



Étude de l'association entre les différentes atteintes cliniques et l'expression d'OX40 sur les lymphocytes T auxiliaires dans le lupus érythémateux systémique

Itsaso Odriozola

► To cite this version:

Itsaso Odriozola. Étude de l'association entre les différentes atteintes cliniques et l'expression d'OX40 sur les lymphocytes T auxiliaires dans le lupus érythémateux systémique. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-02945282

HAL Id: dumas-02945282

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02945282>

Submitted on 22 Sep 2020

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 Bordeaux
U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES**

Année 2020

N° 3048

Thèse pour l'obtention du DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement le mardi 30 Juin 2020
Par Itsaso ODRIOSOLA
Née le 08/08/1992 à Bayonne (64)

**Étude de l'association entre les différentes atteintes cliniques et
l'expression d'OX40 sur les lymphocytes T auxiliaires dans le lupus
érythémateux systémique**

Directeur de thèse

Professeur Christophe RICHEZ

Membres du jury

Professeur Thierry SCHAEVERBEKEPrésident
Professeur Pierre DUFFAURapporteur
Professeur Patrick BLANCO.....Juge
Docteur Marie-Elise TRUCHETET.....Juge
Professeur Christophe RICHEZ.....Directeur

[Tapez ici]

Remerciements

Table des matières

Remerciements	3
Liste des abréviations	6
1 CONTEXTE SCIENTIFIQUE	9
1.1 Le lupus érythémateux systémique	9
1.2 Physiopathologie	10
1.2.1 Susceptibilité génétique	10
1.2.2 Épigénétique	11
1.2.2.1 Hypométhylation de l'ADN dans le LES	11
1.2.2.2 Modification des histones.....	11
1.2.2.3 Les microARNs	12
1.2.3 Genre	12
1.2.4 Facteurs environnementaux.....	12
1.2.5 Activation du système immunitaire inné, rôle de l'interféron	13
1.2.6 Activation de l'immunité adaptative	14
1.2.6.1 Auto-anticorps	14
1.2.6.2 Lymphocytes B.....	14
1.2.6.3 Lymphocytes T _{FH}	15
1.2.6.4 Lymphocytes T _{PH}	15
1.2.6.5 Les lymphocytes T CD4+ Th17	16
1.2.6.6 Les lymphocytes T Régulateurs (LTregs) et les lymphocytes T folliculaires régulateurs (Tfreg).....	17
1.2.6.7 Interactions cellulaires.....	18
1.3 La voie OX40/OX40L.....	20
1.3.1 Rôles de la voie OX40/OX40L.....	20
1.3.2 OX40-OX40L dans le lupus.....	21
1.4 Justificatif de l'étude	22
1.5 Bibliographie.....	23
2 ARTICLE ORIGINAL	28
1. Introduction	30
2. Material and Methods.....	31
2.1. Patients selection	31

2.2. Cell phenotyping and Flow cytometry analyses	32
2.3. Statistical analysis	33
3. Results	33
3.1. Clinical Characteristics of Patients	33
3.2. OX40 expression is increased in all subpopulations of LT helpers.....	35
3.3. Disease activity correlates with OX40 expression on Tph but not on other LT helpers	36
3.4. Activated ICOS + Tph correlate with disease activity.	38
3.5. OX40+ Tph are highly correlated with renal impairment in SLE.....	40
4. Discussion	41
3 CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	47
Serment d'Hippocrate	48

Liste des abréviations

A

Ac : Anticorps

ACK : Ammonium-Chloride-Potassium

ADN : Acide Désoxyribonucléique

Ag : Antigènes

APC : Antigen-Presenting Cell

aPL : Antiphospholipid

ARN : Acide Ribonucléique

B

Bcl : B-cell lymphoma

BMI : Body mass index

C

C3 : Facteur du complément 3

C4: Facteur du complément 4

CCR : C-C chemokine receptor

CD : Cluster de Différenciation

CIA : Chemiluminescence Immunoassay

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CpG : Cytosine-phosphate-Guanine

CX3CR : CX3C chemokine Receptor

CXCL : CXC chemokine Ligand

CXC-R : C-X-C chemokine Receptor

D

DNase : Désoxyribonucléase

dsDNA : Double Stranded Deoxyribonucleic Acid

DP : Double Positive

E

EAE : Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

EBV : Epstein-Barr Virus

EDTA : Éthylène Diamine Tétracétique

F

FOXP3 : Forkhead box P3

G

GC : Germinal Center

GWAS : Genome Wide Association Studies

H

HC : Healthy Control

HLA : Human Leukocyte Antigen

I

ICOS : Inducible T-cell COStimulator

ICOS-L : Inducible T-cell COStimulator-Ligand

ICs : Immune complexes

IFN- α : Interféron Alpha

IgG : Immunoglobulines de type G

IL : Interleukine

L

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

LES : Lupus Erythémateux Systémique

LB: Lymphocytes B

LT : Lymphocytes T

LTFH : Lymphocyte T Follicular Helper

LTPH : Lymphocyte Peripheral T Helper

LTfreg : Lymphocyte T folliculaire régulateur

LTreg : Lymphocyte T Régulateur

M

MAF : Macrophage-Activating Factor

mARN : Micro Acide Ribonucléique

MHC : Major Histocompatibility Complex

mRNA : Micro Ribonucleic Acid

N

NK : Natural Killer

P

PD : Programmed cell Death

pDCs : Plasmacytoid Dendritic Cells

PD-L : Programmed Death-Ligand

PR : Polyarthrite Rhumatoïde

R

RA : Rheumatoid Arthritis

RNA : Ribonucleic Acid

RNP : Ribonucleoprotein

S

SD : Standard Deviation

SHM : Somatic Hypermutation

SLE : Systemic Lupus Erythematosus

SLEDAI 2k : Systemic Lupus Erythematosus
Disease Activity Index 2000

SLICC : Systemic Lupus International
Collaborating Clinics

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SPENCD : Spondylenchondrodysplasie

T

TGF- β : Transforming Growth Factor Beta

TLRs : Toll Like Receptors

TNF : Tumor Necrosis Factor

TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor

TNFSF4 : Tumor Necrosis Factor

Superfamily member 4

U

UMR : Unités Mixtes de Recherche

UV : Ultraviolet

1 CONTEXTE SCIENTIFIQUE

1.1 Le lupus érythémateux systémique

Le lupus érythémateux systémique (LES) est le prototype des maladies auto-immunes systémiques, caractérisé par une présentation très hétérogène, tant sur le plan clinique, avec des atteintes allant d'une atteinte cutanée ou articulaire isolée à des atteintes d'organes compromettant le pronostic fonctionnel et vital (atteinte rénale (28%), cardiorespiratoire ou neurologique), que sur le plan sérologique (1–4).

Il s'agit d'une maladie rare de la femme jeune (9 femmes pour 1 homme) avec une prévalence et une incidence qui varient en fonction des séries, des pays et de l'ethnie. En 2010, la prévalence en France a été estimée à 47/100000 habitants toutes ethnies confondues (5). Une étude réalisée chez des femmes de 15-64 ans, au sud de Londres, montre que cette prévalence est beaucoup plus élevée chez les Afro-Caribéens (177 /100 000 habitants) que chez caucasiens (35/100000 habitants) (6).

La mortalité a nettement diminué ces dernières décennies avec le développement des thérapeutiques. Parmi elles l'hydroxychloroquine, qui a des effets bénéfiques sur de nombreuses atteintes de la maladie et prévient les poussées (7–10). Cet antipaludique de synthèse a un effet immunomodulateur sans effet immunosuppresseur et constitue maintenant une pierre angulaire dans la prise en charge de tous les patients atteints de LES. La découverte de l'intérêt des corticoïdes dans les maladies auto-immunes par Hench et al. (Prix Nobel de médecine en 1950) et le développement d'immunosuppresseurs non spécifiques (Methotrexate, Azathioprine, Mycophenolate Mofetil, la cyclophosphamide etc.) ont aussi considérablement amélioré le pronostic de la maladie. La survie à 5 ans qui était inférieure à 50% en 1955 est aujourd'hui autour de 95% (11). Les décès liés à l'activité du lupus et les infections ont régulièrement diminué mais sont toujours une cause de mortalité importante dans les pays en voie de développement. Cependant, la mortalité cardiovasculaire n'a pas décliné et représente la première cause de mortalité dans les pays développés avec

un risque de décès 2 à 10 fois plus élevé chez les patients avec un LES, par rapport aux personnes saines de même âge et de même sexe (12). Cette atteinte cardiovasculaire est plurifactorielle. Elle est due à la maladie elle-même, au syndrome des antiphospholipides associé mais aussi aux traitements et notamment les corticoïdes (12).

Il est important de comprendre la physiopathologie du lupus pour permettre le développement de thérapeutiques plus spécifiques que les corticoïdes et limiter les effets secondaires. Actuellement, une seule thérapie ciblée est disponible, le Belimumab (13). L'idée de proposer à chaque patient, à chaque forme de maladie, le traitement adapté est encore utopique. Pour cela, il faut élucider les différents mécanismes impliqués dans la maladie et développer des biomarqueurs qui permettront de classer les patients en groupes qui répondront à tel ou tel médicament.

1.2 Physiopathologie

La pathogenèse du LES est un processus multi-étape. Il existe une longue période de prédisposition à l'auto-immunité conférée par la susceptibilité génétique, le genre et l'exposition environnementale. Puis, chez une faible proportion de ceux qui sont prédisposés, l'apparition d'anticorps (Ac) précède généralement les symptômes cliniques de plusieurs années (14).

1.2.1 Susceptibilité génétique

Suivant les séries, entre 10 et 15% des patients atteints d'un LES ont au moins un autre membre de leur famille atteint d'une forme de lupus.

Des maladies monogéniques de transmission mendélienne telles que les déficits homozygotes en facteurs du complément, le syndrome d'Aicardi-Goutières, la spondylenchondrodysplasie (SPENCD), et une mutation du gène codant pour la DNase1L3, ont été associées au développement d'un LES. Cela est un argument en faveur d'une part génétique de la maladie (15).

Or, ces maladies monogéniques sont exceptionnelles. Le lupus semble plutôt être soutenu par le polymorphisme associé d'une combinaison de gènes. En effet, de nombreuses études de Genome Wide Association Studies (GWAS) ont permis la détection de plus de cent marqueurs polymorphiques de type single nucleotide polymorphism (SNP), associés à un risque de développer un LES (16).

Mais, 40% des jumeaux homozygotes ne développent pas la maladie. Le fond génétique est donc une condition nécessaire mais non suffisante pour l'apparition du lupus (17).

1.2.2 Épigénétique

L'épigénétique regroupe l'ensemble des mécanismes de régulation des gènes qui, en contrôlant l'accessibilité de la chromatine aux facteurs de régulation de la transcription, permet d'ajuster l'expression des gènes sans modifier la séquence d'ADN sous-jacente. Ces mécanismes sont responsables de variations significatives entre les cellules et les tissus d'un organisme, indépendamment du génotype identique entre toutes les cellules.

