suivante consiste à fixer les anticorps monoclonaux sur les marqueurs antigéniques. Les cellules sont réparties dans 5 puits d'une plaque a 96 puits, dans 50 µl tampon de marquage ou « Staining Buffer », puis on ajoute les anticorps associés à un fluorochrome, et la plaque est placée au réfrigérateur, protégées de la lumière par une feuille d'aluminium. Après 30 minutes, on ajoute 150 µl par puit de tampon « FACS » (PBS +1% BSA), pour « laver » les cellules (centrifugation à 500 rcf pendant 5 minutes à 5°C), et les resuspendre dans 300 µl de tampon FACS. Les cellules sont prêtes à être analysées sur le cytomètre.

Pour les Treg, un marquage intracellulaire est nécessaire utilisant un kit eBioscience. Les cellules (à la fin de l'étape précédente) sont perméabilisées pendant 30 minutes grâce à 200 µl de solution « Fix/Perm buffer » (eBioscience). Après 30 minutes, on ajoute 100 µl de solution de lavage (« Perm/Wash », eBioscience), on centrifuge à 300 rcf due à leur fragilité après cette étape (5 minutes à 5°C). On resuspend les cellules dans 200 µl de Perm/Wash. On centrifuge comme précédemment, puis les cellules sont resuspendues dans 90 µl de Perm/Wash. On ajoute

alors les anticorps des marqueurs intracellulaires, anti FoxP3 et Helios, 30 minutes au réfrigérateur, recouvert d'aluminium. On ajoute après 200 µl de Perm/Wash pour lavage (centrifugation dans les mêmes conditions). Les cellules resuspendues dans le tampon FACS sont alors prêtes à être analysées.

### 2.3.2 Analyse par cytométrie en flux (CMF)

L'analyse des SPL a été effectuée au moyen d'un appareil de CMF (Navios A80706, 3 lasers, 10 couleurs). La CMF est une technique qui permet de mesurer, sur une suspension de cellules, leurs caractéristiques individuelles telles que la taille, la granularité et un élément ou une fonction qui puissent être détectés par fluorescence. Les cellules en suspension passent une à une devant un ou plusieurs lasers. Des détecteurs captent des signaux de fluorescence émis par chaque cellule tels que :

- La lumière diffusée aux petits angles (Forward Scatter, FSC) qui renseigne sur la taille des cellules,
- La lumière diffusée à 90 degrés (Side Scatter, SSC) qui renseigne sur la forme, la structure interne et la granularité des cellules,
- Les signaux de fluorescence : émis par un anticorps/molécule couplé à un fluorochrome, fixé de façon spécifique à la cellule.

Le phénotypage lymphocytaire consiste à reconnaître et séparer différentes SPL grâce à l'expression spécifique de marqueurs de lignage cellulaire tels que les clusters de différenciation ou « CD » : molécules exprimées spécifiquement à la surface de certaines cellules. D'autres antigènes peuvent aussi être détectés en intracellulaire. C'est le cas pour FoxP3 et Helios dans les Treg.

Pour analyser les différentes SPL, 5 panels de cytométrie ont été développés. La première étape dite « d'optimisation » consiste à régler le voltage des détecteurs ce qui permettra de différencier les populations positives et négatives. La fluorescence émise par chaque fluorochrome correspond à un intervalle de longueurs d'ondes que l'on appelle spectre d'émission. Il arrive que les spectres d'émission de différents fluorochromes se chevauchent. Une étape de compensation est donc indispensable, qui va permettre de restituer chaque événement au fluorochrome correspondant. Ceci a été fait pendant mon stage de Master (**annexe 1**).

La stratégie d'analyse ou « gating » a pour objectif de cibler une SPL recherchée, contenant le moins de « contaminants » possible (cellules n'ayant aucun rapport avec la population étudiée), afin d'obtenir une quantification représentative de cette SPL. Dans un premier temps, les différents types cellulaires (lymphocyte, monocytes et autres granulocytes) sont discriminés grâce à une représentation bi-paramétrique (dot-plot) avec en abscisse le paramètre FSC, et en ordonnée le paramètre SSC (**annexe 2**). La région du nuage de cellules correspondant aux lymphocytes est sélectionnée dans ce premier « gate ». Tous les autres dot-plot sont ensuite conditionnés pour présenter uniquement les cellules de ce gate, ce qui permet de cibler l'analyse des lymphocytes étape par étape (gate par gate). Les résultats de chaque stratégie sont présents dans la chapitre Résultats, **figure 3.2**, page 21.

La CMF est une technique relativement subjective nécessitant une étape d'entraînement. Les résultats des analyses de fréquences pour chaque SPL ont été comparés, au moyen d'un test de corrélation de Spearman, avec un observateur de référence : le Dr Ponchel (**annexe 3**). Ceci a permis de mettre en évidence les erreurs initiales et de les corriger. Il s'agissait soit d'erreurs de compensation (réglage de l'appareil) soit d'erreurs d'interprétation des données (gating). Cette étape de correction (réalisée pendant mon stage de Master, détaillée en **annexe 4**) a été essentielle pour que l'analyse soit de qualité optimale. Elle a permis également de minimiser le risque d'erreur ultérieur, en apprenant à reconnaître les anomalies éventuelles, par exemple lorsque l'analyse était faussée par une mauvaise qualité d'échantillon.

#### 2.4 Validation des données des sujets contrôles

Il existe une variation des fréquences de certaines SPL en fonction de l'âge du sujet[27]. Afin de pouvoir analyser correctement la fréquence de ces SPL, une correction des données par rapport à l'âge était nécessaire.

Chaque SPL a été analysée à partir d'échantillons de sujets contrôles d'âges différents pour avoir une corrélation de référence. L'analyse a porté sur 19 volontaires sains français et 120 sujets anglais. Les variations par rapport à l'âge concernent plus particulièrement les populations T naïves, mémoires et régulatrices (**figure 2.1**). Lorsque la fréquence des populations est influencée par l'âge, un modèle de régression linéaire a été appliqué. On a ainsi obtenu une courbe répondant à une fonction mathématique précise. Cette fonction a pu être appliquée pour « corriger » les proportions cellulaires obtenues pour chaque patient, par rapport



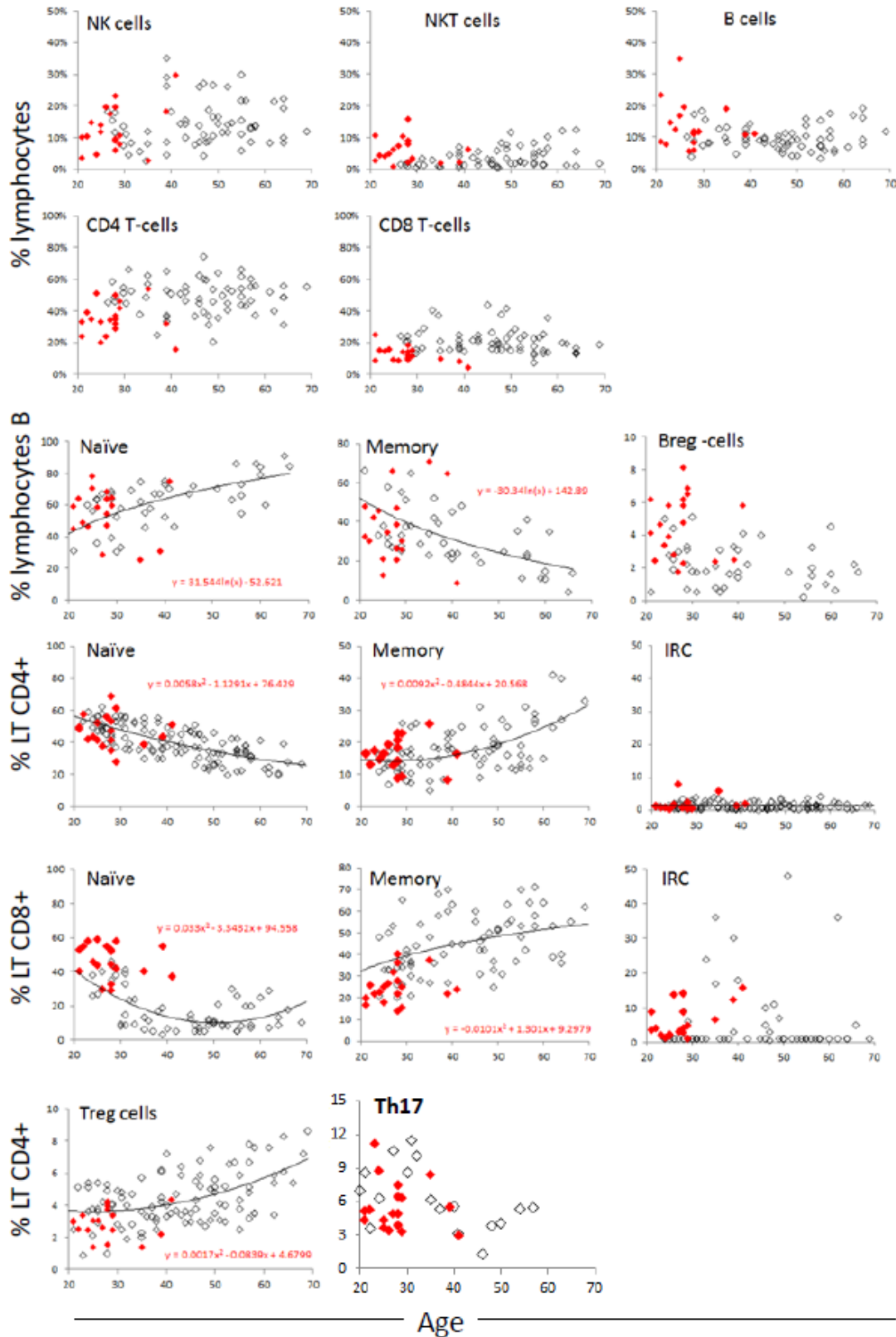
à l'âge, générant une valeur corrigée positive (si supérieure à la valeur de référence) ou négative (si inférieure).

Les sujets contrôles anglais ont été ajoutés aux sujets français car ces derniers représentaient une tranche d'âge trop restreinte pour obtenir une corrélation fiable, faute d'un temps imparti trop court pour l'inclusion de nouveaux contrôles. Cette décision a été prise en acceptant le risque de différences potentielles entre les sujets anglais et français. Néanmoins, les sujets français présentaient des valeurs bien alignées sur la population anglaise (**figure 2.1**, à l'exception de 3 points aberrants pour les T CD8+), minimisant ce risque.

## 2.5 Méthodes statistiques

Des tests non paramétriques ont été utilisés tout au long de cette étude, dus au nombre de patients trop limité et au fait que les données cliniques suivent rarement une distribution normalisée. Nous avons utilisé le test de Mann-Whitney U pour la comparaison de variables numériques entre deux groupes de patients (par exemple SA versus RPso) et le test  $\chi^2$  pour les variables catégorielles (telles que présence/absence du *HLA-B27*). Le test de corrélation de Spearman (et son coefficient « Rho ») a été utilisé pour établir des relations entre deux variables numériques.

**Figure 2.1 :** Corrélation entre l'âge et certaines SPL. Etablissement des fonctions mathématiques (corrélation indiquées par la ligne noire et son équation en rouge) permettant la correction numérique des données par l'âge : en rouge les sujets français et en noir, les sujets britanniques.



## 3 Résultats

### 3.1 Description du groupe de patients à l'inclusion

Tous les patients atteints de SpA et remplissant les critères d'inclusion ont été recrutés sur une période de 10 mois dans le service de rhumatologie du CHU d'Amiens. Ils étaient adressés, par le rhumatologue consultant, en hôpital de jour pour initier un nouveau traitement par biomédicament. Au total, 77 patients ont été inclus, parmi lesquels 2 patients ont refusé de participer à l'étude, 4 n'ont pu être analysés, 2 avaient une contre-indication au traitement et 1 diagnostic a été réfuté. Finalement, 68 patients ont pu être analysés. Ils étaient atteints soit de SA (n=53), soit de RPso (n=15). Les différents paramètres cliniques ont été colligés à l'inclusion, et sont résumés dans le **tableau 3.1**.

Les biomédicaments utilisés étaient principalement les anti-TNF (n = 39) avec 19 patients recevant de l'adalimumab, 10 patients du golimumab, 5 patients du certolizumab, 3 patients de l'étanercept et 2 patients de l'infliximab. Un inhibiteur de l'IL-17 a également été utilisé avec 26 patients recevant du sécukinumab. Enfin, 3 patients ont reçu un anti-IL-12/23 : l'ustékinumab. L'âge médian des patients était de 41 ans. La proportion des sujets porteur de l'allèle *HLA-B27* était de 41% dans les SA, et de 44% dans le RPso.

Les paramètres cliniques étaient globalement comparables entre les sujets SA et RPso et ne montraient pas de différence statistiquement significative pour la plupart. Le nombre d'articulations périphériques douloureuses (NAD) avait tendance à être plus élevé chez les sujets RPso (p=0.100) (**figure 3.1**). L'évaluation de la douleur par les patients sur l'échelle visuelle analogique (EVA) avait tendance à être plus faible chez les sujets RPso (p=0.03) (**figure 3.1**).

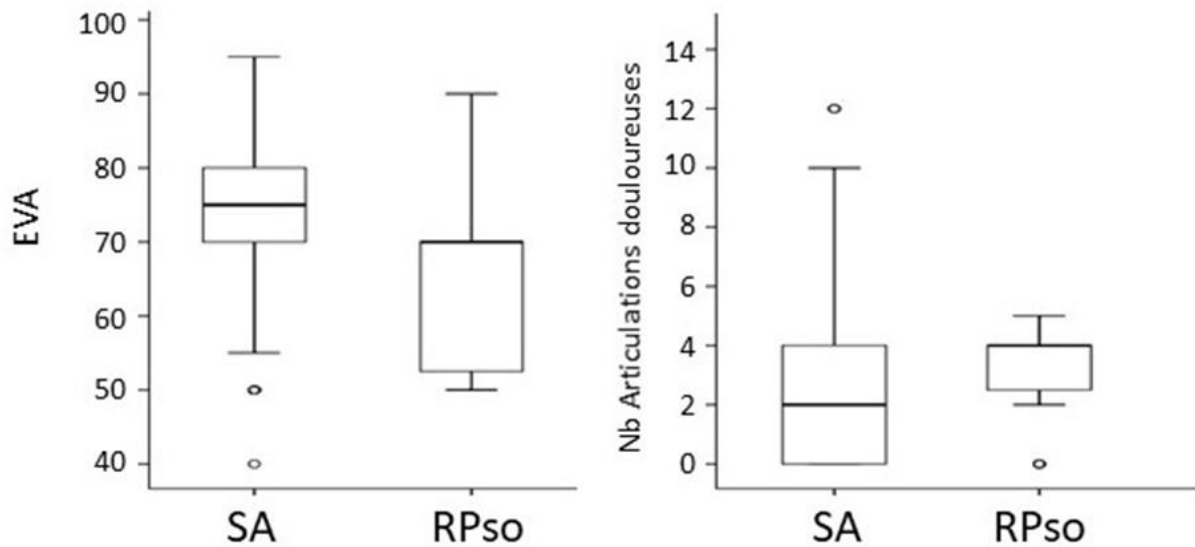
**Tableau 3.1** : Caractéristiques initiales des patients à l'inclusion (n=68)