Il s'agit de :

1.2.2.1 Hypométhylation de l'ADN dans le LES

La méthylation se produit en position 5' des résidus de cytosine situés dans les îlots CpG répartis de manière non-homogène dans le génome (18). Une étude comparant des jumeaux monozygotes dont l'un était malade et l'autre sain a révélé 49 régions hypométhylées de l'ADN chez les patients atteints de LES (19).

1.2.2.2 Modification des histones

Le nucléosome est un complexe comportant un segment d'ADN d'environ 146 paires de nucléotides enroulé autour d'un octamère d'histones. Chez les eucaryotes, il constitue l'unité de base d'organisation de la chromatine. La portion N-terminale des histones fait saillie à l'extérieur de l'octamère. Elle est sujette à des modifications post-traductionnelles qui

modifient l'interaction entre les histones et l'ADN. La réplication, la transcription, la réparation de l'ADN, la condensation de la chromatine sont alors modifiées. Plusieurs modifications d'histones ont été associées au lupus (20).

1.2.2.3 Les microARNs

Il s'agit de petits ARN endogènes non codants qui régulent négativement l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel. Ils sont impliqués dans de multiples processus physiologiques et pathologiques, y compris dans la régulation du système immunitaire (21). Le rôle des mARN est de plus en plus étudié. Des anomalies ont été rapportées dans de nombreuses maladies auto-immunes dont le LES (22).

Ces événements sont dynamiques, pas seulement héréditaires mais aussi influencés par l'environnement. Par exemple, la diminution de la méthylation de l'ADN des patients LES dépend de facteurs environnementaux (UVs, infections virales, etc.), de facteurs individuels (predisposition génétique, âge et activité enzymatique associée, etc.) et de médicaments (23).

1.2.3 Genre

La prédominance de la survenue de la maladie chez les femmes en âge de procréer fait suspecter un rôle important des facteurs hormonaux. Cela est appuyé par la mise en évidence de l'augmentation significative du risque relatif lors de l'utilisation des contraceptifs hormonaux (24). Les chromosomes X jouent aussi un rôle propre dans l'augmentation du risque, avec un effet dose, puisque la prévalence est augmentée chez les sujets femmes avec trisomie X (47,XXX) (25) et les sujets hommes avec syndrome de Klinefelter (47, X,X,Y)(26).

1.2.4 Facteurs environnementaux

Les médicaments, les UVs et les infections comme l'infection à EBV ne modifient pas seulement l'expression des gènes mais activent aussi l'immunité innée en augmentant les

radicaux libres, les corps apoptotiques. L'EBV pourrait par ailleurs initier la réponse immune par une réaction croisée entre un antigène viral et un antigène du soi (épitope partagé) (27).

1.2.5 Activation du système immunitaire inné, rôle de l'interféron

L'élimination anormale des débris apoptotiques dans le LES semble être la source d'autoantigènes et déclenche l'activation du système immunitaire inné. Une apoptose anormale ou excessive expose des composants nucléaires du soi (ADN et ARN) et induit l'activation des cellules dendritiques. Via des molécules de co-stimulation, ces cellules activent les lymphocytes B autoréactifs (28) qui produisent des Ac dirigés contre ces antigènes (Ag) du soi. Ces auto-Ac s'associent aux Ag du soi contre lesquels ils sont dirigés pour former des complexes immuns (ICs). Puis les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) les internalisent et sont activées via les récepteurs intracellulaires Toll Like Receptors (TLRs) 7 et 9 (29). Les pDCs activées expriment des molécules de costimulation à leur surface. Ainsi, elles augmentent leur capacité de présentation d'Ag et produisent beaucoup d'interféron- α (IFN- α) (30,31)

Le rôle important de l'IFN de type I dans la physiopathologie du lupus est maintenant établi.

En effet, des taux sériques élevés d'IFN- α sont rapportés chez les patients atteints de LES et ces niveaux sont corrélés à la fois avec l'activité et la gravité de la maladie (32,33).

Par ailleurs, des maladies génétiques déjà citées et associées à des lupus monogéniques dont la SPENCD et le syndrome d'Aicardi-Goutières ont une surexpression de l'IFN- α (15). Le taux élevé de l'interféron dans le LCR est caractéristique de cette maladie qui associe les manifestations auto-immunes à une fièvre avec encéphalopathie inflammatoire et calcifications des noyaux gris centraux. Cette surexpression d'IFN de type 1 a fait récemment regrouper ces maladies sous le nom d'interferonopathies.

Il a aussi été décrit l'apparition d'Ac antinucléaires et Ac anti-ADN double brin et plus rarement des lupus, chez les patients traités par interféron pour un carcinome (34).

Enfin, des études de transcriptomique ont permis d'identifier de nombreux gènes régulés positivement par l'IFN- α dans les cellules mononuclées du sang des patients LES (35). La

surexpression de ces gènes est appelée « signature interféron » . Il s'agit d'un marqueur indirect important de l'effet de l'IFN dans le LES.

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont considérées comme la principale source de production non contrôlée d'IFN de type 1 dans le LES. Blanco et al. ont montré en 2001 que sous l'effet de cet IFN en excès, les cellules dendritiques myéloïdes immatures, acteurs majeurs de la tolérance périphérique, acquièrent de façon anormale des fonctions de cellules dendritiques activées et matures (36). Elles présentent des auto-antigènes aux LT et LB qui deviennent auto-réactifs et produisent des auto-Ac. Ces derniers, en formant des ICs, activent à leur tour les pDCs. Cela constitue une boucle d'auto-activation pour produire encore plus d'auto-Ac (37).

1.2.6 Activation de l'immunité adaptative

1.2.6.1 Auto-anticorps

La présence de ces auto-anticorps, secondaires à un défaut de tolérance au soi et dirigés contre les composants nucléaires des cellules est une caractéristique presque constante chez les patients qui ont lupus. Ils précèdent le développement de signes cliniques (38). Leur rôle pathologique direct dans certaines manifestations comme l'Ac anti-SSA dans la survenue du bloc-auriculoventriculaire congénital (39), leur confère une place importante dans la pathogénèse de cette maladie.

1.2.6.2 Lymphocytes B

Un grand nombre d'auto-Ac différents ont été décrits dans le lupus et des nouveaux sont régulièrement découverts (4). Les auto-anticorps caractéristiques et spécifiques du LES sont d'isotype IgG et ont une haute affinité pour l'ADN natif. Ils sont produits par des LB qui comportent des mutations somatiques, signatures indirectes d'une activation lymphocytaire B sous influence d'un Ag et de lymphocytes T au niveau des centres germinatifs (GC) (40).

1.2.6.3 Lymphocytes T_{FH}

Cette hypermutation somatique (SHM) des LB au sein des GC est promue par les lymphocytes T helper folliculaires (T_{FH}). Il s'agit d'un sous-groupe de LT effecteurs CD4+ qui expriment CXCR5^{hi} PD1^{hi} Bcl6^{hi} Maf^{hi} SAP^{hi}, via l'IL-21 et le CD40L (41).

CXCR5 est un récepteur de chémokines qui permet la migration des T_{FH} vers les GC.

Le PD-1, protéine de mort cellulaire programmée 1, délivre un signal inhibiteur après l'activation par son ligand (PD-L1 ou PD-L2). Cela permet de réguler de façon négative la réponse T_{FH} (42).

Les T_{FH} expriment aussi à leur surface le costimulateur inductible des cellules T (ICOS) et OX40, régulateurs positifs, qui seront développés plus loin.

Dans les modèles murins, la formation aberrante de T_{FH} conduit à la dysrégulation de la réponse des GC, la sélection positive d'auto-anticorps pathogènes de haute affinité et le développement d'un lupus-like (43). Inversement, l'inhibition de leur formation, empêche le développement de la maladie, suggérant leur importance dans la physiopathologie (44).

Chez les patients avec un LES, la fréquence des cellules T_{FH} actifs dans le sang est augmentée par rapport aux sujets sains. Leur quantité est corrélée à la sévérité de la maladie (45). Leur présence dans les centres germinaux ectopiques des reins de patients atteints de néphropathie lupique a été rapportée (46).

1.2.6.4 Lymphocytes T_{PH}

Dans les néphrites lupiques, outre la présence de GC ectopiques, des agrégats de cellules T-B produisant localement des Ac ont été observés, ce qui suggère une production extrafolliculaire d'auto-anticorps (47).

Récemment, un nouveau sous-groupe de cellules Th CD4 + appelées cellules T auxiliaires périphériques (T_{PH}) a été décrit. Ces cellules promeuvent la réponse des LB et la production d'Ac dans la polyarthrite rhumatoïde (PR). Elles ont un phénotype semblable aux cellules T_{FH}. Elles expriment notamment des taux élevés de PD-1 et produisent les protéines CXCL13 et IL-21. Cependant, les cellules T_{PH} n'expriment pas le CXCR5 qui est exprimé par les T_{FH} et est essentiel pour l'entrée dans les centres germinaux des organes lymphoïdes. Au lieu de cela, ils expriment CCR2, CX3CR1 et CCR5 qui leur donne la capacité de migrer vers des sites inflammatoires (48).

Plusieurs groupes ont rapporté l'augmentation du nombre de cellules T_{PH} dans le sang périphérique des patients LES. Dans ces travaux, la fréquence et leur statut activé étaient corrélés avec l'activité de la maladie et la fréquence des plasmablastes et des cellules B mémoires commutées activées (49,50). Les T_{PH} activent les LB via IL-21 et MAF (51).

1.2.6.5 Les lymphocytes T CD4+ Th17

Les cellules T CD4 + subissent une différenciation fonctionnelle après l'amorçage de l'antigène. Elle leur confère un phénotype distinct en termes de régulation de la transcription et de production de cytokines. Parmi les LT CD4+ effecteurs, les LT CD4+ peuvent se différencier en lymphocytes Th1, Th2 ou Th17, en plus des T_{FH}, T_{PH} déjà cités.

Les cellules T auxiliaires de type 17 (Th17) sont des cellules T CD4 + qui expriment les facteurs de transcription ROR γ t et ROR α . Elles produisent les cytokines IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22 (52). Elles induisent des réponses inflammatoires intenses en sécrétant de l'IL-17 (cytokine pro-inflammatoire) et on les retrouve dans les infiltrats inflammatoires des organes cibles dans le lupus (53). Les patients atteints de LES et les souris prédisposées au lupus présentent un nombre accru de cellules T productrices d'IL-17 et des taux sériques élevés d'IL-17. Il a été démontré que l'IL-17 participe à la formation des GC dans les modèles murins et qu'elle stimule la production d'anticorps par les LB (54).

1.2.6.6 Les lymphocytes T Régulateurs (LTregs) et les lymphocytes T folliculaires régulateurs (Tfreg)

En plus des LT CD4⁺ effecteurs, les LT CD4⁺ peuvent se différencier en LT régulateurs, essentiels pour le maintien de l'homéostasie et la tolérance au soi.

Ils sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription FOXP3, indispensable pour le maintien de leur phénotype et leur fonction suppresseur (55).

Dans les modèles murins de LES, l'effet protecteur des Tregs a été supporté par des expériences de transferts adoptifs chez des souris sujettes au lupus. Le transfert de Treg chez ces souris retardait la progression de la maladie, diminuait l'atteinte rénale et augmentait la survie (56). A l'inverse, la diminution du nombre de Tregs après injection de l'Ac déplétant anti-CD25, accélérail le développement des manifestations lupiques chez les souris prédisposées (57).

Chez l'humain, les données sont moins directes et plus contradictoires. Certains groupes retrouvent un nombre de Treg diminué chez les patients LES, d'autres un nombre augmenté et certains ne trouvent pas de différence entre le groupe de patients sains et les LES (58). Cette discordance peut provenir de différences dans l'utilisation de marqueurs phénotypiques sélectionnés pour l'identification des Tregs, puisque plusieurs sous populations avec des fonctions différentes ont été rapportées (59).

Parmi elles, les lymphocytes T régulateurs folliculaires (Tfreg) expriment FOXP3 et Bcl-6 et ont une expression élevée de CXCR5, ICOS et PD-1 (60). Ils migrent vers les follicules des cellules B et inhibent la production d'anticorps au sein des GC. Une dysfonction pourrait donc participer à la pathogénèse du lupus où les CG sont très actifs.

L'échec des Tregs à contrôler l'activation exagérée des LT et LB dans le lupus ne semble pas lié à un défaut quantitatif. Il serait plutôt lié à un des facteurs extrinsèques comme leur interaction avec les autres cellules immunitaires du milieu inflammatoire. Certains LT effecteurs peuvent de cette façon, acquérir des capacités de résistance à l'action des LTregs (59).

1.2.6.7 Interactions cellulaires

Ainsi, tous ces acteurs de l'immunité sont connectés entre eux directement via des récepteurs-ligands et indirectement via des molécules solubles (cytokines et chémokines). La sur-expression ou la sous-expression de chacune de ces molécules de signalisation dans un environnement donné peut précipiter une cascade de signaux pro-inflammatoires.

Par exemple, les cellules Th17 pro-inflammatoires et les LTreg pro-toléroènes sont interconnectés et dépendent de l'environnement des cytokines. L'équilibre Th17/Treg dont les voies de développement sont régulées réciproquement, joue un rôle clé dans les maladies auto-immunes et inflammatoires. Les Treg nécessitent le FOXP3 et le TGF- β pour leur différenciation. Mais, l'ajout de l'IL-6 au TGF- β favorise la différenciation en Th17 en inhibant FOXP3 et en régulant positivement ROR α (61). L'IL-2 nécessaire pour le maintien des cellules Treg inhibe la différenciation Th17.

De la même façon, l'interaction lymphocyte B-lymphocyte T est primordiale pour la réponse immunitaire à une agression. Et dans les centres germinatifs, la prolifération des cellules B auto-réactives et la génération d'auto-anticorps IgG est dépendante des cellules T. Les voies de co-stimulation permettant l'activation des lymphocytes T ont donc un rôle important dans la pathogénèse.

Deux de ces voies sont les paires de récepteur-ligand B7 / CD28 et CD40 / CD40L.

L'engagement de CD28 à la surface des lymphocytes T par B7.1 (CD80) ou B7.2 (CD86) à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA) ou des cellules B active les voies de signalisation qui favorisent la survie des cellules T et induisent l'expression par les lymphocytes T de CD40L (CD154) (62).

Le CD40L interagit à son tour avec le CD40 sur les CPA, entraînant une nouvelle régulation positive du MHC et du B7 et la libération de cytokines et d'autres médiateurs inflammatoires. L'interaction de CD40L sur les cellules T activées avec CD40 sur les cellules B spécifiques de

l'antigène induit également la prolifération des cellules B et la formation de centres germinatifs (63).

Un autre costimulateur important est le costimulateur inductible des cellules T (ICOS). Après l'activation médiée par l'antigène, ICOS-L est exprimé par les Tfh. Il délivre des signaux d'activation aux cellules T CD4 + lorsqu'elles interagissent avec les CPA exprimant ICOS-L. La signalisation ICOS est essentielle pour la différenciation des cellules Tfh, leur migration et leur survie. Le déficit d'expression d'ICOS a pour conséquence une absence complète de Tfh matures et de GC (64).

D'autres voies de co-stimulation redondantes ou non sont impliquées dans la pathogénèse du lupus, rendant son étude complexe et reflétant l'hétérogénéité des tableaux cliniques de la maladie. Une telle hétérogénéité explique pourquoi une thérapie polyvalente est généralement nécessaire pour contrôler la maladie. Elle est aussi probablement la raison de l'échec de plusieurs nouvelles approches thérapeutiques dans les essais cliniques. Cela rend nécessaire l'exploration de nouvelles voies pathogènes et de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'équipe de recherche dirigée par le Pr Blanco dans le laboratoire ImmunoConcept (CNRS UMR 5164) s'est intéressée au rôle de la voie de co-stimulation OX40/OX40L dans la physiopathologie du LES.

1.3 La voie OX40/OX40L

1.3.1 Rôles de la voie OX40/OX40L

L'axe OX40 (CD134)-OX40L (CD252) appartient à la superfamille des TNF-TNFR avec une fonction de costimulation.

L'OX40 n'est pas exprimé de façon constitutive par les cellules mais son expression peut être induite sur les LT activés. Il délivre un signal de costimulation nécessaire à la prolifération, à l'expansion clonale et à la survie des LT effecteurs. Plusieurs équipes ont montré que l'OX40 ne contrôle pas l'activation ou la prolifération initiale. Il fournit des signaux qui maintiennent une prolifération tardive et prolongent la survie des lymphocytes T pendant la phase effectrice. En effet, l'OX40 a pour cibles des molécules régulant la progression du cycle cellulaire et des molécules supprimant l'apoptose (65).

Il est aussi exprimé par les cellules NK, les neutrophiles et les LTRegs. Un fonctionnement correct de cet axe est nécessaire à l'homéostasie et la fonction de ces lymphocytes régulateurs (66).

L'expression d'OX40L est induite après stimulation antigénique sur les CPA professionnelles tels que les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages. Il est aussi exprimé par les LT. Cela augmente les interactions LT-LT et contribue à la survie des LT CD4 + (67).

Enfin, l'OX40L, en se liant aux LT CD4+, induit une expansion clonale des LT CD4+ et la production de cytokines. Ceci permet la différenciation de LT CD4+ mémoires, mais aussi leur ré-activation après une nouvelle rencontre avec l'antigène spécifique (68). Il permet aussi la génération et le maintien des LT CD8+ mémoires.

Il s'agit donc d'un axe important dans la défense anti-infectieuse. Il a été démontré en infectant des souris que l'OX40 exprimé par les T_{FH} permet d'agir contre les Ag viraux. Les souris qui n'expriment pas OX40 ont un défaut d'activation des lymphocytes B au niveau des GC, un défaut de génération des plasmocytes et de production d'Ac spécifiques. L'interaction OX40-OX40L permet le maintien d'un nombre élevé de cellules T_{fh} et l'interaction avec les

cellules B des GC après stimulation initiale. La même équipe a montré que OX40 est coexprimé avec ICOS sur les cellules T_{FH} dont l'activation par ICOS-L est aussi nécessaire pour la survie et la prolifération des cellules Tfh et des cellules B des GC. Ainsi, OX40 et ICOS agissent de manière coopérative et non redondante pour augmenter et prolonger la réponse Tfh générée après une infection virale aiguë (69).

Par ailleurs, cet axe pourrait jouer un rôle important dans la défense anti-tumorale. Des séries de cas montrent que l'expression d'OX40 peuvent être augmentée au niveau de Tregs infiltrant les tumeurs, faisant de cet axe une cible thérapeutique (70).

1.3.2 OX40-OX40L dans le lupus

A l'inverse, une stimulation aberrante de cette voie a été décrite dans de nombreuses maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaques, la maladie de Crohn et la polyarthrite rhumatoïde (PR) (71).

Des études de GWAS ont retrouvé un lien entre des polymorphismes du gène codant pour TNFSF4 (OX40L) sur le chromosome 1 et le LES (72). Une méta-analyse comprenant plusieurs populations d'ethnies différentes a confirmé ce lien et a mis en évidence une association plus spécifique de ces polymorphismes avec le LES qu'avec les autres maladies auto-immunes (73).

Un autre argument en faveur de l'importance de l'axe OX40 dans le rôle pathologique des T_{FH} dans le lupus est le développement d'un lupus-like chez les souris qui ont un défaut de régulation de cette molécule de costimulation. Les souris déficientes en Roquin-1 et Roquin-2, homologues qui régulent l'expression d'OX40 de façon post-transcriptionnelle, développent un syndrome lupique médié par des cellules Tfh et une réponse des GC excessive (74).

L'équipe du Pr Blanco s'est donc intéressée aux mécanismes impliquant l'axe OX40-OX40L dans la physiopathologie du lupus et comment cet axe joue le rôle d'amplificateur de génération d'auto-anticorps.

Récemment, ils ont montré, en stimulant des monocytes sains par des sérums de LES, que les complexes immuns associant des anticorps anti-RNP avec leur antigène permettent l'expression d'OX40L à la surface des monocytes (CPA myéloïdies) via le TLR-7 endosomal.

OX40L est ainsi surexprimé par les CPA myéloïdes CD11c + HLA - DR + dont la fréquence est positivement corrélée à l'activité de la maladie dans le sang et dans les tissus enflammés des patients atteints de LES (75).

Dans ce milieu riche en OX40L, le signal OX40 promeut la différenciation des lymphocytes T CD4 + naïfs en LT_{FH} dont la fréquence est corrélée au nombre de monocytes OX40L+ (75). Enfin, comme évoqué plus haut, ces LT_{FH} à leur tour, favorisent la production d'auto-Ac par les LB dans les GC. Ces autoAc, via la formation de complexes immuns, activent de nouveau TLR7. Il s'agit donc d'une boucle d'amplification. Une fois activée, elle permet l'auto-entretien de la réponse auto-immune et la surproduction d'auto-Ac.

Dernièrement, la même équipe a démontré que l'engagement de l'axe OX40L / OX40 altère la capacité des Treg et Tfr à réguler la prolifération des T effecteurs. En entraînant une régulation négative de FOXP3, la voie OX40/OX40L altère aussi leur capacité à supprimer l'activation des cellules B dépendantes des T_{FH} et la sécrétion d'immunoglobulines (76).

1.4 Justificatif de l'étude

L'activation aberrante de la voie OX40 entretient la réponse immune contre les antigènes du soi et participe à la physiopathologie du lupus.

Il a déjà été démontré par l'équipe du Pr Blanco que ce signal de costimulation OX40-OX40L favorise la différenciation des LT en LT_{FH} dans les GC. L'effet d'OX40 sur les Tph très récemment décrits dans le lupus n'a pas encore été étudié.

L'objectif de l'étude était d'analyser l'expression d'OX40 sur les lymphocytes T et leurs différents sous-types, notamment les T_{PH} et T_{FH}, des patients atteints de lupus, en fonction de l'activité de la maladie et des différentes atteintes cliniques, afin de déterminer si elle peut être un biomarqueur voire une cible thérapeutique.