	Total (n=68)	SA (n = 53)	RPso (n= 15)	p
Age	41 (19 ; 67)	41 (21 ; 67)	44 (19 ; 55)	0.318
Sexe féminin	69% (47/68)	66% (35/53)	80% (12/15)	0.241
IMC	25.1 (17.6 ; 53.4)	24.9 (17.6 ; 43.9)	26 (20.4 ; 53.4)	0.298
HLA-B27+	41% (27/65)	43% (22/51)	36% (5/14)	0.428
Fumeurs	37% (25/68)	42% (22/53)	20% (3/15)	0.109
Lésions IRM	83% (53/64)	84% (41/49)	86% (12/14)	0.600
Axial/axial et P.	39% (19/49)	56% (19/34)	0% (0/15)	NA
Réveils nocturnes	90% (61/68)	92% (49/53)	80% (12/15)	0.175
Rachialgies inflam.	96% (65/68)	94% (50/53)	100% (15/15)	0.995
Sacro-iliaques	87% (59/68)	87% (46/53)	87% (13/15)	0.640
Enthésites	65% (44/68)	62% (33/53)	73% (11/15)	0.500
DM>30min	90% (61/68)	91% (48/53)	87% (13/15)	0.500
NAD	2 (0 ; 28)	2 (0 ; 12)	4 (0 ; 5)	<b><u>0.100</u></b>
NAG	0 (0 ; 4)	0 (0 ; 2)	0 (0 ; 4)	0.565
EVA globale	70 (40 ; 95)	71 (40 ; 95)	65 (50 ; 90)	<b><u>0.030</u></b>
BASDAI	6.6 (1.85 ; 9)	6.5 (3.6 ; 9)	6.7 (1.8 ; 8.8)	0.999
BASFI	5.5 (0.3 ; 9.7)	5.6 (0.3 ; 9.7)	5.4 (1.9 ; 9.6)	0.874
ASDAS VS	3.05 (1.5 ; 4.80)	3.15 (1.5 ; 4.80)	3 (1.80 ; 4.60)	0.486
ASDAS CRP	3.08 (1.70 ; 4.90)	3.15 (1.9 ; 4.90)	2.90 (1.70 ; 4.10)	0.470
VS	8 (1 ; 61)	7 (1 ; 61)	8 (2 ; 22)	0.731
CRP*	<5 (<5 ; 40)	<5 (<5 ; 40)	<5 (<5 ; 13)	0.703
TT antérieur par BioM	54% (37/68)	51% (27/53)	60% (9/15)	0.375

Résultats exprimés en médiane (min-max) et pourcentage des patient (x/n). DM : dérouillage matinal. NAD : nombre d'articulations douloureuses. NAG : nombre d'articulations gonflées. EVA : échelle visuelle analogique de la douleur. BASDAI : Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. BASFI : Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index. ASDAS : Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score. Axial et P = atteinte axiale et périphérique. Inflam = inflammatoires. TT/BioM = traitement/biomédicament.

\*CRP<5 = considérées comme non détectables. NA = non applicable.

**Figure 3.1 :** Boxplots comparant les différences entre SA et RPso pour l'EVA et le NAD.



### 3.2 Description des populations de lymphocytes des patients SA et RPso à l'inclusion

L'analyse des SPL a été effectuée en utilisant 5 panels de CMF représentés dans la **figure 3.2**, permettant :

- *L'énumération des lignées lymphocytaires.* Ce panel permet d'énumérer les différents sous-types lymphocytaires sur la base de leur expression des marqueurs de lignage CD3, CD4, CD8, CD19, CD56.
- *La différenciation des cellules B (CD19+).* Ce panel permet d'énumérer les cellules B naïves (CD27-/CD38low), mémoires (CD27+/CD38low) et régulatrices (CD27-/CD38high/CD24+). Une mesure de l'expression du récepteur de l'IL-6 (IL-6R) est faite sur les lymphocytes B totaux, par mesure de la fluorescence moyenne (MFI).
- *Différenciation des cellules T* énumérant les différents sous types de différenciation : naïves (CD45RA+/CD62L+), mémoires (CD45R-/CD62L-) et une population appelée IRC (« inflammation related cells » CD45RA+/CD62L-) ainsi que l'expression du récepteur de l'IL-6 (IL-6R) pour chaque sous-type.
- *Différenciation des cellules T régulatrices (Treg).* Ce panel permet d'énumérer les cellules T régulatrices (CD3+/CD4+/CD25high/FoxP3+/CD127low). L'expression du marqueur Helios permet de reconnaître les Treg d'origine thymique.

- *Différenciation de cellules Th17*. Ce panel permet l'identification des cellules Th17 à l'aide d'un phénotype CD161+CCR6+CXCR3-. Dans ce panel, l'expression du récepteur KIR3DL2 a aussi été mesurée (MFI).

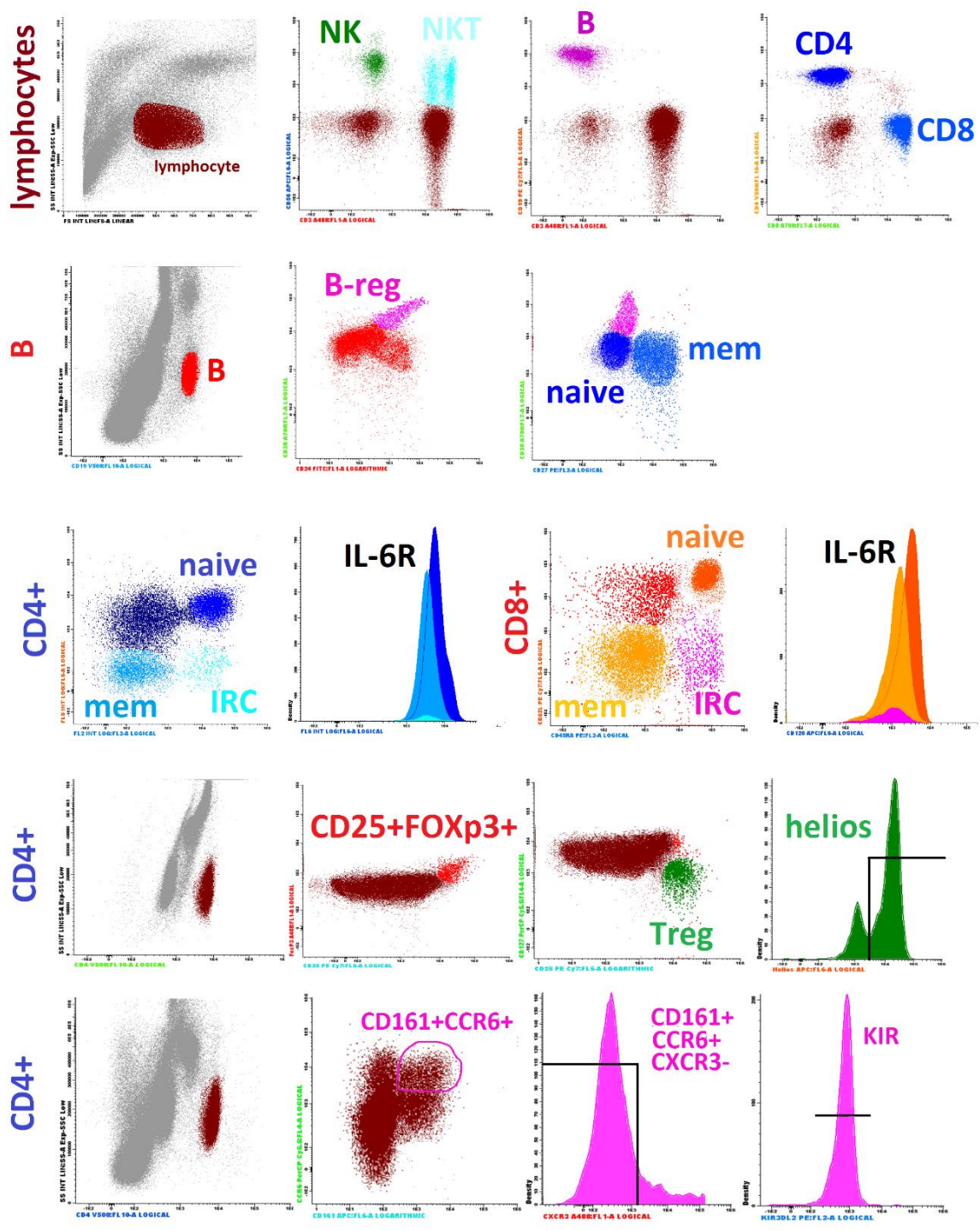
Pour visualiser les différences entre patients, une représentation « heatmap » a été utilisée (**figure 3.3**). Elle permet de visualiser si certains groupes de patients se « comportent » de façon similaire en fonction des valeurs de SPL (analyse basée sur des corrélations de Spearman). Cette analyse faite sur 53 patients (certains ayant dû être retirés à cause de données manquantes pour l'un des panel), a permis de séparer 5 groupes de patients selon 2 groupes de données dominant la ségrégation : des valeurs faibles ou fortes pour le nombre de lymphocytes T CD4+, de CD4 ou CD8 naïfs d'une part et l'expression faible ou forte du récepteur de L'IL-6.

Les fréquences initiales de SPL ont été comparées entre les sujets contrôles, les patients atteints de SA et ceux atteints de RPso. Des différences ont pu être mises en évidence entre les patients et les contrôles, surtout avec les SA (peut-être dues au petit nombre de RPso).

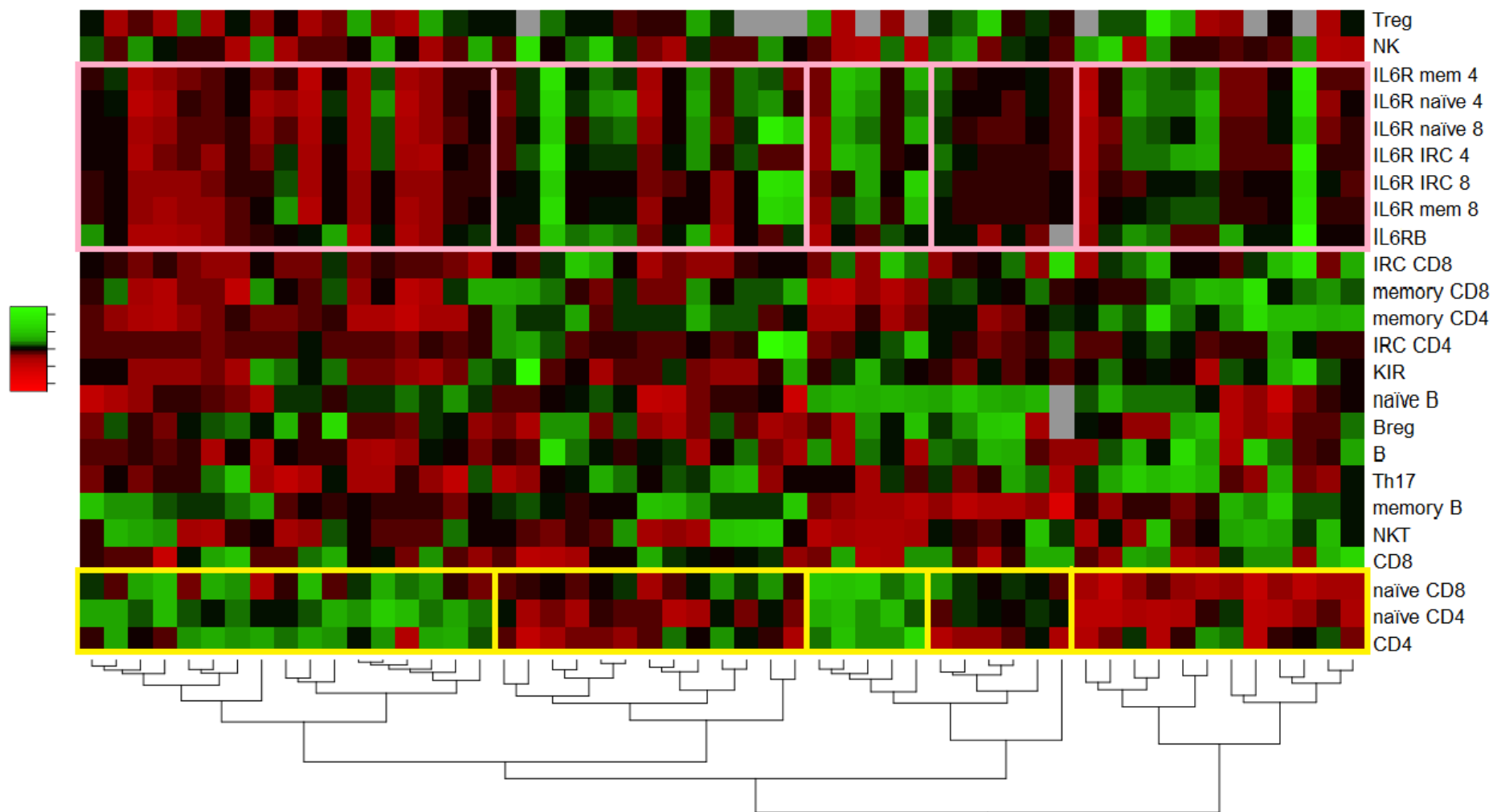
Du fait des multiples comparaisons (au nombre de 25, **tableau 3.2**), le seuil de significativité a dû être corrigé (correction de Bonferroni). Ainsi, la valeur p significative doit être  $<0.05/25$  soit  $<0.002$ . Nous avons considéré les valeurs significatives seulement si  **$p < 0.0001$** , de façon à ne pas surestimer ces données. Néanmoins certaines valeurs peuvent être considérées comme indicatives des tendances possibles ( $p < 0.05$ ).

- La comparaison de la fréquence des principales lignées lymphocytaires des sujets SA (**figure 3.5 a**) montrait une augmentation des lymphocytes B circulants, une diminution des CD4 et des CD8 de façon significative ( **$p < 0.0001$** ) par rapport aux contrôles. On notait aussi une tendance à la baisse des NK ( $p = 0.009$ ).
- L'homéostasie des lymphocytes T CD8 était très perturbée, tant chez les sujets SA que RPso. On retrouvait une augmentation de la fréquence des populations naïves et IRC, une baisse des mémoires (bien qu'elles présentaient une grande variabilité même au sein des contrôles) ( **$p < 0.0001$** ) (**figure 3.5 b**).
- On notait une perturbation des populations B et T régulatrices, avec une augmentation des Breg et une diminution des Treg ( **$p < 0.0001$** ) (**figure 3.5 b**).
- L'analyse de l'expression de l'IL-6R montrait une tendance à l'augmentation (chez les sujet SA) sur l'ensemble des cellules CD4 et CD8, ainsi que les cellules B, bien que les différences ne soient pas significatives (**figure 3.5 c**).

**Figure 3.2 :** Description des 5 panels de cytométrie utilisés pour déterminer la fréquence des SPL étudiées.



**Figure 3.3 :** Représentation en « heatmap » de l'ensemble des données par la technique de clustering hiérarchique permettant de mettre en évidence la dynamique similaire de certaines SPL.