1.5 Bibliographie

1. Smith PP, Gordon C. Systemic lupus erythematosus: Clinical presentations. *Autoimmun Rev.* 2010 Nov;10(1):43–5.
2. Campbell EJ, Clarke AE, Ramsey-Goldman R. Systemic lupus erythematosus: a case-based presentation of renal, neurologic, and hematologic emergencies. *Expert Rev Clin Immunol.* 2018 Oct 3;14(10):803–16.
3. Cervera R, Khamashta M, Hughes G. The Euro-lupus project: epidemiology of systemic lupus erythematosus in Europe. Cervera R, Tincani A, editors. *Lupus.* 2009 Sep;18(10):869–74.
4. Yaniv G, Twig G, Shor DB-A, Furer A, Sherer Y, Mozes O, et al. A volcanic explosion of autoantibodies in systemic lupus erythematosus: A diversity of 180 different antibodies found in SLE patients. *Autoimmun Rev.* 2015 Jan;14(1):75–9.
5. Arnaud L, Fagot J-P, Mathian A, Paita M, Fagot-Campagna A, Amoura Z. Prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in France: A 2010 nation-wide population-based study. *Autoimmun Rev.* 2014 Nov;13(11):1082–9.
6. Molokhia M, McKeigue PM, Cuadrado M, Hughes G. Systemic lupus erythematosus in migrants from west Africa compared with Afro-Caribbean people in the UK. *The Lancet.* 2001 May;357(9266):1414–5.
7. A Randomized Study of the Effect of Withdrawing Hydroxychloroquine Sulfate in Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med.* 1991 Jan 17;324(3):150–4.
8. Alarcon GS, McGwin G, Bertoli AM, Fessler BJ, Calvo-Alen J, Bastian HM, et al. Effect of hydroxychloroquine on the survival of patients with systemic lupus erythematosus: data from LUMINA, a multiethnic US cohort (LUMINA L). *Ann Rheum Dis.* 2007 Mar 15;66(9):1168–72.
9. Clowse MEB, Magder L, Witter F, Petri M. Hydroxychloroquine in lupus pregnancy. *Arthritis Rheum.* 2006 Nov;54(11):3640–7.
10. Williams HJ, Egger MJ, Singer JZ, Willkens RF, Kalunian KC, Clegg DO, et al. Comparison of hydroxychloroquine and placebo in the treatment of the arthropathy of mild systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1994 Aug;21(8):1457–62.
11. Trager J, Ward MM. Mortality and causes of death in systemic lupus erythematosus: *Curr Opin Rheumatol.* 2001 Sep;13(5):345–51.
12. Gustafsson JT, Svenungsson E. Definitions of and contributions to cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity.* 2014 Mar;47(2):67–76.
13. Navarra SV, Guzmán RM, Gallacher AE, Hall S, Levy RA, Jimenez RE, et al. Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet.* 2011 Feb;377(9767):721–31.
14. Swaak T, Smeenk R. Detection of anti-dsDNA as a diagnostic tool: a prospective study in 441 non-systemic lupus erythematosus patients with anti-dsDNA antibody (anti-dsDNA). *Ann Rheum Dis.* 1985 Apr 1;44(4):245–51.
15. Bader-Meunier B, Jeremiah N, Rieux-Laucat F. Le lupus systémique à début pédiatrique : une pathologie polygénique ou monogénique ? *Rev Médecine Interne.* 2013 Apr;34(4):230–3.
16. Moser KL, Kelly JA, Lessard CJ, Harley JB. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* 2009 Jul;10(5):373–9.
17. Deng Y, Tsao BP. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol.* 2010 Dec;6(12):683–92.
18. Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer.* 2007 Jan;1775(1):138–62.

19. Javierre BM, Fernandez AF, Richter J, Al-Shahrour F, Martin-Subero JI, Rodriguez-Ubreva J, et al. Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. *Genome Res.* 2010 Feb 1;20(2):170–9.
20. Farivar S, Dept. of Molecular and Cell Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University G.C. Tehran, Iran, Shaabanpour Aghamaleki F, Dept. of Molecular and Cell Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University G.C. Tehran, Iran. Effects of Major Epigenetic Factors on Systemic Lupus Erythematosus. *Iran Biomed J.* 2018 Sep 1;22(5):294–302.
21. Bartel DP. MicroRNAs. *Cell.* 2004 Jan;116(2):281–97.
22. Ceribelli A, Yao B, Dominguez-Gutierrez PR, Nahid MA, Satoh M, Chan EK. MicroRNAs in systemic rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(4):229.
23. Surace AEA, Hedrich CM. The Role of Epigenetics in Autoimmune/Inflammatory Disease. *Front Immunol* [Internet]. 2019 Jul 4 [cited 2019 Oct 17];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.01525/full>
24. Williams WV. Hormonal Contraception and the Development of Autoimmunity: A Review of the Literature. *Linacre Q.* 2017 Aug;84(3):275–95.
25. Liu K, Kurien BT, Zimmerman SL, Kaufman KM, Taft DH, Kottyan LC, et al. X Chromosome Dose and Sex Bias in Autoimmune Diseases: Increased 47,XXX in Systemic Lupus Erythematosus and Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2015 Dec;n/a-n/a.
26. Dillon S, Aggarwal R, Harding JW, Li L-J, Weissman MH, Li S, et al. Klinefelter's syndrome (47,XXY) among men with systemic lupus erythematosus: Klinefelter's syndrome (47,XXY) among men. *Acta Paediatr.* 2011 Jun;100(6):819–23.
27. McClain MT, Heinlen LD, Dennis GJ, Roebuck J, Harley JB, James JA. Early events in lupus humoral autoimmunity suggest initiation through molecular mimicry. *Nat Med.* 2005 Jan;11(1):85–9.
28. Munoz LE, Gaipal US, Franz S, Sheriff A, Voll RE, Kalden JR, et al. SLE—a disease of clearance deficiency? *Rheumatology.* 2005 Sep 1;44(9):1101–7.
29. Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, Chan JH, Uematsu S, Akira S, et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 2005 Oct 17;202(8):1131–9.
30. Rönnblom L, Pascual V. The innate immune system in SLE: type I interferons and dendritic cells. *Lupus.* 2008 May;17(5):394–9.
31. Lövgren T, Eloranta M-L, Båve U, Alm GV, Rönnblom L. Induction of interferon- α production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus IgG: Immune Complexes with Endogenous Nucleic Acid as IFN α Inducers. *Arthritis Rheum.* 2004 Jun;50(6):1861–72.
32. Bengtsson AA, Sturfelt G, Truedsson L, Blomberg J, Alm G, Vallin H, et al. Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies. *Lupus.* 2000 Nov;9(9):664–71.
33. Mathian A, Mouries-Martin S, Dorgham K, Devilliers H, Yssel H, Garrido Castillo L, et al. Ultrasensitive serum interferon- α quantification during SLE remission identifies patients at risk for relapse. *Ann Rheum Dis.* 2019 Dec;78(12):1669–76.
34. Rönnblom LE, Alm GV, Öberg KE. Possible induction of systemic lupus erythematosus by interferon- α treatment in a patient with a malignant carcinoid tumour. *J Intern Med.* 1990 Mar;227(3):207–10.
35. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci.* 2003 Mar 4;100(5):2610–5.
36. Blanco P. Induction of Dendritic Cell Differentiation by IFN- α in Systemic Lupus Erythematosus. *Science.* 2001 Nov 16;294(5546):1540–3.

37. Banchereau J, Pascual V. Type I Interferon in Systemic Lupus Erythematosus and Other Autoimmune Diseases. *Immunity*. 2006 Sep;25(3):383–92.
38. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med*. 2003 Oct 16;349(16):1526–33.
39. Morel N, Georgin-Lavialle S, Levesque K, Guettrot-Imbert G, Le Guern V, Le Bidois J, et al. [Neonatal lupus syndrome: Literature review]. *Rev Med Interne*. 2015 Mar;36(3):159–66.
40. Cappione A, Anolik JH, Pugh-Bernard A, Barnard J, Dutcher P, Silverman G, et al. Germinal center exclusion of autoreactive B cells is defective in human systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 2005 Nov 1;115(11):3205–16.
41. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*. 2014 Oct 16;41(4):529–42.
42. Good-Jacobson KL, Szumilas CG, Chen L, Sharpe AH, Tomayko MM, Shlomchik MJ. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol*. 2010 Jun;11(6):535–42.
43. Vinuesa CG, Cook MC, Angelucci C, Athanasopoulos V, Rui L, Hill KM, et al. A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature*. 2005 May;435(7041):452–8.
44. Linterman MA, Rigby RJ, Wong RK, Yu D, Brink R, Cannons JL, et al. Follicular helper T cells are required for systemic autoimmunity. *J Exp Med*. 2009 Mar 16;206(3):561–76.
45. Simpson N, Gatenby PA, Wilson A, Malik S, Fulcher DA, Tangye SG, et al. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2010 Jan;62(1):234–44.
46. Liarski VM, Kaverina N, Chang A, Brandt D, Yanez D, Talasnik L, et al. Cell Distance Mapping Identifies Functional T Follicular Helper Cells in Inflamed Human Renal Tissue. *Sci Transl Med*. 2014 Apr 2;6(230):230ra46–230ra46.
47. Chang A, Henderson SG, Brandt D, Liu N, Guttikonda R, Hsieh C, et al. In Situ B Cell-Mediated Immune Responses and Tubulointerstitial Inflammation in Human Lupus Nephritis. *J Immunol*. 2011 Feb 1;186(3):1849–60.
48. Rao DA, Gurish MF, Marshall JL, Slowikowski K, Fonseka CY, Liu Y, et al. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature*. 2017 Feb;542(7639):110–4.
49. Makiyama A, Chiba A, Noto D, Murayama G, Yamaji K, Tamura N, et al. Expanded circulating peripheral helper T cells in systemic lupus erythematosus: association with disease activity and B cell differentiation. *Rheumatology* [Internet]. 2019 Mar 15 [cited 2019 Nov 16]; Available from: <https://academic.oup.com/rheumatology/advance-article/doi/10.1093/rheumatology/kez077/5382093>
50. Lin J, Yu Y, Ma J, Ren C, Chen W. PD-1+CXCR5–CD4+T cells are correlated with the severity of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* [Internet]. 2019 Jun 10 [cited 2019 Nov 16]; Available from: <https://academic.oup.com/rheumatology/advance-article/doi/10.1093/rheumatology/kez228/5513262>
51. Bocharnikov AV, Keegan J, Wacleche VS, Cao Y, Fonseka CY, Wang G, et al. PD-1hiCXCR5– T peripheral helper cells promote B cell responses in lupus via MAF and IL-21. *JCI Insight* [Internet]. 2019 Oct 17 [cited 2019 Nov 16];4(20). Available from: <https://insight.jci.org/articles/view/130062>
52. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:485–517.
53. Zhang Z, Kyttaris VC, Tsokos GC. The Role of IL-23/IL-17 Axis in Lupus Nephritis. *J Immunol*. 2009 Sep 1;183(5):3160–9.
54. Robert M, Miossec P. Interleukin-17 and lupus: enough to be a target? For which patients? *Lupus*. 2019 Dec 2;096120331989124.

55. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Pillars Article: Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* 2003. 299: 1057-1061. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2017 01;198(3):981–5.
56. Scalapino KJ, Tang Q, Bluestone JA, Bonyhadi ML, Daikh DI. Suppression of Disease in New Zealand Black/New Zealand White Lupus-Prone Mice by Adoptive Transfer of Ex Vivo Expanded Regulatory T Cells. *J Immunol*. 2006 Aug 1;177(3):1451–9.
57. Humrich JY, Morbach H, Undeutsch R, Enghard P, Rosenberger S, Weigert O, et al. Homeostatic imbalance of regulatory and effector T cells due to IL-2 deprivation amplifies murine lupus. *Proc Natl Acad Sci*. 2010 Jan 5;107(1):204–9.
58. Giang S, La Cava A. Regulatory T Cells in SLE: Biology and Use in Treatment. *Curr Rheumatol Rep* [Internet]. 2016 Nov [cited 2019 Dec 8];18(11). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11926-016-0616-6>
59. La Cava A. Tregs in SLE: an Update. *Curr Rheumatol Rep* [Internet]. 2018 Feb [cited 2019 Oct 14];20(2). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11926-018-0714-8>
60. Linterman MA, Pierson W, Lee SK, Kallies A, Kawamoto S, Rayner TF, et al. Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med*. 2011 Aug;17(8):975–82.
61. Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev*. 2014 Jun;13(6):668–77.
62. Mihara M, Tan I, Chuzhin Y, Reddy B, Budhai L, Holzer A, et al. CTLA4Ig inhibits T cell–dependent B-cell maturation in murine systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 2000 Jul 1;106(1):91–101.
63. Lederman S, Cleary AM, Yellin MJ, Frank DM, Karpusas M, Thomas DW, et al. The central role of the CD40-ligand and CD40 pathway in T-lymphocyte-mediated differentiation of B lymphocytes: *Curr Opin Hematol*. 1996;3(1):77–86.
64. Bossaller L, Burger J, Draeger R, Grimbacher B, Knoth R, Plebani A, et al. ICOS Deficiency Is Associated with a Severe Reduction of CXCR5⁺ CD4 Germinal Center Th Cells. *J Immunol*. 2006 Oct 1;177(7):4927–32.
65. Croft M, So T, Duan W, Soroosh P. The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunol Rev*. 2009 May;229(1):173–91.
66. Takeda I, Ine S, Killeen N, Ndhlovu LC, Murata K, Satomi S, et al. Distinct Roles for the OX40-OX40 Ligand Interaction in Regulatory and Nonregulatory T Cells. *J Immunol*. 2004 Mar 15;172(6):3580–9.
67. Soroosh P, Ine S, Sugamura K, Ishii N. OX40-OX40 Ligand Interaction through T Cell-T Cell Contact Contributes to CD4 T Cell Longevity. *J Immunol*. 2006 May 15;176(10):5975–87.
68. Gramaglia I, Jember A, Pippig SD, Weinberg AD, Killeen N, Croft M. The OX40 Costimulatory Receptor Determines the Development of CD4 Memory by Regulating Primary Clonal Expansion. *J Immunol*. 2000 Sep 15;165(6):3043–50.
69. Tahiliani V, Hutchinson TE, Abboud G, Croft M, Salek-Ardakani S. OX40 Cooperates with ICOS To Amplify Follicular Th Cell Development and Germinal Center Reactions during Infection. *J Immunol*. 2017 Jan 1;198(1):218–28.
70. Montler R, Bell RB, Thalhofer C, Leidner R, Feng Z, Fox BA, et al. OX40, PD-1 and CTLA-4 are selectively expressed on tumor-infiltrating T cells in head and neck cancer. *Clin Transl Immunol*. 2016 Apr 15;5(4):e70.
71. Croft M. Control of Immunity by the TNFR-Related Molecule OX40 (CD134). *Annu Rev Immunol*. 2010 Mar;28(1):57–78.
72. Graham DSC, Graham RR, Manku H, Wong AK, Whittaker JC, Gaffney PM, et al. Polymorphism at the TNF superfamily gene TNFSF4 confers susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2008 Jan;40(1):83–9.
73. Lee YH, Song GG. Associations between TNFSF4 and TRAF1-C5 gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus: A meta-analysis. *Hum Immunol*. 2012 Oct;73(10):1050–4.
74. Vogel KU, Edelmann SL, Jeltsch KM, Bertossi A, Heger K, Heinz GA, et al. Roquin Paralogs 1 and 2 Redundantly Repress the Icos and Ox40 Costimulator mRNAs and Control Follicular Helper T Cell Differentiation. *Immunity*. 2013 Apr;38(4):655–68.

75. Jacquemin C, Schmitt N, Contin-Bordes C, Liu Y, Narayanan P, Seneschal J, et al. OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity*. 2015 Jun;42(6):1159–70.
76. Jacquemin C, Augusto J-F, Scherlinger M, Gensous N, Forcade E, Douchet I, et al. OX40L/OX40 axis impairs follicular and natural Treg function in human SLE [Internet]. 2018 [cited 2019 Jul 15]. Available from: <https://insight.jci.org/articles/view/122167/pdf>

2 ARTICLE ORIGINAL

OX40⁺ Tph (CXCR5⁻, ICOS⁺, PD-1^{hi}): a novel biomarker of disease activity and renal involvement in lupus?

Itsaso Odriozola^a, Angela Pappalardo^b, Andrea Boizard-Moracchini^b, Thomas Barnetche^a, Pierre Duffau^{b,c,f}, Estibalitz Lazaro^{b,d,f}, Marie-Elise Truchetet^{a,b,f}, Thierry Schaefferbeke^{a,b,f}, Christophe Richez^{a,b,f,*}, Patrick Blanco^{b,e,f}.

^a Service de rhumatologie, FHU ACRONIM, Hôpital Pellegrin, Centre Hospitalier Universitaire, Place Amélie Raba Léon 33076 Bordeaux, France

^b CNRS-UMR 5164, ImmunoConcept, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux

^c Service de médecine interne, FHU ACRONIM, Hôpital Saint André, Centre Hospitalier Universitaire, Rue Jean Burguet 33076 Bordeaux, France

^d Service de médecine interne, FHU ACRONIM, Hôpital du Haut-Lévêque, Centre Hospitalier Universitaire, avenue Magellan, 33604 Pessac 33076

^e Laboratoire d'immunologie, Hôpital Pellegrin, Centre Hospitalier Universitaire, Place Amélie Raba Léon 33076 Bordeaux, France

^f Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux

* Corresponding author at : Service de rhumatologie, FHU ACRONIM, Hôpital Pellegrin, Centre Hospitalier Universitaire, Place Amélie Raba Léon 33076 Bordeaux, France. E-mail : christophe.richez@chu-bordeaux.fr (C. RICHEZ)

ABSTRACT

OX40⁺ Tph (CXCR5⁻, ICOS⁺, PD-1^{hi}): a novel biomarker of disease activity and renal involvement in lupus?

Introduction. Systemic lupus erythematosus is an autoimmune disease that is heterogeneous in presentation and complex in pathophysiology. The OX40/OX40L co-stimulation axis has been described as potentially implicated in pathogenesis by participating in a loop of amplification of autoantibody production through T follicular helpers (CXCR5⁺, ICOS⁺, PD-1⁺) - stimulated B cells. Recently a new subpopulation of T helpers, the T peripheral helpers (Tph) (CXCR5⁻, ICOS⁺, PD-1^{hi}), has been described. However, their role in the physiopathology of SLE and how OX40/OX40L axis is involved in their function, is still unknown.

Objective. To study the expression of OX40 by the different sub-populations of helper T lymphocytes and to look for an association between OX40 expression on these T cells and a particular clinical profile of the disease.

Methods. Blood samples from 61 SLE patients followed in Bordeaux University hospital and 38 controls were studied. The fraction of each subtype of T cells (LTh1, LTh2, LTh17, LTfh and LTph) as well as the percentage of each subtype expressing OX40 were determined by flow cytometry. These data were cross-referenced with clinical data using STATA© 13.1 software.

Results. The expression of OX40 by each T cell helper subtype was greater in SLE patients compared to the control subjects. However, only the percentage of OX40⁺ Tph was correlated with disease activity markers namely the SLEDAI (positive correlation between OX40⁺Tph% and SLEDAI; $r=0.33$; $p=0.008$), anti-dsDNA antibody levels ($r=0.38$; $p=0.003$), C3 (negative correlation between OX40⁺Tph% and C3; $r=-0.49$; $p=0.0002$) and C4 levels ($r=-0.41$; $p=0.017$). Activated ICOS⁺ Tph correlated with activity markers but not ICOS⁺ Tfh. Finally, the percentage of OX40⁺ Tph was associated with active renal impairment (mean $\pm$ SD of percentage of circulating OX40⁺ Tph in patients with nephritis $33.1\% \pm 17.1\%$ vs $20.8\% \pm 15.1\%$ in patients without nephritis; $p=0.007$) and positively correlated with proteinuria ($r=0.31$; $p=0.017$).

Conclusion. SLE patients have an increased percentage of OX40⁺ Tph compared to healthy subjects and this number is associated with clinical and biological activity markers as well as renal impairment.

1. Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic, multiorgan, autoimmune disease that is heterogeneous in its clinical presentation, its biological features and varies in severity from patient to patient and over time (1). This heterogeneity makes its diagnosis and treatment difficult and explains the failure of the majority of targeted therapies clinical trials developed to date. Even if the corticosteroids have improved the prognosis by their broad immunosuppressive effect, they have serious consequences (2,3) on a patient population mainly made up of young women (4).

It is therefore essential to understand the molecular and cellular basis of the immune response underlying this disease to facilitate a more precise diagnosis, predict its evolution and allow the development of targeted therapies.

The presence of autoantibodies directed against nuclear autoantigens is a constant characteristic of SLE (> 95%). They are present before the onset of clinical manifestations and are the marker of a breach in self-tolerance (5). The interaction of self-reactive T cells and B cells amplifies this autoimmune response. The understanding of co-stimulation mechanisms is therefore essential.

There is a growing interest in the pathological role of the OX40 co-stimulatory receptor belonging to the super family of tumor necrosis factor receptor (TNFR) and its related ligand, OX40L, in lupus. Indeed, Genome Wide Association Studies (GWAS) have highlighted a link between TNFSF4 polymorphisms coding for OX40 and the development of lupus (6). This link was confirmed by multi-population meta-analyzes which also suggested a relative specificity for SLE rather than other autoimmune conditions (7).

Physiologically, the engagement of the OX40 axis expressed on activated CD4⁺ T cells and OX40L on multiple antigen-presenting cells (dendritic cells, but also neutrophils, B cells, macrophages) allows expansion of effector T cells and extends their survival, promote and sustains CD4⁺T cell memory and generation of memory CD8⁺ T cells. It also modulates the differentiation and activity of regulatory T cells (8).

The aberrant activation of OX40-OX40L pathway in experimental conditions can cause lupus-like disease, as in Sanroque mice. These mice, no longer express Roquin 1 and 2 proteins which are post-transcriptional regulators degrading OX40's mRNA. The resulting increase of OX40 is

associated with the onset of lupus by promoting T Follicular Helper (Tfh) differentiation on CD4⁺ (9). In human, Jacquemin et al also showed that the OX40-OX40L axis promotes aberrant T Follicular Helper Response (10). The latter are characterized by the expression, on their surface, of ICOS (inducible T-cell costimulator) which delivers activation signal (11), CXCR5 which guides their migration into B-cell follicles and high expression of PD-1 (programmed cell death protein 1) which delivers inhibitory signal (12). They represent one of the main subclasses of T-helper involved in the production of autoantibodies. Indeed, Tfh cells induce class switching and affinity maturation of B cells through the production of IL-21 in the germinal centers (GCs) (13). They are also essential for the generation of memory B cells and long-lived plasma-cells in lupus. Several groups have reported an increase in activated Tfh cells (CXCR5⁺, ICOS⁺, PD-1^{hi}) in SLE patients and their frequency correlate with disease activity (14).

There is increasing evidence that autoreactive T cell-B cell interactions in SLE also occur outside of GC such as in the renal interstitium of patients with nephritis (15). In 2017, a new population of LT helpers, the T peripheral helpers (Tph), with distinct phenotype from germinal center Tfh, allowing T cell-B cell interactions within peripheral inflamed sites, was described in rheumatoid arthritis (RA) (16). Their increase in peripheral blood of SLE patients and the correlation of their frequency and disease activity (17,18) have been reported recently. They share several features with Tfh including high expression of PD-1, ICOS and production of IL-21 to promote B cell responses but, they lack CXCR5, and, instead, express chemokine receptors such as CCR2 and CCR5 that promote migration to sites of peripheral inflammation (16).

The aim of our study was to carry out a phenotyping of OX40 on the different subpopulations of T lymphocytes and to seek a correlation between the expression of OX40 and the clinical data on a cohort of SLE patients in order to assess OX40 as a potential biomarker of disease activity and to look for a possible association between OX40 overexpression and a particular clinical profile of the disease.

2. Material and Methods

2.1. Patients selection

61 consecutive SLE patients followed in Bordeaux University Hospital were prospectively included. Blood samples of 38 healthy controls (HC) were recovered from the French Blood

Establishment. All patients fulfilled the 2019 Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) classification criteria for SLE (19). Each patient received an information note about the protocol and signed a written informed consent. The MICROLUPS protocol was approved by the ethics committee according to the Declaration of Helsinki and registered on ClinicalTrials.gov (NCT03575156). Patient's samples were collected prospectively as well as their clinical characteristics. Their demographic characteristics (age, gender, BMI, tobacco consumption), disease duration and activity (SLEDAI, complement level, anti-dsDNA antibody level), organ involvement, and current therapy were also collected. Anti-dsDNA antibodies were measured out by using the chemiluminescence immunoassay (CIA) BIO-FLASH® (Inova Diagnostics) and considered as positive when there was > 35 UI/mL. Patients were considered positive for antiphospholipid antibodies (aPL+) if they had a 12 weeks-persistent anticardiolipin antibody and/or anti- β 2GPI and/or lupus anticoagulant.

2.2. Cell phenotyping and Flow cytometry analyses

Blood samples from patients and controls were collected by State Nurses, by venipuncture, in tubes containing EDTA (BD Vacutainer®). 300 μ l of whole blood were incubated with the following antibody cocktail : mouse anti-human CD3-VioGreen, mouse anti-human ICOS-PE Vio 770 (both from Miltenyi Biotec), mouse anti-human CD4-Pacific Blue, mouse anti-human CD45RA-FITC (both from Beckman Coulter), rat-anti-human CXCR5-BV711 (BD biosciences), mouse anti-human OX40-APC Cy7 and anti-PD1-BV786 (both from Biolegends). Cells were incubated for 15 minutes at room temperature and protected from light. Following this period, red blood cells were lysed by treatment with Ammonium-Chloride-Potassium (ACK) lysing buffer for 15 minutes in the dark and at room temperature.

Cells were centrifuged at 1800 round per minute for 5 minutes, and a second lysis with ACK buffer was performed for 10 minutes. Cells were washed by centrifugation at 1800 round per minute for 5 minutes and resuspended in PBS for flow cytometry acquisition.

Events were acquired using the BD LSR Fortessa cytometer (BD Biosciences) and analysis was performed using the FlowLogic software (Miltenyi Biotec).

2.3. Statistical analysis

Quantitative variables are presented as mean with standard deviation and qualitative variables are presented as percentage. The Mann-Whitney test was used to perform univariate analysis of quantitative variables between the two groups of patients. The Chi-square test, or Fisher exact test if needed, was used to perform comparison of qualitative variables. Correlation between quantitative variables were performed with the non-parametric Spearman correlation test. A p-value < 0.05 was considered statistically significant. Data were analyzed using STATA© 13.1 software.

3. Results

3.1. Clinical Characteristics of Patients

The characteristics of SLE patients are shown in Table 1. 57/61 (93.4%) patients were female in SLE group and 15/35 (39.4 %) in healthy group. The age was comparable for both groups with a mean age of 40.3 ± 14.6 years for lupus and 38.4 ± 11.8 years for the control group. Median disease duration was 10.9 ± 9.6 years. Active disease was considered if Systemic Lupus Erythematosus Activity Index 2000 (SLEDAI-2k) was equal to or above 6, which accounted for 34 patients (55.7 %). 51 of the 61 patients (83.6%) had positive anti-dsDNA antibodies in their disease history and 39 of them (66.1%) had detectable dsDNA antibody level the day of assessment. Anti-RNP were positive for 22 patients (36%) and phospholipid antibodies (aPL+) for 12 patients (20.3%). The patients were taking an average of 7.1 ± 11.8 mg/day of equivalent prednisone and 78.6% had hydroxychloroquine.

SLE (n=61)	
General	
- Age (mean $\pm$ SD)	40.3 $\pm$ 14.6
- Female (n, %)	57/61 (93.4%)
- Disease duration (mean $\pm$ SD)	10.9 $\pm$ 9.6
Lupus manifestations in disease history	
- Skin (n, %)	45/61 (73.7%)
- Joint/arthritis (n, %)	53/61 (86.9%)
- Hematological involvement (n, %)	27/61 (44.2%)
-Thrombocytopenia (<100G/l)	16/61 (26.6%)
-Lymphopenia (<1000/mm ³)	27/61 (44.2%)
-Evans syndrome	1/61 (1.6%)
- Nephritis (n, %)	25/61 (40.9%)
• Class III or IV	18/60 (30%)
• Class V	7/61 (11.4%)
- Serositis	13/61 (21.3%)
- Neurological	11/61 (18%)
- APS (n, %)	8/61 (13.1%)
Serological characteristics	
- Anti-dsDNA (n, %)	51/61 (83.6%)
- Anti-SSA (n, %)	39/61 (62.3%)
- Anti-SSB (n, %)	12/61 (19.6%)
- Anti-Smith (n, %)	20/61 (32.7%)
- Anti-RNP (n, %)	22/61 (36 %)
- aPL (n, %)	12/59 (20.3%)
• LA	12/59 (20.3%)
• Anti-cardiolipin	7/59 (11.8%)
• Anti- β 2GPI	4/59 (6.7%)
Clinical and biological active manifestations	
- SLEDAI $\geq$ 6	34/61 (55.7%)
- C3 level < 0,8 g/l (n, %)	28/55 (50.9%)
- C4 level <0,15 g/l (n, %)	31/55 (56.3%)
- Anti-dsDNA (n, %)	39/59 (66.1%)
- Skin (n, %)	23/61 (37.7%)
- Joint/arthritis (n, %)	24/61 (39.3%)
- Nephritis (n, %)	16/61 (26.2%)
- Thrombocytopenia (<100G/l)	1/60 (1.7%)
- Lymphopenia (<1000/mm ³)	22/60 (36.6%)
Treatment	
- Steroid dose (mg) (mean $\pm$ SD)	7.1 $\pm$ 11.8
- Hydroxychloroquine (n, %)	48/61 (78.6%)
- Azathioprine (n, %)	4/61 (6.5%)
- Mycophenolate Mofetil (n, %)	8/61 (13.1%)
- Rituximab (n, %)	16/61 (26.2%)
- Belimumab (n, %)	7/61 (11.4%)
- Cyclophosphamide (n, %)	16/61 (26.2%)
- Aspirin (n, %)	8/61 (13.1%)
- Antivitamin K (n, %)	5/61 (8.2%)

Table 1. Characteristics of SLE patients.

Qualitative variables are given as number of patients and percentage and qualitative variables as mean with standard deviation.

SLEDAI: SLE disease activity index; C3/C4: Complement factor 3 and 4. APS: Antiphospholipid syndrome; dsDNA: double stranded DNA; SSA: Sjögren syndrome antigen A; SSB: Sjögren syndrome antigen B; Sm: Smith; RNP: ribonucleoprotein; aPL: antiphospholipid; LA: lupus anticoagulant.

3.2. OX40 expression is increased in all subpopulations of LT helpers

The percentage of total LT expressing OX40 was significantly higher in lupus patients than in healthy donors (mean $\pm$ standard deviation [SD]: 15.2% $\pm$ 11.5% vs 7.8% $\pm$ 9.3%; $p < 0.0001$) (Figure 2.A). Each subgroup of LT helpers including Tfh (CXCR5+PD1⁺) (Figure 2.B), Tph (CXCR5-PD1^{hi}) (Figure 2.C), LTh1 (CXCR3+CXCR6⁻), LTh2 (CXCR3-CXCR6⁻) and LTh17 (CXCR3-CXCR6⁺) (Figure 2.D) were also studied. Each of them overexpressed OX40 in SLE patients compared to healthy subjects, namely LTh1 (mean $\pm$ SD of OX40+Th1 in SLE: 15.2% $\pm$ 13.2% vs in HD patients: 6.8% $\pm$ 10.15%; $p = 0.0002$) (Figure 2.D.1), LTh2 (mean $\pm$ SD of OX40+Th2 in SLE: 9.0% $\pm$ 8.1% vs in HD: 5.8% $\pm$ 9.6%; $p = 0.002$) (Figure 2.D.2), LTh17 (mean $\pm$ SD of OX40+Th17 in SLE patient: 21.0% $\pm$ 15.9% vs in HD: 10.2% $\pm$ 9.4%; $p = 0.0003$) (Figure 2.D.3), but also the Tfh (mean $\pm$ SD of OX40+Tfh in SLE patients: 13.8% $\pm$ 12.8% vs in HD: 8% $\pm$ 10.9%; $p = 0.013$) (Figure 2.B) and Tph cells (mean $\pm$ SD of OX40+Tph in SLE patients: 24.1% $\pm$ 16.4% vs in HD: 14% $\pm$ 11.5%; $p = 0.0013$) (Figure 2.C).