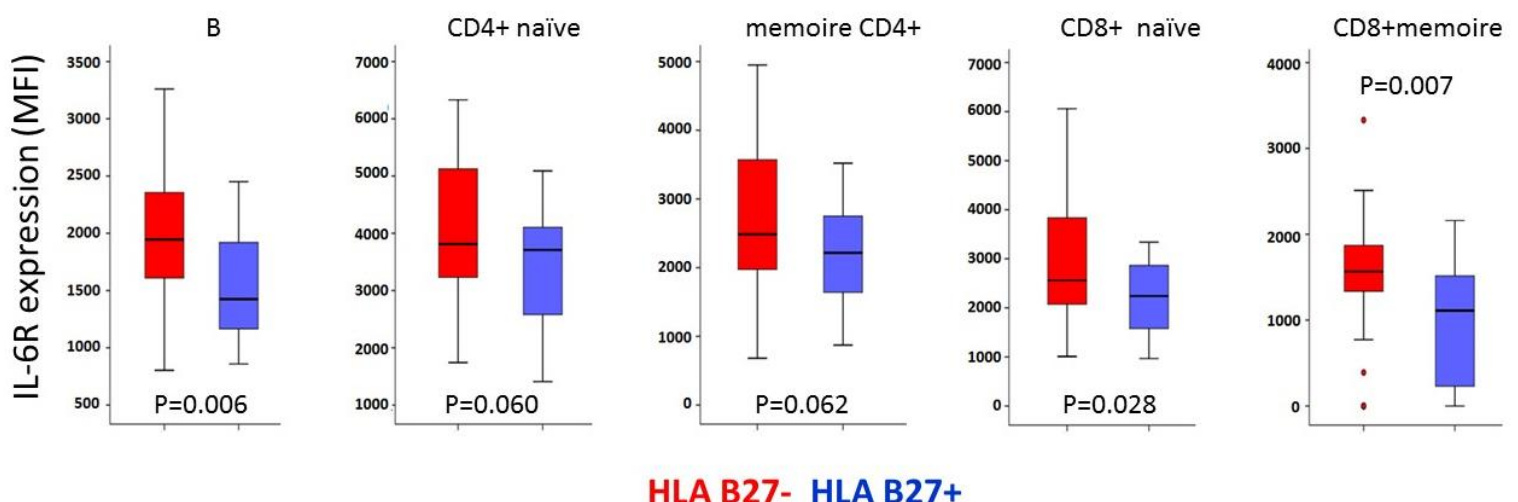


Notons qu'il n'existait aucune différence significative entre les sujets SA et RPso (malgré le nombre restreint de RPso). Ceci permet de justifier d'analyser les 2 pathologies ensemble, afin d'augmenter le nombre de patients. En regroupant les patients SA et RPso, une comparaison entre les SPL en fonction des paramètres cliniques a été effectuée. Aucune corrélation significative n'a pu être mise en évidence. En revanche, il existait des tendances non négligeables pour les paramètres biologiques VS, CRP et le *HLA-B27*.

- La comparaison avec les paramètres biologiques a mis en évidence une corrélation négative entre CD8 mémoires et les mesures du taux d'inflammation systémique tels que la VS (Rho = -0.450 ; **p<0.0001**), renforcé par la même corrélation avec la CRP (Rho = -0.363 ; **p=0.042**). En présence d'un taux d'inflammation élevé, la diminution de cette population dans le sang suggère sa migration vers un site inflammatoire (comme l'enthèse).
- De même, on observait une tendance assez marquée pour une baisse de l'expression de l'IL-6R sur toutes les SPL chez les sujets porteur de l'allèle *HLA-B27* (**figure 3.4**).

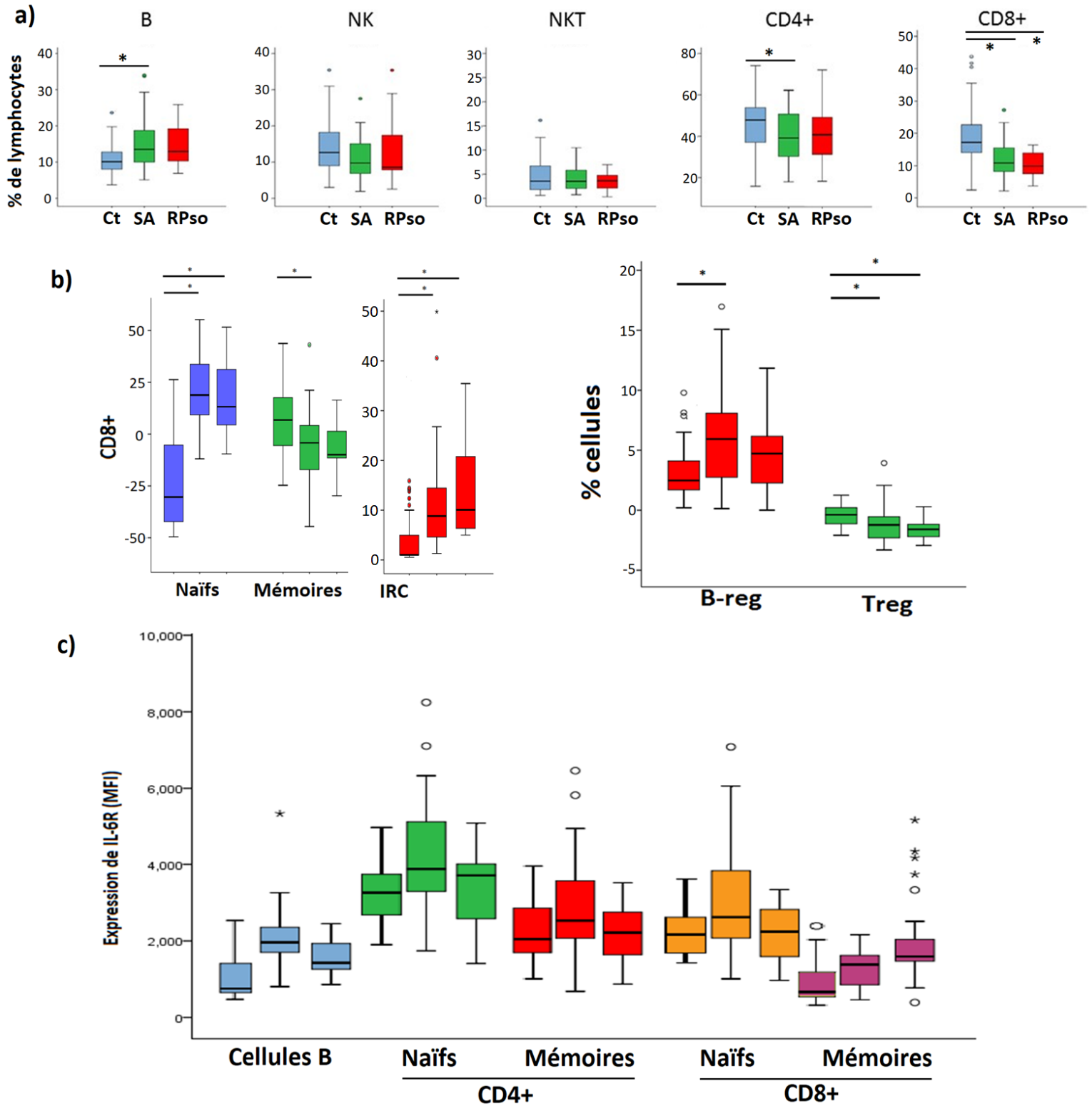
Les différences ainsi observées entre les SPL initiales des patients et des contrôles sont en faveur de l'hypothèse que ces SPL jouent un rôle actif dans la pathologie. L'étude de ces SPL, pour la recherche d'un possible effet prédictif, est donc pleinement justifiée.

**Figure 3.4 :** Boxplots illustrant les différences d'expression de l'IL-6R (MFI) en fonction de la présence ou de l'absence du *HLA-B27*.



**Tableau 3.2** (ci-contre) : Comparaison des fréquences initiales des SPL entre sujets SA, RPso et contrôles. \*n=19 ; § = corrigé pour l'âge ; &= MFI pour expression de l'IL-6.

	Contrôles C (n=19-150)	SA (n = 53)	RPso (n= 15)	Valeurs p SA/C	Valeurs p RPso/C	Valeurs p SA/RPso
Composition sang						
B (%)	10 (3.7 ; 35)	13.5 (5.1 ; 34)	13 (6.9 ; 26)	<b>&lt;0.0001</b>	0.027	0.820
NK (%)	12.2 (3 ; 35)	9.7 (1.9 ; 27.5)	8.6 (2.5 ; 35)	<u>0.009</u>	0.117	0.796
NKT (%)	3.3 (0.6 ; 27.4)	3.5 (0.75 ; 10.5)	3.6 (0.3 ; 7)	0.850	0.681	0.851
CD4 (%)	47 (16 ; 74)	36 (17 ; 56)	37.5 (17 ; 65)	<b>&lt;0.0001</b>	0.018	0.778
CD8 (%)	13.9 (6 ; 36.4)	11 (3 ; 27.2)	9.9 (3.7 ; 16.4)	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.480
Panel CD4						
Naïfs corrigés <sup>\$</sup>	-3.4 (-20 ; +20)	+2.5 (-21 ; +32)	+3.2 (-22 ; +18)	0.341	0.875	0.579
Mémoires corrigés <sup>\$</sup>	+4 (-8 ; +10)	+1.0 (-13 ; +28)	+0.6 (-6.7 ; +18.5)	0.661	0.282	0.385
IRC (%)	1.25 (0.45 ; 7.8)	1.9 (0.5 ; 27)	2.05 (0.6 ; 12.1)	<u>0.001</u>	0.015	0.421
IL-6R (naïfs) <sup>&amp;</sup>	3360 (2000 ; 5080)	3720 (1400 ; 9110)	3315 (1740 ; 4920)	0.158	0.903	0.221
IL-6R (mémoires) <sup>&amp;</sup>	1970 (930 ; 3880)	2440 (870 ; 7250)	2225 (680 ; 4150)	0.133	0.626	0.288
IL-6R (IRC) <sup>&amp;</sup>	1650 (580 ; 3900)	2110 (826 ; 7450)	1960 (1120 ; 3050)	0.070	0.361	0.288
Panel CD8						
Naïfs corrigés <sup>\$</sup>	-13.3 (-23.5 ; +26.3)	+18.7 (-11.9 ; +53)	+13.2 (-9.5 ; +51)	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.593
Mémoires corrigés <sup>\$</sup>	-5.1 (-30 ; +6.5)	-13.5 (-38 ; +26)	-18.3 (-35 ; +3.6)	<b>&lt;0.0001</b>	<u>0.004</u>	0.810
IRC (%)	4.25 (1.2 ; 16)	8.9 (2.2 ; 41)	10.1 (3.9 ; 35.5)	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.216
IL-6R (naïfs) <sup>&amp;</sup>	2190 (1450 ; 3640)	2500 (970 ; 8050)	2065 (1010 ; 4680)	0.135	0.792	0.180
IL-6R (mémoires) <sup>&amp;</sup>	995 (650 ; 2720)	1530 (460 ; 5170)	1565 (390 ; 3330)	0.850	0.227	0.400
IL-6R (IRC) <sup>&amp;</sup>	761 (480 ; 2450)	1170 (350 ; 4600)	1170 (375 ; 3710)	0.100	0.081	0.758
Panel B						
Naïfs corrigés <sup>\$</sup>	+7.4 (-32 ; +27)	-7.3 (-42 ; +18.6)	-6.8 (-39 ; +11)	<u>0.002</u>	0.011	0.433
Mémoires corrigés <sup>\$</sup>	-10.6 (-31 ; +34)	+3.5 (-25.4 ; +40)	+2.2 (-24.5 ; +42.3)	0.065	0.250	0.892
Breg (%)	4.6 (1.75 ; 9.8)	5.1 (0.9 ; 17)	5.3 (0.4 ; 13.6)	<b>&lt;0.0001</b>	0.107	0.486
IL-6R (B totales) <sup>&amp;</sup>	1160 (880 ; 4050)	1810 (800 ; 5340)	1915 (865 ; 2620)	0.090	0.062	0.554
Panel Treg						
Treg corrigés <sup>\$</sup>	-0.25 (-2.5 ; +0.75)	-1.15 (-3.3 ; +2.1)	-1.6 (-3 ; +0.3)	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.485
Helios (%)	74 (55 ; 87)*	75 (55 ; 85)	72 (62 ; 85)	0.236	0.983	0.159
Panel Th17						
Th17%	5.32 (1.07 ; 17.14)	5.11 (0.46 ; 13.41)	4 (0.64 ; 8.20)	0.428	0.377	0.131
KIR3DL2 MFI	650 (530-800)*	710 (510-1200)	795 (650-1540)	0.200	<u>0.001</u>	<u>0.010</u>



**Figure 3.5 :** Boxplots représentant les différences entre les groupes : a) lignées lymphocytaires. (\*différences significatives) ; b) Proportions des SPL T CD8+ naïves, mémoires et IRC, et des cellules T et B régulatrices, dans l'ordre : contrôles, SA, RPso ; c) Expression de l'IL-6R sur différentes SPL, dans l'ordre : contrôles, SA, RPso.

### 3.3 Analyse de la réponse en fonction des paramètres cliniques initiaux.

Après l'initiation du biomédicament, les patients ont été revus en consultation à 3 mois puis à 6 mois de traitement (M3, M6) et la réponse clinique évaluée. Pour les patients non revus en consultation, les données manquantes ont été recueillies à partir du dossier du patient. Il s'agit en effet d'une étude en milieu hospitalier, basée sur la participation volontaire des patients. Une synthèse a été effectuée afin de déterminer la réponse clinique.

Une analyse des données cliniques en fonction de la réponse sans tenir compte du biomédicament choisi a d'abord été effectuée (**tableau 3.3**). Aucun paramètre clinique mesuré en routine n'était associé à la réponse au traitement. On note néanmoins que la présence de l'allèle *HLA-B27* montrait une tendance vers une meilleure réponse ( $p=0.061$ ). On note également qu'un traitement antérieur par biomédicament était associé à une non-réponse au traitement ( $p=0.051$ ).

Malgré la différence de mécanisme d'action, il n'a pas été mis en évidence de différence significative dans le taux de réponse selon le biomédicament : 31% pour anti-IL17 et 41% pour anti-TNF ( $p = 0.283$ ). L'analyse de la réponse en fonction du biomédicament anti-TNF ou anti-IL-17 a été néanmoins étudiée dans un 2<sup>e</sup> temps (**tableaux 3.4 et 3.5**). Trois patients traités par des anti-IL-12/23 ne rentraient pas en compte dans cette analyse.

On peut noter que, de façon très limitée, cette analyse montrait que :

- La tendance à présenter une meilleure réponse chez les patients *HLA-B27+* était limitée aux patients traités par anti-IL-17 ( $p=0.153$ ), mais pas par anti-TNF ( $p=0.213$ ).
- Les patients ayant un IMC plus élevé (**figure 3.6**) avait une meilleure réponse aux anti-TNF ( $p=0.025$ ) mais pas aux anti-IL-17 ( $p=0.653$ ).