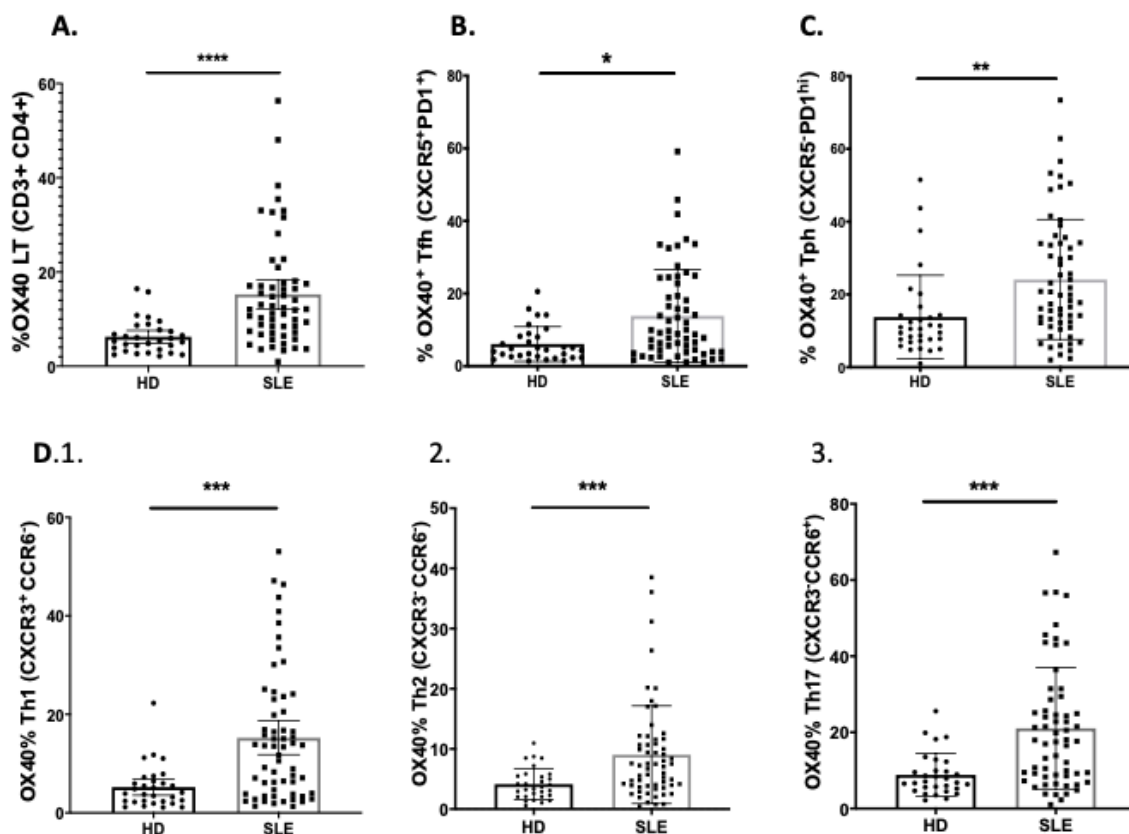


Figure 1. Percentage of expression of OX40 by different sub-populations of T lymphocytes.

Expression of OX40 was measured by cytometry and compared between healthy donors (HD) and SLE patients. Percentage of total T cells expressing OX40 (A). Percentage of LTfh expressing OX40 (B); Percentage of LTph expressing OX40 (C). Percentage of LT helpers expressing OX40 (D): OX40 expression by LTh1 (1); OX40 expression by LTh2 (2); OX40 expression by LTh17 (3). Each group was compared by Mann Whitney test. Bars represent mean value of percentage of OX40 expression with standard deviation. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

3.3. Disease activity correlates with OX40 expression on Tph but not on other LT helpers

We divided SLE patients into two groups: 34 non-active SLE (SLEDAI < 6) and 27 active SLE (SLEDAI ≥ 6). We found no significant difference in OX40 expression of LTh1, LTh2 and LTh17 in patients with active lupus compared to those with inactive lupus (Figure 2. A, B, C). There was also no correlation between SLEDAI and OX40 expression on these cells (Figure 2. A, B, C). OX40 expression on Tfh was not associated with disease activity. There was no significant difference between the percentage of Tfh expressing OX40 in inactive and active lupus (mean ± SD: 13.6% ± 13.1% versus 14% ± 12.7%, respectively ; p=0.88), and similarly, OX40 expression on Tfh was not correlated with SLEDAI (Spearman's rank correlation coefficient $r=0.1$; $p=0.4$) (Figure 2.D). Conversely, OX40 was significantly overexpressed on the Tph of patients with active lupus compared to inactive lupus (mean ± SD : 27.8% ± 17.9% vs 19.1% ± 13 % respectively; $p=0.04$) (Figure 2.E) and the percentage of OX40+ Tph was positively correlated with SLEDAI ($r=0.33$; $p=0.008$) (Figure 2.E).

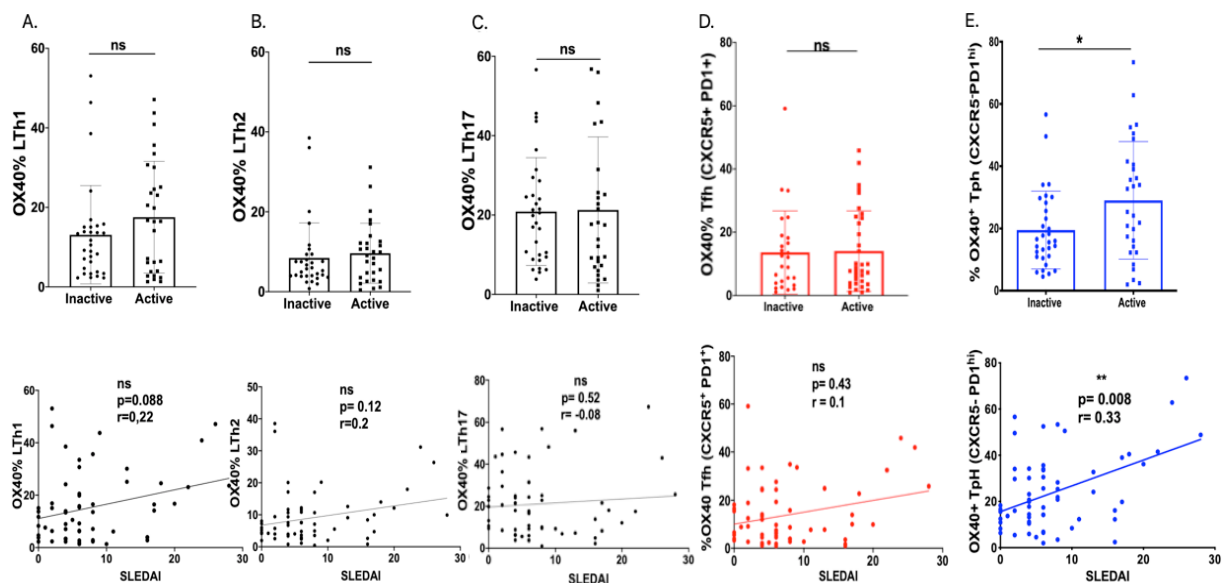


Figure 2. Correlation between disease activity and expression of OX40 on LTh1, LTh2, LTh17, LTfh and Tph.

Expression of OX40 on LTh1, LTh2, LTh17 (black populations) depending on the disease activity (active if SLEDAI ≥ 6) and correlation with SLEDAI (A, B, C). Percentage of OX40+Tfh (red population) depending on the disease activity (active if SLEDAI ≥ 6) and correlation with SLEDAI (D). Percentage of OX40+Tph (blue population) depending on the disease activity (active if SLEDAI ≥ 6) and correlation with SLEDAI(E). Each group was compared by Man Whitney test. Bars represent mean value of percentage of OX40 expression with standard deviation. Correlation between quantitative variables were performed with the non-parametric Spearman's correlation test. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$.

We therefore looked at the association of OX40 expression on Tph with markers of lupus activity (Figure 3). This expression was significantly higher in patients with positive anti-dsDNA antibodies on the day of assesment (mean $\pm$ SD in anti-DNA positive patients $27.5\% \pm 17.8\%$ vs $17.4\% \pm 12.1\%$ in patients without anti-DNA antibodies; $p=0.04$) and was positively correlated with the levels of anti-dsDNA antibody ($r=0.38$; $p=0.003$). Also, there was more OX40+ Tph cells in patients with C3 hypocomplementemia compared to those with normal C3 (mean $\pm$ SD: $31\% \pm 17.3\%$ vs $17\% \pm 11\%$ respectively; $p=0.0012$) and with C4 hypocomplementemia compared to those with normal C4 (mean $\pm$ SD: $29.4\% \pm 17.9\%$ versus $18.1\% \pm 12.1\%$ respectively; $p=0.016$). Finally, the frequency of OX40+ Tph was negatively correlated with the rate of C3 ($r=-0.49$; $p=0.0002$) and C4 ($r=-0.41$; $p=0.017$). Of note, there was no correlation of expression of OX40 on Tfh with the same biomarkers (data not shown).

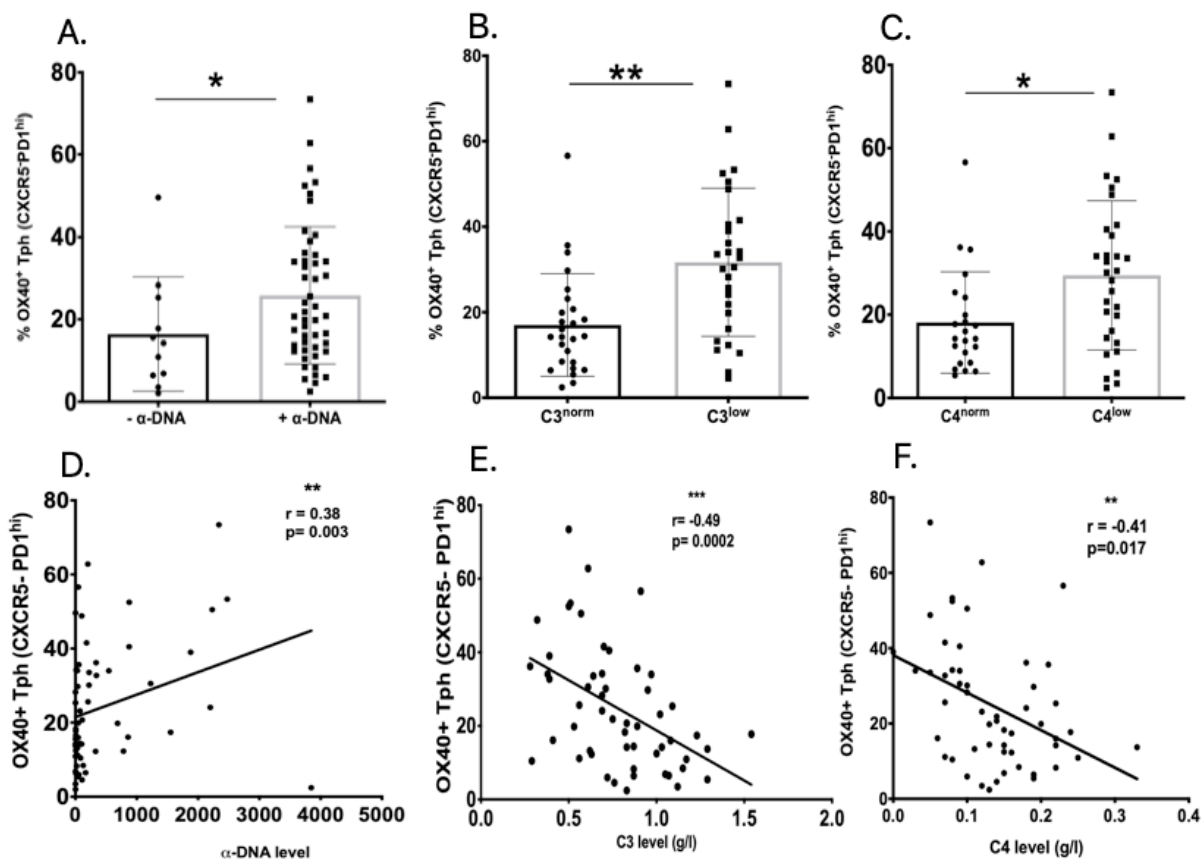


Figure 3. Correlation of expression of OX40 on Tph with biomarkers of disease activity.