**Tableau 3.3** : Comparaison entre la réponse au traitement (tous biomédicaments confondus) et les paramètres cliniques à l'inclusion

Total	Réponse (n=24)	Non réponse (n=44)	Valeurs p
Âge	40 (23 ; 54)	41 (21 ; 55)	0.729
Sexe féminin	67% (16/24)	70% (31/44)	0.477
IMC	26.4 (18.38 ; 53.4)	25.5 (17.6 ; 39.7)	0.258
HLA-B27+	57% (13/23)	33% (14/42)	<b><u>0.061</u></b>
Fumeur	42% (10/24)	34% (15/44)	0.360
Lésions à l'IRM	86% (19/22)	83% (34/41)	0.513
Axial vs axial et P.	7 vs 16	11 vs 30	0.488
Réveils nocturnes	97% (23/24)	88% (38/44)	0.214
Rachialgies inflam.	100% (24/24)	93% (41/44)	0.264
Sacro-iliaques	97% (23/24)	83% (36/44)	0.101
Enthésites	54% (13/24)	70 % (31/44)	0.141
DM>30min	83% (20/24)	93% (40/43)	0.202
NAD	2.5 (0 ; 10)	2 (0 ; 28)	0.865
NAG	0 (0 ; 4)	0 (0 ; 2)	0.789
EVA globale	70 (40 ; 90)	70 (50 ; 95)	0.382
BASDAI	6.75 (3.65 ; 8.8)	6.3 (1.85 ; 9)	0.492
BASFI	5.7 (2.2 ; 9.6)	5.6 (0.3 ; 9.7)	0.793
ASDAS VS	3.27 (1.50 ; 4.80)	3 (1.50 ; 4.74)	0.395
ASDAS CRP	3.18 (2.16 ; 4.70)	3.05 (1.70 ; 4.90)	0.726
VS	6 (2 ; 27)	8 (1 ; 61)	0.376
CRP*	<5 (<5 ; 21.6)	<5 (<5 ; 39.7)	0.685
TT antérieur par BioM	38% (9/24)	61% (27/44)	<b><u>0.051</u></b>
csDMARDs	25% (6/24)	16 % (7/44)	0.274
AINS	71% (17/24)	59% (26/44)	0.244

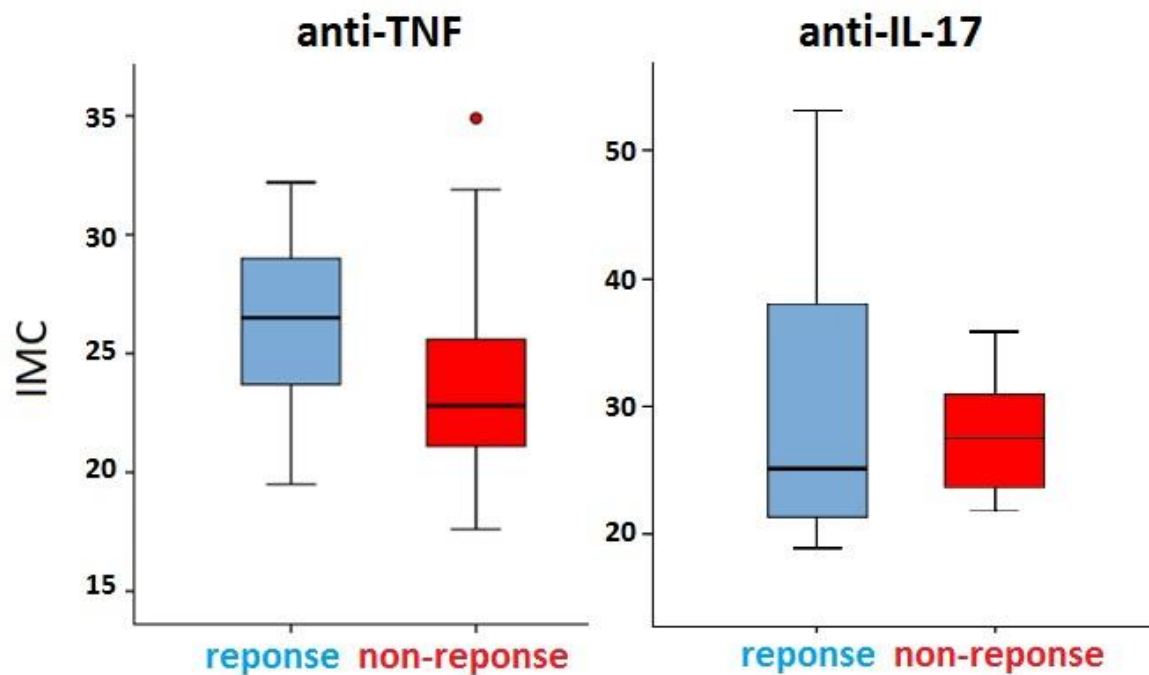
**Tableau 3.4** : Analyse de la réponse en fonction des données cliniques chez les patients traités par anti-TNF

Anti-TNF	Réponse (n=16)	Non réponse (n=23)	Valeurs p
Âge	41 (23 ; 54)	43 (21 ; 67)	0.746
Sexe féminin	56% (9/16)	74% (17/23)	0.210
IMC	26.5 (19.5 ; 53.4)	22.8 (17.6 ; 34.9)	<b><u>0.025</u></b>
HLAB27+	53% (8/15)	35% (8/23)	0.213
Fumeur	44% (7/16)	43% (10/23)	0.611
Lésions à l'IRM	80% (12/15)	86% (18/21)	0.490
Axial vs axial et P	7 vs 16	4 vs 23	0.080
Réveils nocturnes	100% (16/16)	83% (19/23)	0.102
Rachialgies inflam.	100% (16/16)	91% (21/23)	0.333
Sacro-iliaques	94% (15/16)	83% (19/23)	0.292
Enthésites	50% (8/16)	70% (16/23)	0.321
DM>30min	88% (14/16)	91% (21/23)	0.380
NAD	2 (0 ; 10)	2 (0 ; 10)	0.877
NAG	0 (0 ; 0)	0 (0 ; 2)	0.507
EVA globale	70 (50 ; 90)	70 (50 ; 85)	0.641
BASDAI	6.8 (3.65 ; 8.7)	6.8 (1.85 ; 8.3)	0.965
BASFI	6.1 (2.2 ; 8.25)	5.8 (0.3 ; 8.0)	0.791
ASDAS VS	3.28 (1.50 ; 4.80)	3 (1.50 ; 4.50)	0.339
ASDAS CRP	3.19 (2.16 ; 4.70)	3 (1.90 ; 3.90)	0.641
VS	7 (2 ; 42)	9 (2 ; 37)	0.849
CRP*	<5 (<5 ; 17)	<5 (<5 ; 15)	0.454
TT antérieur par BioM	13% (2/16)	26% (6/23)	0.270
csDMARDs	25% (4/16)	26% (6/23)	0.620
AINS	81% (13/16)	61% (14/23)	0.160

**Tableau 3.5** : Analyse de la réponse en fonction des données cliniques chez les patients traités par anti-IL-17.

Anti-IL17	Réponse (n=8)	Non réponse (n=18)	Valeurs p
Âge	35 (19 ; 57)	43 (21 ; 60)	0.311
Sexe féminin	88% (7/8)	67% (12/18)	0.274
IMC	25.1 (18.8 ; 53.1)	27.4 (21.9 ; 35.8)	0.653
HLAB27+	63% (5/8)	31% (5/16)	<u>0.153</u>
Fumeur	38% (3/8)	22% (4/18)	0.361
Lésions à l'IRM	100% (7/7)	88% (15/17)	0.500
Axial vs axial et P	0 vs 8	6 vs 11	0.070
Réveils nocturnes	88% (7/8)	89% (16/18)	0.550
Rachialgies inflam.	100% (8/8)	100% (18/18)	NA
Sacro-iliaques	100% (8/8)	78% (14/18)	0.205
Enthésites	63% (5/8)	67% (12/18)	0.587
DM>30min	75% (6/8)	89% (16/18)	0.360
NAD	4 (0 ; 4)	2 (0 ; 28)	0.978
NAG	4 (0 ; 4)	0 (0 ; 0)	0.338
EVA globale	80 (40 ; 90)	70 (50 ; 95)	0.683
BASDAI	6.6 (4.9 ; 8.8)	6.3 (3.8 ; 9)	0.429
BASFI	5.3 (3.95 ; 5.65)	5.2 (1.10 ; 9.70)	0.720
ASDAS VS	2.9 (2.45 ; 4.60)	3 (1.80 ; 4.74)	0.710
ASDAS CRP	2.93 (2.47 ; 4.10)	2.9 (1.70 ; 4.90)	0.710
VS	16 (2 ; 27)	7 (1 ; 61)	0.374
CRP*	<5 (<5 ; 21.6)	<5 (<5 ; 40)	0.892
TT antérieur par Bio	88% (7/8)	100% (18/18)	0.308
csDMARDs	25% (2/8)	6% (1/18)	0.215
AINS	50% (4/8)	67% (12/18)	0.352

**Figure 3.6 :** Boxplots illustrant la différence d'IMC entre les patients répondeurs ou non répondeurs aux anti-TNF et aux anti-IL-17.

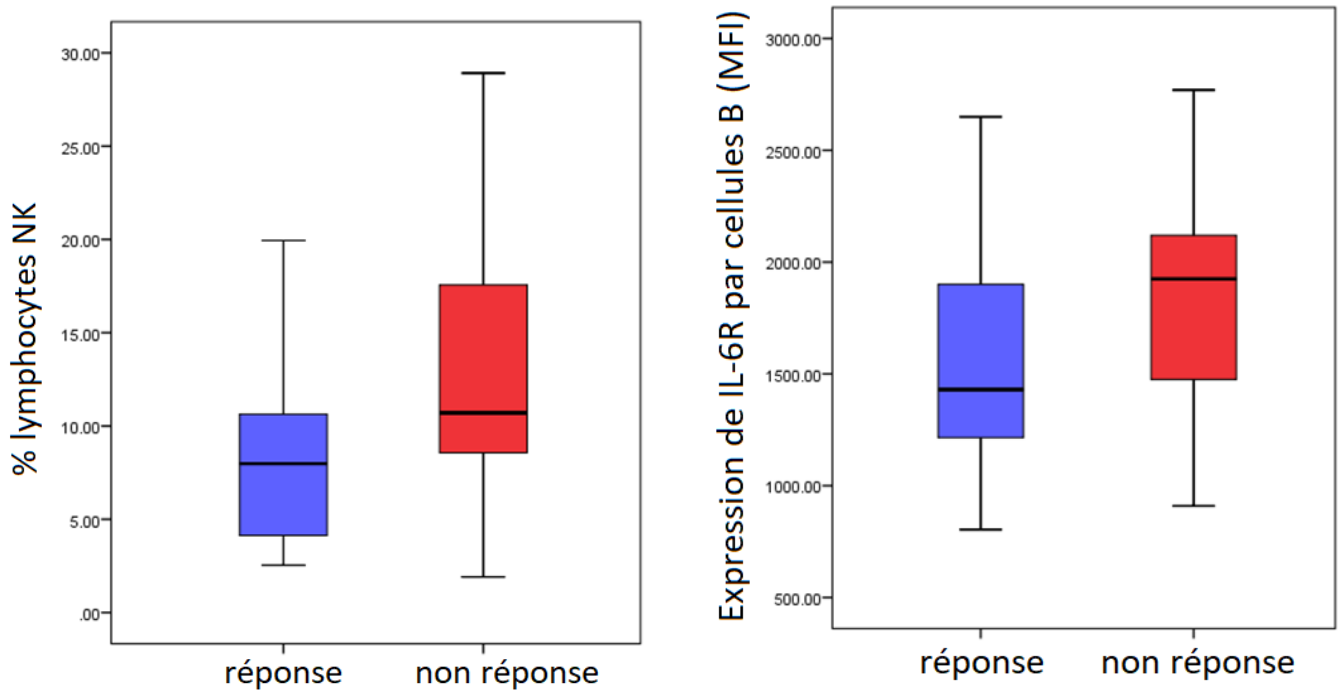


#### 3.4 Analyse de la réponse en fonction des fréquences initiales des SPL

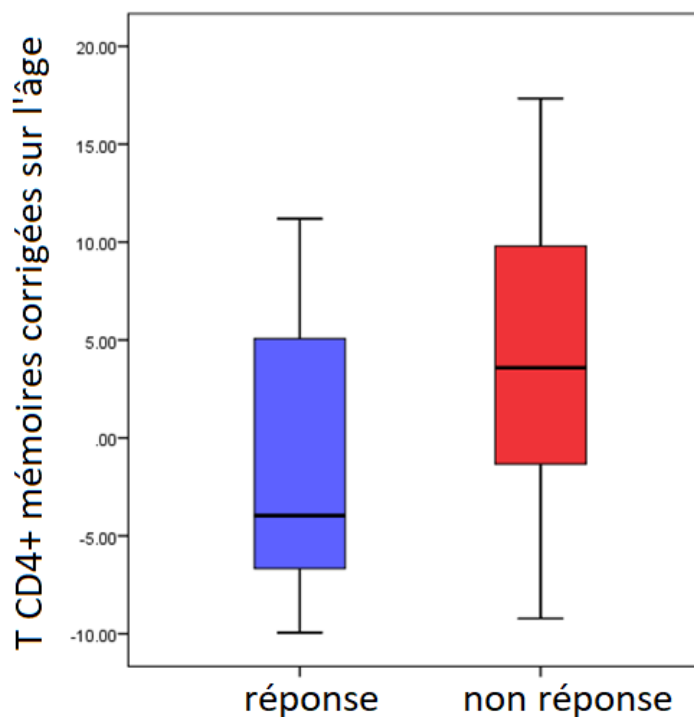
L'analyse de la réponse en fonction des proportions initiales des SPL sans tenir compte du biomédicament choisi a été étudiée en premier (**tableau 3.6**). La réponse au traitement était associée à une fréquence plus faible de la population NK ( $p=0.016$ ), (**figure 3.7**) et à une expression plus faible de l'IL-6R sur les cellules B ( $p=0.04$ ), mais à très peu des autres SPL.



**Figure 3.7 :** Boxplots illustrant la différence des fréquences initiales des cellules NK et de l'expression de l'IL-6R par les cellules B, entre répondeurs et non répondeurs tous biomédicaments confondus.



**Figure 3.8 :** La non-réponse aux anti TNF est associée à la présence the plus de CD4 mémoires.



**Tableau 3.6** : Comparaison réponse clinique / SPL initiales tous biomédicaments confondus.

Total	Réponse (n=24)	Non réponse (n=44)	Valeurs p
<b>Composition sang</b>			
B %	16.2 (7.5 ; 33.7)	14.3 (6.9 ; 34)	0.134
NK%	8.6 (3.4 ; 15)	12.6 (1.9 ; 28.9)	<b>0.016</b>
NKT%	2.8 (0.3 ; 5.3)	4 (1 ; 9)	0.277
CD4%	40 (26.6 ; 50)	42.3 (21.2 ; 50.8)	0.289
CD8%	10.6 (4.9 ; 16.3)	10.3 (4 ; 18.7)	0.286
<b>Panel CD4</b>			
Naïfs corrigés <sup>\$</sup>	+3.86 (-20 ; +19)	+2.3 (-22 ; +32)	<u>0.090</u>
Mémoires corrigés <sup>\$</sup>	-1.6 (-7.7 ; +11)	+2.4 (-9.2 ; +18.4)	<u>0.057</u>
IRC (%)	1 (0.5 ; 7.4)	1.8 (0.8 ; 9.0)	0.536
IL-6R (naïfs) <sup>&amp;</sup>	3720 (2220 ; 5340)	3700 (1740 ; 7970)	0.850
IL-6R (mémoires) <sup>&amp;</sup>	2230 (1310 ; 3780)	2400 (681 ; 6610)	0.780
IL-6R (IRC) <sup>&amp;</sup>	2050 (826 ; 3590)	2180 (1120 ; 6340)	0.830
<b>Panel CD8</b>			
Naïfs corrigés <sup>\$</sup>	+16.3 (+4.0 ; +51.6)	+16.6 (-9.5 ; +45.9)	<u>0.068</u>
Mémoires corrigés <sup>\$</sup>	-19 (-34.8 ; +2.6)	-10.9 (-37.9 ; +7.6)	<u>0.090</u>
IRC (%)	9.7 (3.9 ; 17.8)	8.4 (3.1 ; 28.5)	0.233
IL-6R (naïfs) <sup>&amp;</sup>	2200 (1190 ; 3650)	2380 (1010 ; 6060)	0.860
IL-6R (mémoires) <sup>&amp;</sup>	1400 (773 ; 2160)	1560 (390 ; 4340)	0.176
IL-6R (IRC) <sup>&amp;</sup>	981 (500 ; 1480)	1190 (374 ; 3600)	0.185
<b>Panel B</b>			
Naïfs <sup>\$</sup>	-3.4 (-35.6 ; +8.9)	-7.3 (-39.2 ; +18.6)	0.895
Mémoires <sup>\$</sup>	-1.5 (-20.2 ; +36.7)	+1.7 (-25.4 ; +42.3)	0.700
Breg (%)	4.2 (0.9 ; 17.2)	6.4 (0.4 ; 15.3)	0.175
IL-6R <sup>&amp;</sup>	1430 (804 ; 2650)	1930 (910 ; 3260)	<b>0.040</b>
<b>Panel Treg</b>			
Treg corrigés <sup>\$</sup>	-0.7 (-2.9 ; +2.1)	-1.3 (-3.3 ; +0.1)	0.543
Helios (%)	73.2 (55.4 ; 85.1)	74.2 (62.1 ; 85.1)	0.860
<b>Panel Th17</b>			
Th17%	4.8 (2.3 ; 13.4)	5.0 (0.5 ; 9.4)	0.850
KIR3DL2 MFI	720 (564 ; 851)	689 (512 ; 965)	0.505

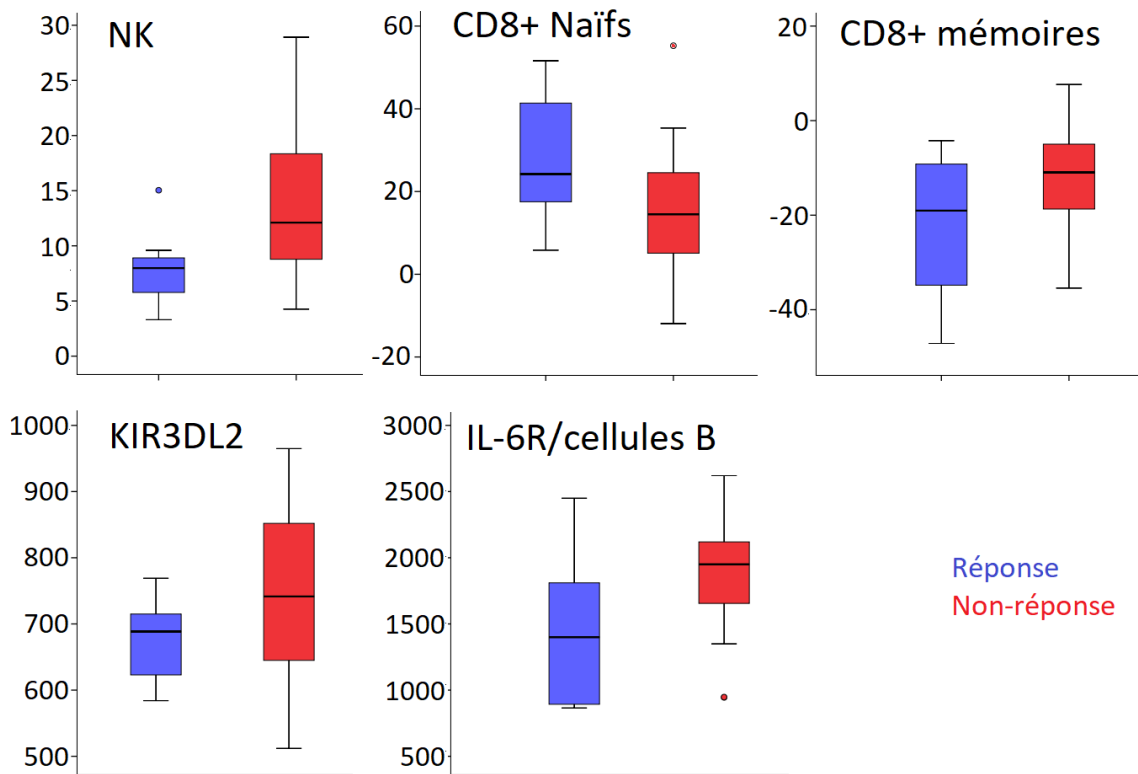
L'analyse de la réponse en fonction des proportions initiales des SPL a donc été répétée chez les patients traités uniquement par anti-TNF (**tableau 3.7**) puis par anti-IL-17 (**tableau 3.8**).

L'analyse a montré qu'une proportion plus élevée de lymphocytes T CD4 mémoires circulantes était associée à une non réponse aux anti-TNF ( $p=0.025$ ), (**figure 3.8**). Aucune autre SPL n'était associée à la réponse (**tableau 3.7**).

L'analyse des SPL en fonction de la réponse chez patients traités par anti-IL-17 était cependant plus intéressante (**tableau 3.8**). Elle montrait des tendances assez claires (dû au petit nombre de patients, n=26) pour une association avec la réponse (**figure 3.9**), avec :

- Fréquence plus basse de lymphocytes NK,
- Fréquence plus élevée des lymphocytes T CD8+ naïfs,
- Fréquence plus basse des CD8+ mémoires,
- Réduction de l'expression du KIR3DL2 sur les Th17,
- Réduction de l'expression de l'IL-6R sur les cellules B.

**Figure 3.9 :** Illustration en Boxplots des principales différences de SPL entre répondeurs et non répondeurs aux anti-IL-17.



**Tableau 3.7** : Analyse de la réponse en fonction des proportions initiales des sous populations lymphocytaires chez les patients traités par anti-TNF

Anti-TNF	Réponse (n=16)	Non réponse (n=23)	Valeurs p
<b>Composition sang</b>			
B %	15.0 (7.5 ; 25.2)	14.2 (6.9 ; 34.0)	0.370
NK%	8.1 (3.4 ; 10.9)	14.4 (3.3 ; 27.5)	<u>0.156</u>
NKT%	2.7 (0.9 ; 5.3)	3.0 (1.3 ; 9.0)	0.844
CD4%	41.8 (26.6 ; 50.1)	46.3 (21.2 ; 48.5)	0.500
CD8%	13.6 (4.9 ; 16.3)	10.9 (4.1 ; 18.7)	0.845
<b>Panel CD4</b>			
Naïfs corrigés <sup>§</sup>	+3.3 (-20 ; +19)	+1.9 (-13.9 ; +31.7)	<u>0.120</u>
Mémoires corrigés <sup>§</sup>	-0.85 (-7.7 ; +11)	-0.39 (-9.2 ; +14)	<b>0.025</b>
IRC (%)	1.1 (0.5 ; 7.4)	1.6 (0.8 ; 5.8)	0.290
IL-6R (naïfs) <sup>&amp;</sup>	3345 (2220 ; 5340)	4330 (1740 ; 7970)	0.570
IL-6R (mémoires) <sup>&amp;</sup>	2250 (1310 ; 3780)	2700 (681 ; 6610)	0.950
IL-6R (IRC) <sup>&amp;</sup>	1975 (826 ; 3170)	2460 (1120 ; 6340)	0.490
<b>Panel CD8</b>			
Naïfs corrigés <sup>§</sup>	+13.4 (+4.0 ; +40.1)	+20.8 (-0.2 ; +46.0)	0.480
Mémoires corrigés <sup>§</sup>	-21.2 (-29.7 ; +2.8)	-16.9 (-37.9 ; -2.1)	0.340
IRC (%)	8.7 (3.9 ; 17.8)	6.1 (3.1 ; 28.5)	0.666
IL-6R (naïfs) <sup>&amp;</sup>	2180 (1190 ; 3650)	2390 (1010 ; 6060)	0.373
IL-6R (mémoires) <sup>&amp;</sup>	1445 (773 ; 1770)	1580 (390 ; 4340)	0.330
IL-6R (IRC) <sup>&amp;</sup>	968 (500 ; 1350)	1190 (374 ; 3600)	0.391
<b>Panel B</b>			
Naïfs <sup>§</sup>	-7.4 (-33.2 ; +8.9)	-10.9 (-26.0 ; +6.1)	0.999
Mémoires <sup>§</sup>	-0.7 (-20.2 ; +32.7)	+4.7 (-12.2 ; +23.9)	0.850
Breg (%)	5.7 (0.9 ; 17.2)	6.7 (3.2 ; 9.9)	0.191
IL-6R <sup>&amp;</sup>	1555 (804 ; 2650)	1940 (910 ; 3260)	0.226
<b>Panel Treg</b>			
Treg corrigés <sup>§</sup>	-1.0 (-2.9 ; +2.1)	-1.2 (-3.0 ; +0.1)	0.890
Helios (%)	70.9 (55.4 ; 82.3)	73.1 (62.1 ; 85.1)	0.733
<b>Panel Th17</b>			
Th17%	4.5 (2.3 ; 13.4)	5.0 (1.2 ; 9.4)	0.895
KIR3DL2 MFI	741 (564 ; 851)	633 (540 ; 941)	0.570

**Tableau 3.8** : Analyse de la réponse en fonction des proportions initiales des sous populations lymphocytaires chez les patients traités par anti-IL-17

Anti IL-17	Réponse (n=8)	Non réponse (n=18)	Valeurs p
<b>Composition sang</b>			
B %	20.9 (12.4 ; 33.7)	15.4 (7.6 ; 23.4)	0.567
NK%	9.6 (7.9 ; 15)	13.3 (4.3 ; 28.9)	<b>0.005</b>
NKT%	2.9 (0.3 ; 3.6)	4.3 (1.0 ; 8.9)	0.605
CD4%	33.2 (33.2 ; 44.8)	39.4 (26.2 ; 48.6)	0.196
CD8%	7.6 (6.2 ; 9.1)	8.8 (5.5 ; 16.4)	0.160
<b>Panel CD4</b>			
Naïfs corrigés <sup>s</sup>	+15.4 (-15.4 ; +18.2)	+3.5 (-22.1 ; +23.2)	0.516
Mémoires corrigés <sup>s</sup>	-1.6 (-6.7 ; +8.5)	+2.9 (-6.7 ; +18.4)	0.760
IRC (%)	1.0 (0.6 ; 4.3)	1.9 (1.2 ; 9.0)	0.920
IL-6R (naïfs) <sup>&amp;</sup>	3820 (2660 ; 4870)	3635 (2630 ; 6030)	0.450
IL-6R (mémoires) <sup>&amp;</sup>	2230 (1790 ; 3160)	2325 (1770 ; 3820)	0.780
IL-6R (IRC) <sup>&amp;</sup>	2290 (1500 ; 3590)	2130 (1840 ; 3890)	0.603
<b>Panel CD8</b>			
Naïfs corrigés <sup>s</sup>	+24.2 (+5.8 ; +51.6)	+12.2 (-9.6 ; +29.4)	<u>0.147</u>
Mémoires corrigés <sup>s</sup>	-19.2 (-34.8 ; -4.3)	-9.2 (-34.2 ; +7.6)	<u>0.177</u>
IRC (%)	9.7 (5.6 ; 11.0)	10.1 (3.1 ; 26.8)	0.473
IL-6R (naïfs) <sup>&amp;</sup>	2600 (1440 ; 2910)	2440 (1840 ; 4310)	0.495
IL-6R (mémoires) <sup>&amp;</sup>	2230 (1790 ; 3160)	2325 (1770 ; 3820)	<u>0.194</u>
IL-6R (IRC) <sup>&amp;</sup>	1010 (707 ; 1480)	1190 (1080 ; 1920)	0.720
<b>Panel B</b>			
Naïfs corrigés <sup>s</sup>	+0.6 (-35.6 ; +7.7)	-4.3 (-39.2 ; +18.6)	0.800
Mémoires corrigés <sup>s</sup>	-9.2 (-10.3 ; +36.7)	-3.5 (-25.4 ; +42.3)	0.799
Breg (%)	4.2 (3.3 ; 10.4)	7.1 (0.4 ; 15.3)	0.344
IL-6R <sup>&amp;</sup>	1430 (865 ; 2450)	1950 (1350 ; 2620)	<u>0.115</u>
<b>Panel Treg</b>			
Treg corrigés <sup>s</sup>	+0.3 (-1.1 ; +0.4)	-1.7 (-3.0 ; -0.3)	0.308
Helios (%)	82.3 (72.1 ; 85.1)	74.9 (64.6 ; 81.2)	0.760
<b>Panel Th17</b>			
Th17%	7.4 (2.3 ; 10.8)	6.2 (0.6 ; 9.1)	0.935
KIR3DL2 MFI	710 (700 ; 720)	760.5 (512 ; 965)	<u>0.144</u>

## 4 Discussion

L'analyse de la réponse clinique en fonction des SPL a pu mettre en évidence une association avec une fréquence plus faible de lymphocytes NK et la réponse au biomédicament ( $p=0.016$ ). Il existait également une association avec une expression plus faible de l'IL-6R sur les cellules B ( $p=0.040$ ). Cette analyse ne montre que peu de résultats probablement car elle peut être confondue par le mécanisme d'action différent de tous les biomédicaments utilisés (adalimumab, golimumab, certolizumab, étanercept, infliximab, sécukinumab, ustékinumab). Une analyse séparant les 2 type de biomédicament majeurs (anti-TNF et anti-IL-17) a donc été réalisée.

Pour les anti-TNF (adalimumab, golimumab, certolizumab, étanercept, infliximab), les deux associations observées préalablement ont disparu (étant probablement associées aux anti-IL-17). Une seule association est conservée avec une réduction des CD4 mémoires ( $p=0.025$ ) compensée par une augmentation des CD4 naïfs ( $p=0.120$ ). Ce résultat est probablement artificiel dans ce groupe de patients, étant en plus non corrigé pour une analyse multiple.

Les associations avec la réponse aux anti-IL-17 étaient néanmoins plus intéressantes, d'autant plus qu'elles n'ont jamais été décrites auparavant. L'association avec une réduction de la fréquence des lymphocyte NK ( $p=0.005$ ) est inattendue. Celle avec l'expression plus faible du KIR3DL2 sur les cellules Th17 ( $p=0.144$ ) était plus prévisible (même si non significative dans un groupe de 26 patients). La participation du récepteur KIR3DL2 sur les cellules CD4+ et NK dans l'activité de la spondyloarthrite a déjà été démontrée[28]. En effet, ce récepteur spécifique de l'homodimère de B27<sup>2</sup> activerait une cascade de signalisation pro-inflammatoire[10]. L'inhibition du B27<sup>2</sup> comme stratégie thérapeutique a déjà été étudiée[29]. L'expression du KIR3DL2 était plus importante chez les patients RPso que SA (**tableau 3.2**,  $p=0.010$ ). Ce résultat pourrait donc sous-entendre un rôle physiologique pour la molécule KIR3DL2 sur les cellules CD4+Th17 et/ou NK associée à une meilleure réponse clinique aux anti-IL-17, en relation avec la présence du *HLA-B27*, et plus particulièrement chez les patient RPso. L'étude de l'expression du KIR3DL2 sur les cellules NK n'a pas été effectuée, mais pourrait se révéler pertinente dans le futur.

Le rôle de l'IL-6 sérique dans la pathogénèse de la SA a déjà été démontré[30], de même que son rôle important dans la balance Th17/Treg, en favorisant la prolifération des Th17 au détriment des Treg[31]. Dans notre étude, une expression plus forte du récepteur de l'IL-6 (en particulier sur les cellules B et CD8 mémoires) était associée avec la non-réponse clinique aux agents anti-IL-17. Il s'agit d'une piste de recherche intéressante, bien qu'aucune étude sur le rôle de l'IL-6 dans la réponse anti-IL-17 n'ait été rapportée à ce jour.

Les résultats obtenus laissent penser que certaines SPL peuvent avoir une valeur prédictive dans la réponse à certains biomédicaments (anti-IL-17 plus que les anti-TNF dans notre étude). Cela ouvre la voie à des travaux ultérieurs, avec pour objectifs notamment la comparaison des proportions de SPL :

- Différentes des sujets sains, afin de déterminer leur rôle dans la pathologie,
- Ayant une valeur prédictive pour la réponse selon le traitement utilisé,
- Avant et après traitement afin d'étudier leur évolution, en fonction du mode d'action du traitement utilisé.

Pour ce faire, il sera nécessaire d'étendre le nombre de sujets contrôles français, afin d'optimiser la correction des SPL par rapport à l'âge avec une population locale, et de recruter de nouveaux patients.

L'étude de l'expression du KIR3DL2 sur les lymphocytes Th17 s'est révélée intéressante, et aux vues des résultats sur les cellules NK, suggère d'étudier l'expression de ce récepteur sur tous les types de lymphocytes, afin de déterminer d'une part son rôle dans la réponse, et d'autre part la valeur prédictive que pourrait avoir l'une ou l'autre de ces cellules. Cette analyse n'a pas pu être effectuée devant l'impossibilité de changer tous les protocoles au cours de l'étude.

La comparaison des fréquences des SPL à l'inclusion entre les sujets atteints de SpA et les sujets contrôles a montré des différences significatives. Ceci avait déjà été démontré concernant les populations Th17[6][32].

Chez les patients SA, et dans une moindre mesure RPso, on a noté une fréquence plus élevée des lymphocytes B (médiane 13.5% vs 10%) dans la circulation et une baisse des CD4/CD8, avec une différence plus significative pour les CD8, car présente dans les 2 maladies (médiane SA 11%, RPso 9.9% vs contrôles 13.9%), suggérant peut-être le recrutement de ces dernières vers un site inflammatoire. Ceci corrobore l'idée que la spondyloarthrite fait plutôt intervenir l'immunité cellulaire, prédominant sur les CD8[8]. Par contre, l'analyse des sous-populations

de CD8 a montré une augmentation en faveur des CD8 naïves et une réduction des CD8 mémoires dans la circulation par rapport aux contrôles. Ceci renforce encore l'idée d'une implication des CD8 avec une homéostasie peut-être bouleversée, et une migration des CD8 mémoires vers les sites inflammatoires, augmentant la représentation des CD8 naïfs dans le sang.

Une analyse des corrélations entre les SPL et les paramètres cliniques à l'inclusion a été effectuée, mais n'a pas mis en évidence de résultat significatif. En revanche, il existait des corrélations avec les facteurs biologiques VS et CRP. La plupart de ces corrélations étaient inférieures à  $\rho = 0.350$  en valeur absolue (malgré  $p < 0.05$ ) et donc probablement artificielles. Une seule apparaissait néanmoins plus fiable entre VS et CD8 mémoires ( $\rho = -0.450$ ,  $p < 0.0001$ ), confirmée par une corrélation similaire avec la CRP ( $\rho = -0.362$  ;  $p = 0.042$ ). Ceci suggère donc encore que la migration des CD8 mémoires est en relation directe avec l'inflammation (leur disparition du sang rendant cette corrélation négative).

L'inflammation (notamment mesurée par la CRP) a été reliée à un taux d'IL-6 plus important[33]. Ceci pourrait être la raison de l'expression plus forte de ce récepteur en particulier sur les cellules B (médiane MFI SA = 1810, RPso = 1915, contrôles = 1160) et CD8 mémoires (médiane MFI SA = 1530, RPso = 1565 et contrôles = 995) et confirme un rôle potentiel pour cette cytokine dans cette pathologie. Une méta-analyse a notamment rapporté que des taux élevés d'IL-6 (et IL-17) pourraient être utilisés dans le diagnostic et le suivi de l'efficacité des traitements chez les patients SA[30]. En revanche, aucune efficacité des inhibiteurs de l'IL-6 n'a pu être mise en évidence chez les patients SA, naïfs ou en relais d'anti-TNF[34][35]. L'expression réduite du récepteur de l'IL-6 était aussi systématiquement associée à la présence de l'allèle *HLA-B27*, notamment pour les cellules B (médiane MFI = 1425 vs 1945 pour B27 négatifs) et les CD8 mémoires (1380 vs 1585). Ces tendances étaient suffisamment importantes pour attirer l'attention quant à l'intérêt d'étudier l'implication de l'IL-6 chez les sujets *HLA-B27+*.

L'analyse de la dynamique des SPL a été effectuée chez 53 patients, et les résultats exprimés sous forme de « heatmap ». Le principe statistique d'une représentation en heatmap repose sur la corrélation de Spearman, permettant d'arranger les variables entre elles selon leur degré de corrélation. Un effet global entre SPL a ainsi pu être visualisé : concernant notamment l'expression de l'IL-6R sur toutes les SPL. Une « variable latente » pourrait être ainsi créée, en



synthétisant l'expression de l'IL-6R à une seule variable, afin de simplifier l'analyse. A contrario, certaines variables de moindre intérêt pourraient être retirées. Un autre groupe de données est ressorti : concernant les CD4/CD8 naïfs. Celles -ci montraient une corrélation inversée avec les CD4/CD8 mémoires. L'idée de créer des ratio entre naïfs et mémoires pourrait être envisagée, afin de générer des variables plus sensibles et de simplifier l'analyse. Ces possibilités pourraient être testées sur d'autres patients dans un travail ultérieur. Par ailleurs, une analyse similaire faite en relation avec les données de réponse clinique n'a pas mis en évidence de groupage particulier des patients. Cependant, l'analyse a été faite sur tous les patients. Au vu de l'implication de certaines des SPL dans la réponse aux anti-IL-17 (mais pas aux anti-TNF), cette analyse pourrait être refaite en fonction de ce paramètre en particulier, avec un nombre de patients plus important afin de créer un profil type du patient répondeur et non répondeur.

De façon générale, l'analyse est limitée par 2 facteurs principaux :

- Le petit nombre de patient et l'hétérogénéité du groupe ne permettent qu'une étude « pilote », indicative de ce qu'il serait intéressant de poursuivre dans une autre étude plus approfondie et mieux adaptée.
- L'utilisation d'une population mixte française et anglaise pour les sujets contrôles. La comparaison entre les sujets sains français et anglais n'a pas été effectuée, mais reste limitée par le petit nombre de sujets inclus en France ainsi que par le jeune âge de ces sujets. Des différences peuvent entrer en compte entre les deux populations, qui n'ont pas été mises en évidence, mais qu'il serait impératif de mieux contrôler dans une nouvelle étude.

L'âge médian des 68 patients inclus était de 41 ans, ce qui correspond à la pathologie, dont les symptômes débutent généralement avant l'âge de 45 ans[1]. Les femmes étaient plus représentées (69%) que dans les cohortes décrites dans la littérature[36][37]. La proportion des patients inclus porteurs du *HLA-B27* était plus faible (41%) que dans les cohortes de SpA déjà décrites (usuellement de 80%)[1][36]. Dans le RPso, la proportion de *HLA-B27* était de 44% ce qui correspond aux proportions décrites[38]. En revanche, la présence d'une lésion inflammatoire typique à l'IRM du rachis ou des sacro iliaques était plus importante (83%). Le nombre d'articulations périphériques douloureuses (NAD) avait tendance à être plus élevé chez les sujets RPso ( $p=0.100$ ), ce qui concorde avec les manifestations cliniques de cette pathologie, et peut donc être considéré comme normal. La comparaison des atteintes axiales ou

périphériques entre SA et RPso n'était donc pas significative. L'évaluation de la douleur par les patients sur l'échelle visuelle analogique (EVA) avait tendance à être plus faible chez les sujets RPso ( $p=0.03$ ). Ceci peut être expliqué par le fait que ces patients étaient plus souvent traités de façon concomitante par un csDMARDs tel que le méthotrexate (RPso : 33% (5/15) des patients ont reçu MTX vs SA : 15% (8/53)), efficace sur les atteintes périphériques[20].

Les scores d'activité du rhumatisme (BASDAI) étaient élevés (médiane = 6.6), justifiant un traitement par biomédicament. Les scores de retentissement fonctionnel (BASFI) étaient moins élevés (médiane = 5.5), témoignant d'une population jeune (âge médian 41 ans) n'ayant pas encore de lésions d'ankyloses sévères. Les niveaux de VS (médiane = 8mm) et CRP (médiane <5mg/l) étaient bas, l'inflammation systémique étant généralement plus modeste dans ce type de rhumatisme.

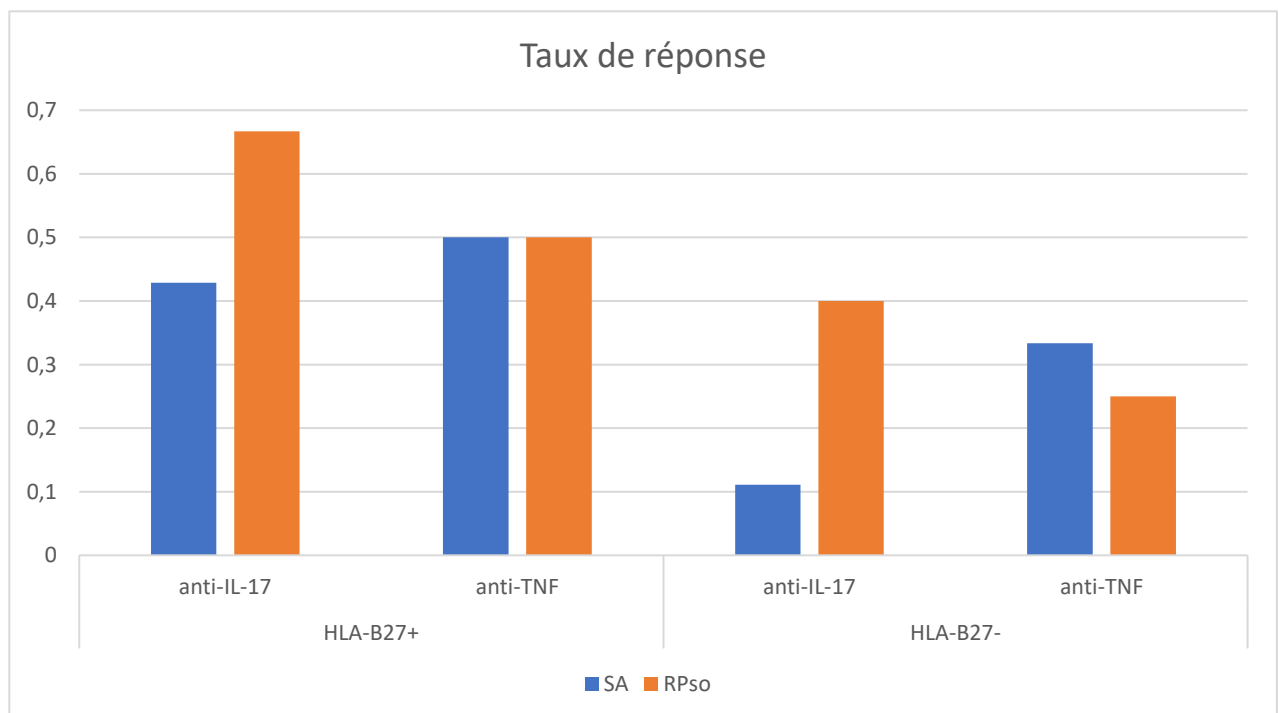
Les paramètres cliniques recueillis à l'inclusion n'ont pas permis de prédire une réponse clinique quel que soit le biomédicament utilisé, d'où l'intérêt de rechercher des nouveaux biomarqueurs. Cependant, même si les deux groupes présentaient des fréquences *HLA-B27* similaires (**tableau 3.1**, 43% pour AS versus 36% pour RPso,  $p=0.428$ ) on note que les patients répondeurs étaient plus souvent *HLA-B27+* (**tableau 3.3**, 57% vs 33% chez les non-répondeurs,  $p = 0.061$ ), et ce quel que soit le traitement utilisé. L'explication la plus probable vient du fait que la pathologie a vraisemblablement été prise en charge plus tôt, car la présence du *HLA-B27* est l'un des critères majeurs du diagnostic. Or, plus le traitement est initié tôt, plus il a de chance d'être efficace et d'aboutir à une rémission[39][40], comme dans d'autres pathologies inflammatoires notamment la PR. De même, les patients qui avaient déjà reçu au moins un biomédicament présentaient un risque plus élevé de non-réponse, comme décrit dans d'autres études[41][42]. Les patients ayant un IMC plus élevé (figure 3.6) avait une meilleure réponse aux anti-TNF ( $p=0.025$ ) mais pas aux anti-IL-17 ( $p=0.653$ ). Ce résultat ne concordait pas avec la littérature[43], peut-être en raison de la disparité du groupe de patients (SA et RPso).

La comparaison des traitements anti-TNF et anti-IL-17 en termes de réponse clinique n'a pas mis en évidence de différence statistiquement significative (41 % et 31% respectivement). De plus, il est important de noter que tous les patients traités par anti-IL-17 avaient déjà reçu un anti-TNF. L'efficacité des anti-IL-17 (32%) était donc suffisamment importante pour que le taux de réponse soit plus important que chez les patients ayant déjà reçu un biomédicament et recevant un anti TNF (25%), même s'il restait inférieur au taux de réponse des patients naïfs

recevant un anti TNF (45%). L'utilisation d'un anti IL-17 est donc efficace après échec des anti-TNF. Néanmoins il aurait été intéressant de mesurer son efficacité en traitement de première intention.

Une des principales limitations de ces résultats était le regroupement des patients SA et RPso, interférant peut-être avec nos observations. Cependant, tant du point de vue clinique (**tableau 3.1**) que concernant les SPL (**tableau 3.2**), les deux groupes étaient initialement comparables sauf pour l'expression du KIR3DL2 sur les cellules Th17 ( $p=0.010$ ). Les taux de réponse étant similaires aux 2 principaux traitements (anti TNF 41% et anti-IL-17 31%), les séparer sur la base du type de traitement utilisé a néanmoins permis d'obtenir des résultats d'un point de vue statistique, renforçant l'absence de facteur prédictif de la réponse aux anti-TNF, mais évoquant un rôle majeur pour la présence du *HLA-B27* pour la réponse aux anti-IL-17. De plus, parmi les 9 patients RPso qui ont reçu de l'anti-IL-17, 45% ont répondu au traitement. En revanche, 24% ont répondu parmi les 17 patients SA. Ceci laisse supposer que les anti-IL-17 seraient plus efficaces dans le rhumatisme psoriasique. L'association des deux facteurs, *HLA-B27* et diagnostic, permet de renforcer encore l'idée que les anti-IL-17 ont plus de chance d'être efficaces chez les patient RPso et *HLA-B27+* (**figure 4.1**), bien que ceci reste très spéculatif au vu de très petit nombre de patients dans chaque sous-groupe.

**Figure 4.1** : Taux de réponse clinique (% de patients) en fonction des 2 paramètres : *HLA-B27* et diagnostic (AS ou RPso).



## 5 Conclusion

Ce travail a montré que l'étude des SPL, chez les sujets atteints de SpA et recevant un biomédicament, peut avoir un intérêt en pratique clinique. En effet, la fréquence de certaines populations impliquées dans la physiopathologie était incontestablement différente quand comparée avec des sujets sains, permettant de valider notre analyse au niveau technique. L'étude de ces SPL a également validé l'hypothèse d'une association de certaines d'entre elles avec la réponse clinique, plus particulièrement lorsque les patients étaient traités par un agent anti-IL-17, de façon moins significative quand un anti-TNF était utilisé.

## 6 Références bibliographiques

- [1] Dougados M, Baeten D. Spondyloarthritis. *Lancet* 2011;377:2127–37.  
doi:10.1016/S0140-6736(11)60071-8.
- [2] Saraux A, Guillemin F, Guggenbuhl P, Roux CH, Fardellone P, Le Bihan E, et al. Prevalence of spondyloarthropathies in France: 2001. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1431–5.  
doi:10.1136/ard.2004.029207.
- [3] Sieper J, Rudwaleit M, Baraliakos X, Brandt J, Braun J, Burgos-Vargas R, et al. The Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) handbook: a guide to assess spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68 Suppl 2:ii1-44.  
doi:10.1136/ard.2008.104018.
- [4] Taylor W, Gladman D, Helliwell P, Marchesoni A, Mease P, Mielants H, et al. Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study. *Arthritis Rheum* 2006;54:2665–73. doi:10.1002/art.21972.
- [5] Fechtenbaum M. Étude du polymorphisme des gènes MICA chez les patients atteints de spondyloarthrites n.d.:52.
- [6] Mei Y, Pan F, Gao J, Ge R, Duan Z, Zeng Z, et al. Increased serum IL-17 and IL-23 in the patient with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol* 2011;30:269–73.  
doi:10.1007/s10067-010-1647-4.
- [7] Prajzlerová K, Grobelná K, Pavelka K, Šenolt L, Filková M. An update on biomarkers in axial spondyloarthritis. *Autoimmun Rev* 2016;15:501–9.  
doi:10.1016/j.autrev.2016.02.002.
- [8] Hermann E, Yu DT, Meyer zum Büschenfelde KH, Fleischer B. HLA-B27-restricted CD8 T cells derived from synovial fluids of patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Lancet* 1993;342:646–50.
- [9] Smith JA, Märker-Hermann E, Colbert RA. Pathogenesis of ankylosing spondylitis: current concepts. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006;20:571–91.  
doi:10.1016/j.berh.2006.03.001.
- [10] Bowness P, Ridley A, Shaw J, Chan AT, Wong-Baeza I, Fleming M, et al. Th17 cells expressing KIR3DL2+ and responsive to HLA-B27 homodimers are increased in ankylosing spondylitis. *J Immunol* 2011;186:2672–80. doi:10.4049/jimmunol.1002653.
- [11] Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009;361:888–98. doi:10.1056/NEJMra0707449.

- [12] Beringer A, Noack M, Miossec P. IL-17 in Chronic Inflammation: From Discovery to Targeting. *Trends Mol Med* 2016;22:230–41. doi:10.1016/j.molmed.2016.01.001.
- [13] Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev* 2014;13:668–77. doi:10.1016/j.autrev.2013.12.004.
- [14] Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov* 2012;11:763–76. doi:10.1038/nrd3794.
- [15] Romero-Sanchez C, Jaimes DA, Londoño J, De Avila J, Castellanos JE, Bello JM, et al. Association between Th-17 cytokine profile and clinical features in patients with spondyloarthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2011;29:828–34.
- [16] Menon B, Gullick NJ, Walter GJ, Rajasekhar M, Garrood T, Evans HG, et al. Interleukin-17+CD8+ T cells are enriched in the joints of patients with psoriatic arthritis and correlate with disease activity and joint damage progression. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ)* 2014;66:1272–81. doi:10.1002/art.38376.
- [17] Hreggvidsdottir HS, Noordenbos T, Baeten DL. Inflammatory pathways in spondyloarthritis. *Mol Immunol* 2014;57:28–37. doi:10.1016/j.molimm.2013.07.016.
- [18] Chen M, Zhang L, Ren Y, Zhang K, Yang Y, Fang Y, et al. Defective Function of CD24(+)CD38(+) Regulatory B Cells in Ankylosing Spondylitis. *DNA Cell Biol* 2016;35:88–95. doi:10.1089/dna.2015.3046.
- [19] Lin Q, Gu J, Li T, Zhang F, Lin Z, Liao Z, et al. Value of the peripheral blood B-cells subsets in patients with ankylosing spondylitis. *Chin Med J* 2009;122:1784–9.
- [20] Wendling D, Lukas C, Prati C, Claudepierre P, Gossec L, Goupille P, et al. 2018 update of French Society for Rheumatology (SFR) recommendations about the everyday management of patients with spondyloarthritis. *Joint Bone Spine* 2018;85:275–84. doi:10.1016/j.jbspin.2018.01.006.
- [21] Rudwaleit M, Listing J, Brandt J, Braun J, Sieper J. Prediction of a major clinical response (BASDAI 50) to tumour necrosis factor alpha blockers in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2004;63:665–70. doi:10.1136/ard.2003.016386.
- [22] Salomon S, Guignant C, Morel P, Flahaut G, Brault C, Gourguechon C, et al. Th17 and CD24hiCD27+ regulatory B lymphocytes are biomarkers of response to biologics in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2017;19:33. doi:10.1186/s13075-017-1244-x.
- [23] Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, Listing J, Akkoc N, Brandt J, et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification

- criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann Rheum Dis* 2009;68:777–83. doi:10.1136/ard.2009.108233.
- [24] Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, Akkoc N, Brandt J, Chou CT, et al. The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann Rheum Dis* 2011;70:25–31. doi:10.1136/ard.2010.133645.
- [25] van der Heijde D, Ramiro S, Landewé R, Baraliakos X, Van den Bosch F, Sepriano A, et al. 2016 update of the ASAS-EULAR management recommendations for axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 2017;76:978–91. doi:10.1136/annrheumdis-2016-210770.
- [26] Machado P, Landewé R, Lie E, Kvien TK, Braun J, Baker D, et al. Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS): defining cut-off values for disease activity states and improvement scores. *Ann Rheum Dis* 2011;70:47–53. doi:10.1136/ard.2010.138594.
- [27] Ponchel F, Burska AN, Hensor EMA, Raja R, Campbell M, Emery P, et al. Changes in peripheral blood immune cell composition in osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil* 2015;23:1870–8. doi:10.1016/j.joca.2015.06.018.
- [28] Ridley A, Hatano H, Wong-Baeza I, Shaw J, Matthews KK, Al-Mossawi H, et al. Activation-Induced Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor 3DL2 Binding to HLA-B27 Licenses Pathogenic T Cell Differentiation in Spondyloarthritis. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ)* 2016;68:901–14. doi:10.1002/art.39515.
- [29] Payeli SK, Kollnberger S, Marroquin Belaunzaran O, Thiel M, McHugh K, Giles J, et al. Inhibiting HLA-B27 homodimer-driven immune cell inflammation in spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 2012;64:3139–49. doi:10.1002/art.34538.
- [30] Liu W, Wu Y-H, Zhang L, Liu X-Y, Xue B, Wang Y, et al. Elevated serum levels of IL-6 and IL-17 may associate with the development of ankylosing spondylitis. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:17362–76.
- [31] Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* 2010;40:1830–5. doi:10.1002/eji.201040391.
- [32] Limón-Camacho L, Vargas-Rojas MI, Vázquez-Mellado J, Casasola-Vargas J, Moctezuma JF, Burgos-Vargas R, et al. In vivo peripheral blood proinflammatory T cells in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 2012;39:830–5. doi:10.3899/jrheum.110862.

- [33] Przepiera-Będzak H, Fischer K, Brzosko M. Serum IL-6 and IL-23 Levels and Their Correlation with Angiogenic Cytokines and Disease Activity in Ankylosing Spondylitis, Psoriatic Arthritis, and SAPHO Syndrome. *Mediators Inflamm* 2015;2015:785705. doi:10.1155/2015/785705.
- [34] Sieper J, Porter-Brown B, Thompson L, Harari O, Dougados M. Assessment of short-term symptomatic efficacy of tocilizumab in ankylosing spondylitis: results of randomised, placebo-controlled trials. *Ann Rheum Dis* 2014;73:95–100. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203559.
- [35] Lekpa FK, Poulain C, Wendling D, Soubrier M, De Bandt M, Berthelot JM, et al. Is IL-6 an appropriate target to treat spondyloarthritis patients refractory to anti-TNF therapy? A multicentre retrospective observational study. *Arthritis Res Ther* 2012;14:R53. doi:10.1186/ar3766.
- [36] Dougados M, d'Agostino M-A, Benessiano J, Berenbaum F, Breban M, Claudepierre P, et al. The DESIR cohort: a 10-year follow-up of early inflammatory back pain in France: study design and baseline characteristics of the 708 recruited patients. *Joint Bone Spine* 2011;78:598–603. doi:10.1016/j.jbspin.2011.01.013.
- [37] Costantino F, Talpin A, Said-Nahal R, Goldberg M, Henny J, Chiocchia G, et al. Prevalence of spondyloarthritis in reference to HLA-B27 in the French population: results of the GAZEL cohort. *Ann Rheum Dis* 2015;74:689–93. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204436.
- [38] Baraliakos X, Coates LC, Braun J. The involvement of the spine in psoriatic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2015;33:S31-35.
- [39] Sieper J, Lenaerts J, Wollenhaupt J, Rudwaleit M, Mazurov VI, Myasoutova L, et al. Efficacy and safety of infliximab plus naproxen versus naproxen alone in patients with early, active axial spondyloarthritis: results from the double-blind, placebo-controlled INFAST study, Part 1. *Ann Rheum Dis* 2014;73:101–7. doi:10.1136/annrheumdis-2012-203201.
- [40] Sieper J, Lenaerts J, Wollenhaupt J, Rudwaleit M, Mazurov VI, Myasoutova L, et al. Maintenance of biologic-free remission with naproxen or no treatment in patients with early, active axial spondyloarthritis: results from a 6-month, randomised, open-label follow-up study, INFAST Part 2. *Ann Rheum Dis* 2014;73:108–13. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203460.
- [41] Lie E, van der Heijde D, Uhlig T, Mikkelsen K, Rødevand E, Koldingsnes W, et al. Effectiveness of switching between TNF inhibitors in ankylosing spondylitis: data from



the NOR-DMARD register. *Ann Rheum Dis* 2011;70:157–63.

doi:10.1136/ard.2010.131797.

- [42] Fagerli KM, Lie E, van der Heijde D, Heiberg MS, Kalstad S, Rødevand E, et al. Switching between TNF inhibitors in psoriatic arthritis: data from the NOR-DMARD study. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1840–4. doi:10.1136/annrheumdis-2012-203018.
- [43] Micheroli R, Hebeisen M, Wildi LM, Exer P, Tamborrini G, Bernhard J, et al. Impact of obesity on the response to tumor necrosis factor inhibitors in axial spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther* 2017;19:164. doi:10.1186/s13075-017-1372-3.

Université Paris Diderot - Université Paris Descartes - Université Paris 13

---

**MEMOIRE**

**pour l'obtention du Diplôme de MASTER 2 RECHERCHE**

*Domaine "Sciences, Technologies, Santé"*

*Mention "Biologie Cellulaire, Physiologie et Pathologies (BCPP)"*

*Spécialité "Biominéralisation, Morphogenèse et Pathologies Inflammatoires (BMPI)"*

---

**Présenté et soutenu le 20 juin 2017**

**par**

**Thibault Rabin**

---

**Phase préliminaire du développement d'un protocole de recherche translationnelle pour la découverte de biomarqueur(s) de réponse aux biomédicaments dans les spondyloarthrites**

---

**JURY**

Mme BERDAL Ariane, PU-PH, Paris Diderot (*Responsable*)  
Mme COHEN-SOLAL Martine, PU-PH, Paris Diderot  
Mme BABAJKO Sylvie, DR2, INSERM  
Mme BUTOR Cécile, Professeur, Paris Diderot

Mme FALGARONE Géraldine, PU-PH, Paris 13  
Mme CHAUSSAIN Catherine, PU-PH, Paris Descartes  
Mr. EA Korgn, PU-PH, Paris Diderot  
Mr. RANNOU François, PU-PH, Paris Descartes

Mémoire réalisé sous la direction de A/Pr Frédérique Ponchel, Pr Vincent Goëb  
Laboratoire d'immunologie Lymphocyte normal et pathologique EA 4666  
Directeur du laboratoire : PrJean-Pierre Marolleau

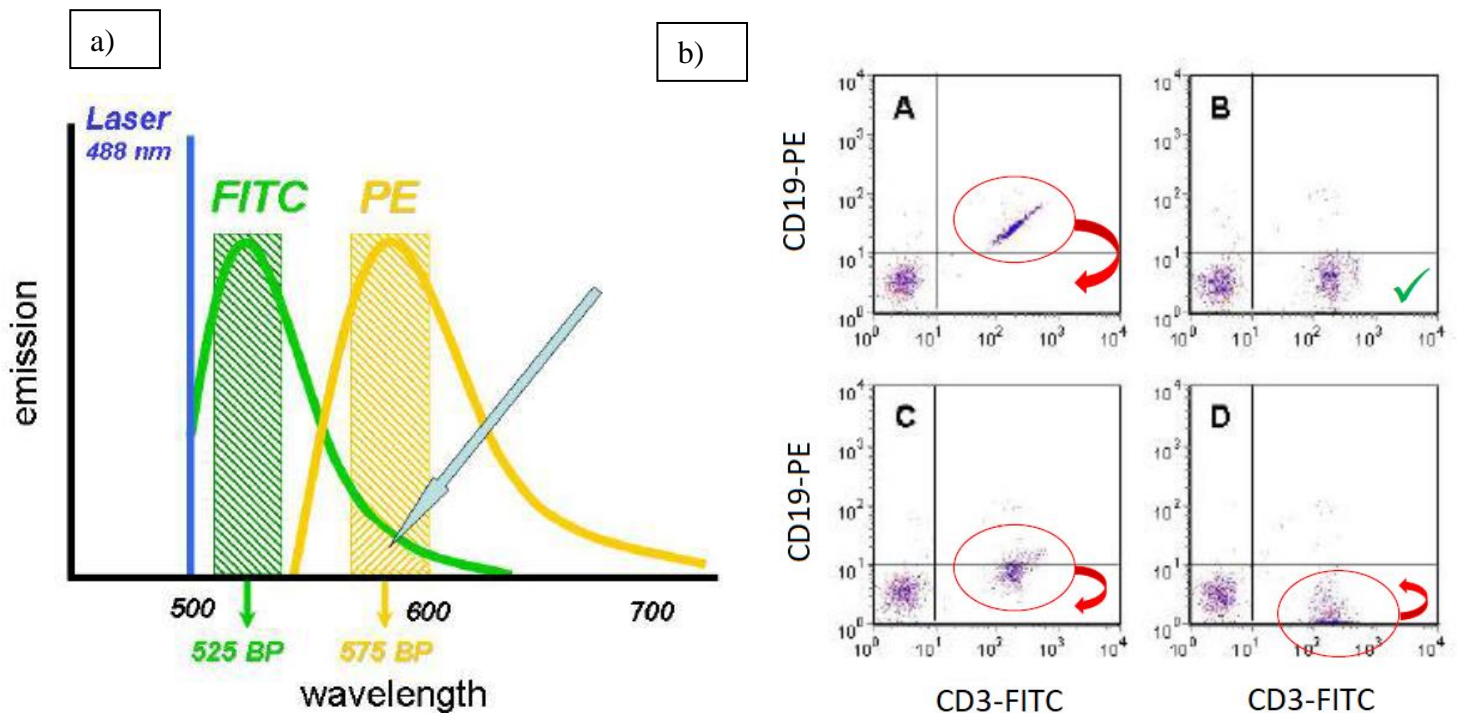
**Année universitaire 2016-2017**

### Annexe 1 : Etape de compensation

Pour effectuer cette compensation, il faut créer pour chaque panel des graphiques présentant les niveaux de fluorescence de 2 fluorochromes de spectres d'émission voisins. La compensation est réalisée grâce au logiciel informatique du cytomètre, par une correction électronique des « fuites ». Sur la **figure 4b**, le graphique non compensé (**A**) est caractérisé par une distribution « en diagonale » du nuage de point correspondant à un marquage unique pour une fluorescence FITC. Il s'agit du débordement de la fluorescence FITC dans le spectre d'émission de PE. La compensation n'est pas correcte tant que les nuages FITC+ et FITC- de point ne sont pas parfaitement alignés avec une fluorescence négative du PE dans un plot à deux dimensions. Après compensation, ce nuage de point s'aligne au nuage de points négatifs (**B**).

**Figure 4 : Compensation de la fluorescence FITC dans un exemple de profil a 2 marqueurs.**

- a) Schématisation du débordement du spectre d'émission de FITC dans PE et inversement.
- b) Représentations bi-paramétriques des signaux CD3-FITC/CD19-PE. Les nuages de points entourés en rouge sur la fenêtre (A) montrent une double positivité pour CD3/CD19 alors que seul l'anticorps CD3-FITC est présent. Ils doivent être compensés par manipulation électronique des données (B). Si le nuage FITC+ est légèrement au-dessus il est sous-compensé (C), si le nuage est « écrasé » sur la ligne des abscisses il est surcompensé (D).

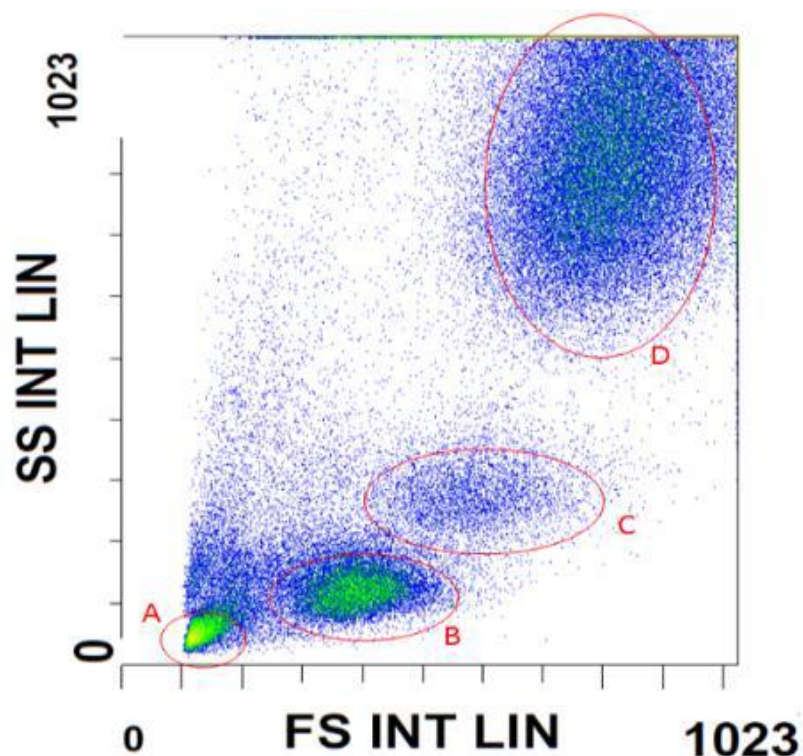


## Annexe 2 :

Lors du développement de chacun des 5 panels, la première étape est le réglage du voltage des détecteurs ce qui permettra de différencier les populations positives et négatives. Ceci est d'abord fait sur un témoin négatif (aucun anticorps). Le voltage est modifié afin que les nuages de points soient tous situés dans la région négative pour tous les marqueurs. Néanmoins, on commence par régler la fenêtre FSC/SSC afin de « trouver » les cellules dont la taille et la granularité sont celles des lymphocytes (différents de monocytes ou de granulocytes, **figure 3**) puis on procède de même sur tous les fluorochromes.

**Figure 3 :** diagramme a deux dimensions démontrant la taille (FSC) et granulométrie (SSC) des cellules du sang

- A : Hématies non lysées, débris, cellules mortes
- B : Lymphocytes
- C : Monocytes
- D : Granulocytes



### Annexe 3 :

#### 3.6 Validation technique des analyses

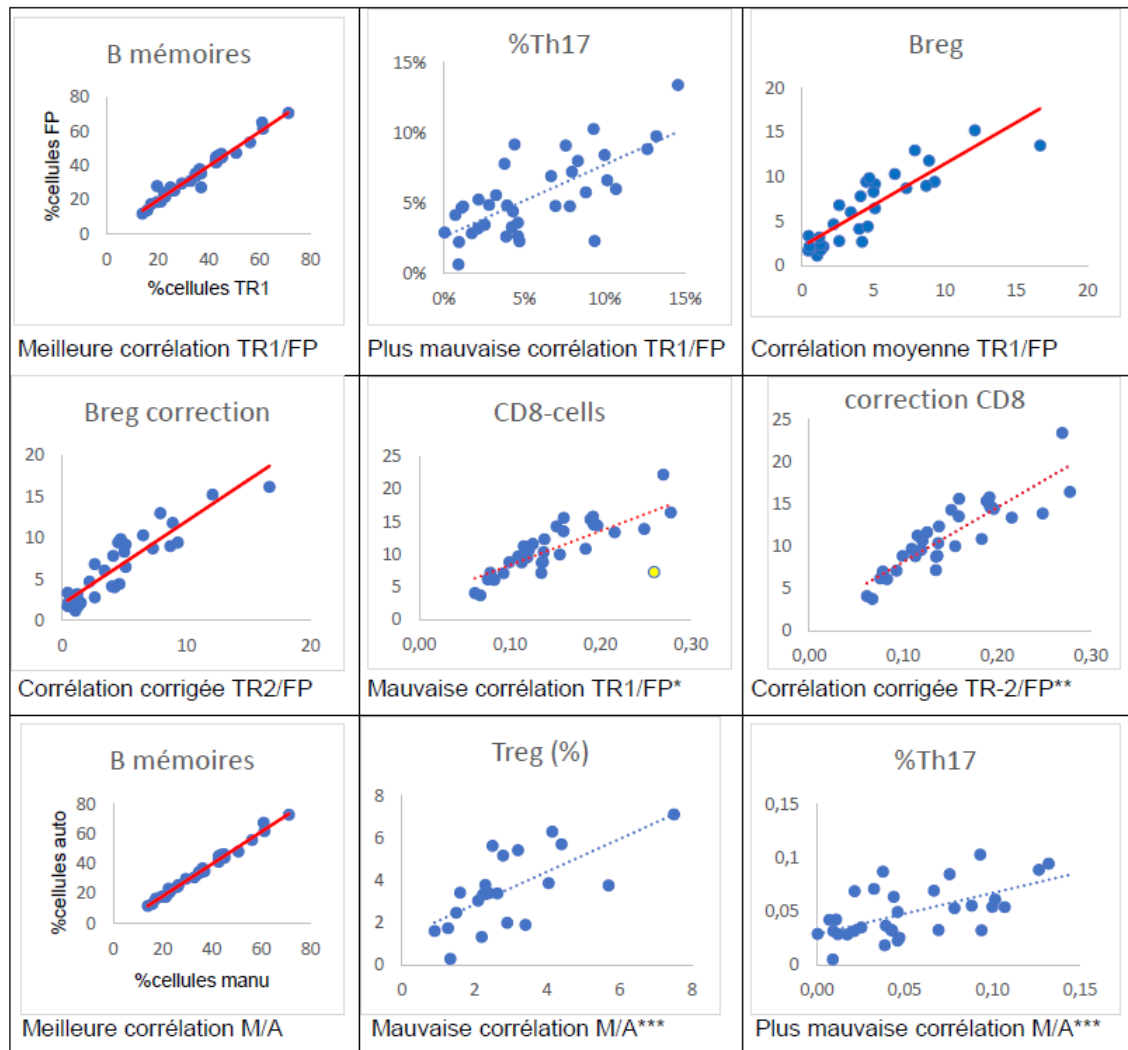
Les résultats des analyses de fréquences pour chaque sous-population ont été comparés pour chaque panel avec un observateur de référence, le Dr Ponchel (**tableau 6**).

	Sous populations	Ob-ref vs Ob-TR1		Ob-ref vs Ob-TR2		Manu vs Auto	
		rho	p	rho	Révision	rho	p
Lymphocytes	CD19+B	0,957	<0.0001	0,957	inchangé	0,948	<0.0001
	CD56+ NK	0,966	<0.0001	0,966	inchangé	0,964	<0.0001
	CD56+/CD3+NKT	0,827	<0.0001	0,833	amélioration	0,833	<0.0001
	CD4+T	0,946	<0.0001	0,941	inchangé	0,943	<0.0001
	CD8+T	0,799	<0.0001	0,807	amélioration	0,806	<0.0001
	Ratio CD4/CD8	0,874	<0.0001	0,875	inchangé	0,831	<0.0001
Treg	Treg	0,731	<0.0001	0,736	inchangé	0,718	<0.0002
LB	B-naïfs	0,951	<0.0001	0,968	amélioration	0,942	<0.0001
	B-mémoires	0,981	<0.0001			0,991	<0.0001
	B-reg	0,889	<0.0001	0,899	amélioration	0,641	0,001
LT CD4+	naïfs	0,931	<0.0001			0,841	0,001
	mémoires	0,854	<0.0001	0,895	amélioration	0,815	<0.0001
	IRC	0,786	<0.0001	0,808	amélioration	0,725	0,001
	IL6R naïfs	0,937	<0.0001			0,885	<0.0001
	IL6R mémoires	0,912	<0.0001			0,816	<0.0001
	IL6R IRC	0,899	<0.0001			0,876	<0.0001
LT CD8+	naïfs	0,985	<0.0001	0,987	inchangé	0,942	<0.0001
	mémoires	0,783	<0.0001	0,801	amélioration	0,784	<0.0001
	IRC	0,794	<0.0001	0,851	amélioration	0,720	0,001
	IL6R naïfs	0,951	<0.0001			0,950	<0.0001
	IL6R mémoires	0,835	<0.0001			0,839	<0.0001
	IL6R IRC	0,856	<0.0001			0,838	<0.0001
CD4+	Th17	0,630	0,001	0,655	amélioration	0,525	0,001
	KIR3DL2	0,867	<0.0001	0,882	amélioration	0,855	<0.0001

**Tableau 6** : comparaison des analyses de cytométrie. Ob-ref vs Ob-TR1 : première analyse avec observateur de référence. Ob-ref vs Ob-TR2 : après la première comparaison, une révision a été effectuée pour certains résultats les plus divergents. On obtient un nouveau résultat, parfois inchangé, parfois amélioré. Manu vs Auto : une comparaison entre analyse manuelle et automatique a été effectuée, pour connaître les panels les plus fiables

#### Annexe 4 :

Après correction de l'ensemble des données pour les 5 panels, on obtient de bonnes valeurs de Rho pour la plupart des sous-populations. Néanmoins les 95% de concordance entre observateurs ( $\rho > 0.950$ ) ne sont observés que pour 6 populations (LB, NK, B naïves et mémoires, LT CD8 naïfs et expression de l'IL-6R des CD8 naïfs). Des graphiques de concordance pour les populations les plus représentatives sont présentes dans la **figure 8**.



**Figure 8.** Exemples représentatifs de corrélations entre observateurs (FP/TR-1 et TR-2) et entre analyse manuelle et automatique (M/A).

\* Cette mauvaise corrélation est due à 1 point (jaune) correspondant à une analyse imparfaite. Après une nouvelle interprétation des résultats, la corrélation est meilleure.

\*\* Cette mauvaise corrélation est due à quelques points correspondant à une analyse faite sur une mauvaise compensation. Après correction on observe une meilleure corrélation.

\*\*\* La corrélation est moins bonne que l'analyse manuelle. L'analyse automatique n'a pas réussi à trouver les bonnes cellules Tregs ou Th17.

## Résumé

### *Prediction de réponse aux biomédicaments dans les spondyloarthrites, selon les sous-populations lymphocytaires initiales*

**Introduction :** La prise en charge actuelle des spondyloarthrites (SpA) fait de plus en plus appel aux biomédicaments qui sont inefficaces chez 30 à 40% des patients. Les sous-populations lymphocytaires (SPL) dans les SpA ont été très peu étudiées en vue d'une analyse pronostique même si certaines sont impliquées dans la pathologie. L'objectif de cette étude est de déterminer si les SPL, avant l'initiation d'un biomédicament, pouvaient être associées avec la réponse à celui-ci afin d'identifier de potentiels biomarqueurs prédictifs pouvant être utilisés en routine.

**Matériel et méthodes :** Soixante-huit patients atteints de SpA traités par un biomédicament ont été inclus, ainsi que 150 sujets contrôles indemnes de maladie inflammatoire chronique. Les paramètres cliniques couramment évalués au cours de la prise en charge des SpA (BASDAI, ASDAS) ont été colligés à l'initiation du traitement puis à 3 et 6 mois. La réponse clinique a été définie comme (1) le maintien du traitement ; (2) la diminution du BASDAI de 50% ou de 2 points ou (3) la diminution de l'ASDAS de 1.1 points. Différentes SPL (cellules T et B naïves, mémoires, régulatrices, Th17 et NK) ont été étudiées à l'inclusion en cytométrie en flux. Des tests de Mann-Whitney U, Chi<sup>2</sup> et des corrélations de Spearman ont été utilisés.

**Résultats :** Cinquante-trois patients étaient atteints de spondylarthrite ankylosante (SA) et 15 de rhumatisme psoriasique (RPso). Des fréquences significativement différentes de certaines SPL ont été retrouvées entre sujets atteints de SpA et sujets contrôles, notamment une hausse des cellules B ( $p < 0.0001$ ) et une baisse des CD8 mémoires ( $p < 0.0001$ ), en accord avec leur participation dans la pathologie. L'expression du récepteur de l'IL-6 (IL-6R) était plus forte sur ces mêmes SPL, confirmant un rôle potentiel de cette cytokine dans les SpA. Aucun paramètre clinique n'était associé avec la réponse au biomédicament. En revanche, une association avec une fréquence plus faible des cellules NK ( $p = 0.016$ ) était observée, plus particulièrement lorsqu'un anti-IL-17 était utilisé ( $p = 0.005$ ), mais pas pour les anti-TNF. Les fréquences d'autres SPL étaient aussi différentes en fonction de la réponse (tendances pour l'expression du KIR3DL2 sur les Th17, la balance des SPL CD8 naïves vs mémoires, l'expression de l'IL-6R sur les cellules B).

**Conclusion :** Ce travail a confirmé la dérégulation de certaines SPL dans les SPA. Il a aussi établi une association de plusieurs SPL avec la réponse clinique lorsqu'un anti-IL-17 était utilisé, mais pas un anti-TNF.

## Abstract

### *Prediction of response to biologics in spondyloarthritis, according to initial lymphocyte subsets*

**Introduction:** the current management of spondyloarthritis (SpA) increasingly requires biologics, which are inefficient in 30 to 40% of patients. Lymphocyte subsets (LS) in SpA have been poorly studied for prognostic, although some of these are clearly implicated in these pathologies. The objective of this study was to determine if LS, before the initiation of biologic therapy could be associated with clinical response to identify potential predictive biomarkers that could be used routinely.

**Methods:** Sixty-eight patients with SpA treated with a biologic were included, as well as 150 control subjects free from chronic inflammatory disease. The clinical features commonly assessed during the management of SpA (BASDAI, ASDAS) were recorded at baseline and then at 3 and 6 monthly. The clinical response was defined as (1) maintenance of treatment; (2) 50% reduction of BASDAI or by 2 points and (3) decrease of ASDAS by 1.1 points. Several LS (naive, memory, regulatory T and B cells, Th17 and NK cells) were studied at baseline by flow cytometry. Mann-Whitney U, Chi<sup>2</sup> tests and Spearman correlations were used.

**Results:** Fifty-three patients had ankylosing spondylitis (AS) and 15 had psoriatic arthritis (PsA). Significantly different frequencies of certain LS were found between SpA and healthy subjects, including B cells ( $p < 0.0001$ ) and memory CD8 ( $p < 0.0001$ ), consistent with their involvement in pathology. The IL-6 receptor (IL-6R) expression was stronger on these LS, confirming a potential role of this cytokine in SpA. No clinical feature was associated with biologic response. In contrast, an association with a lower frequency of NK cells ( $p = 0.016$ ) was observed in the whole group. This was even more pronounced when an IL-17 inhibitor was used ( $p = 0.005$ ), but no longer significant with a TNF inhibitor. Frequencies of other LS were also different depending on the type of biologic (trends for the expression of KIR3DL2 on Th17, balance of naive versus memory CD8 cells, expression of IL-6R on B cells).

**Conclusion:** This work confirmed the deregulation of certain LS in SpA. We also established an association between several LS and the clinical response when an IL-17 inhibitor was used, but not for a TNF inhibitor.

**Mots-clés :** Sous-populations lymphocytaires, spondyloarthrite, biomédicament, réponse.

**Key-words:** Lymphocyte subsets, spondyloarthritis, biologics, response.