Expression of OX40 on Tph in anti-DNA positive versus negative patients (A) and correlation with anti-DNA level (D). OX40 on Tph in patients with normal C3 level ($C3 > 0.8\text{mg/l}$) versus low C3 level (B) and correlation with the C3 level (E). OX40 on Tph in patients with normal C4 ($C4 > 0.15\text{mg/l}$) level versus low C4 level (B) and correlation with the C4 level (F). Each group was compared by Man Whitney test. Bars represent mean value of percentage of OX40 expression with standard deviation. Correlation between quantitative variables were performed with the non-parametric Spearman correlation test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

3.4. Activated ICOS + Tph correlate with disease activity.

Analysis of the correlations of activity markers with the expression of OX40 on the five LT helpers subtypes studied suggested a specific interest of OX40+ Tph in lupus, but not of OX40+ Tfh. We therefore refined the analyses on Tfh and Tph to evaluate the involvement of these 2 cell subtypes which share many characteristics.

First, we quantified the percentage of Tfh (PD1⁺ and CXCR5⁺) (red population, Figure 4.A) and Tph (PD1^{hi} and CXCR5⁻) (blue population, Figure 4.A) in the total T cells population of each patient and HD by flow cytometry. Frequency of Tph was significantly higher in SLE patients than in HD (mean $\pm$ SD: 5.79% $\pm$ 4.3% vs 2.41% $\pm$ 1.18%, respectively; $p < 0.0001$) (blue population, Figure 4.B). In contrast, there was no significant difference in the frequency of HD and SLE Tfh cells (mean $\pm$ SD 14.1% $\pm$ 3.5% vs 14.1% $\pm$ 6.5% respectively; $p = 0.46$) (red population, Figure 4.B).

Then, we measured the frequency of Tph and Tfh expressing CCR2 on their surface. CCR2 is a chemokine receptor allowing the migration of cells to inflammatory tissues. There was no significant difference in the number of Tfh expressing CCR2 between HD and SLE (9.5% $\pm$ 6.4% versus 10.8% $\pm$ 5.9% respectively; mean $\pm$ SD; $p = 0.42$) (red population, Figure 4.C). However, there were significantly less Tph cells expressing CCR2 in the blood of SLE than in the HD (mean $\pm$ SD: 24.4% $\pm$ 12.3% versus 50.3% $\pm$ 8.3% respectively; $p = 0.0002$) (blue population 4.C), suggesting that the Tph could migrate into the inflammatory tissues in SLE patients.

Finally, we compared Tfh and Tph expressing the ICOS activity marker. The percentage of ICOS+Tph was increased in patients with active lupus compared to inactive patients (mean $\pm$ SD 36.1% $\pm$ 18.3 % vs 19.5% $\pm$ 11.4% respectively; $p = 0.0002$), in those with C3 hypocomplementemia (mean $\pm$ SD in patients with low C3: 33.2% $\pm$ 17.1% vs 22.2% $\pm$ 15.8% in patients with normal C3 level, $p = 0.007$) and C4 hypocomplementemia (mean $\pm$ SD in patients with low C4: 32.6% $\pm$ 19.0% vs 21.6% $\pm$ 12.4% in patients with normal C4 level, $p = 0.025$) and was correlated with the level of anti-dsDNA ($r = 0.3$; $p = 0.02$) (Figure 4.D, blue population). The percentage of ICOS+ Tfh was not associated with any of these markers of disease activity (Figure 4.D, red population). The percentage of ICOS + Tph was also positively

correlated with proteinuria ($r=0.42$; $p=0.001$) (Figure 4.E, blue population), which was not the case for the percentage of ICOS+ Tfh (Figure 4.E, red population).

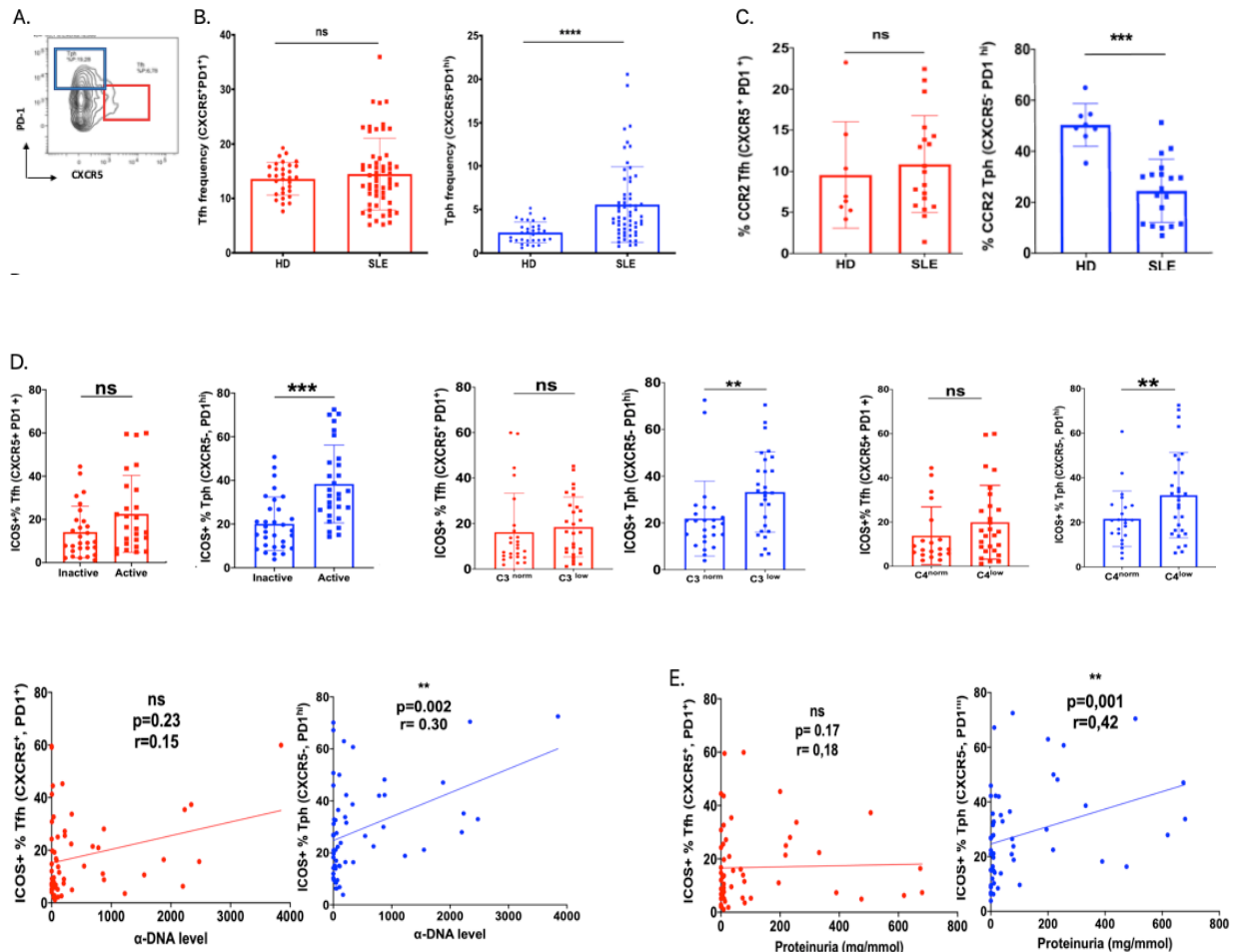


Figure 4. Comparison between Tph and Tfh: frequency, CCR2 expression and ICOS expression as a function of activity parameters and proteinuria

(A) A representative result of flow cytometry analyses: Tph population is characterized by high expression of PD-1 and the lack of expression of CXCR5. Tfh expresses PD1 + and CXCR5 +.

(B) Comparison of frequency of Tfh (red population) and Tph (blue) in HD versus SLE patients.

(C) Study of percentage of Tfh (red) and Tph expressing CCR2 (blue) on their surface.

(D) Percentage of ICOS+ Tfh (red populations) and Tph (blue populations) depending on disease activity (active disease if SLEDAI ≥ 6), normal or low C3 level (normal if C3 > 0.8 mg/l), normal or low C4 level (normal if C4 > 0.15 mg/l) anti-DNA antibody level.

(E) Correlation between proteinuria (mg/mmol) and percentage of ICOS+ Tfh (red populations) and Tph (blue populations). Each group was compared by Mann Whitney test. Bars represent mean value of percentage of OX40 expression with standard deviation. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$.

3.5. OX40+ Tph are highly correlated with renal impairment in SLE.

Previous results suggesting a specificity of Tph in the disease and in particular during renal impairment, and since the expression of OX40 on Tph is closely correlated with activity markers, we looked for associations between the different clinical impairments of SLE and the frequency of OX40+ Tph.

We found a statistically significant relationship between the expression of OX40 on Tph and active renal involvement (mean $\pm$ SD of percentage of circulating OX40+ Tph in patients with nephritis $33.1\% \pm 17.1\%$ vs $20.8\% \pm 15.1$ in patients without nephritis; $p=0.007$) (Table 2 and Figure 5.A). OX40 was also positively correlated with proteinuria ($r=0.31$; $p=0.017$) (Table 2 and Figure 5.B). There was however no association with other clinical disorders (serous, cutaneous, articular impairment) (Table 2). Biologically, no association was found with the presence of anti-RNP, antiphospholipid antibodies, or positive Coombs test ($p \geq 0.05$). Finally, there was no impact of the treatment on the expression of OX40 on Tph (Figure 6.A).

	%OX40 Tph
Serological characteristics	
Anti RNP + vs antiRNP -	ns
aPL + vs aPL -	ns
ACC + vs ACC -	ns
Anticardiolipines + vs -	ns
Coombs + vs Coombs -	ns
Clinical manifestations	
Renal active vs inactive	$p=0.007$
Correlation with proteinuria	$p=0.017$
Cutaneoarticular active vs inactive	ns
Seritis + vs -	ns
Hematological	
Lymphopenia + vs -	$p=0.043$
Correlation with lymphocytes count	ns
Correlation with neutrophils count	ns
Correlation with platelets count	ns
Treatment	
HCQ + vs -	ns
Prednisone <10mg/d. vs ≥ 10 mg/d	ns
Rituximab + vs -	ns
Belimumab + vs -	ns
Cyclophosphamide + vs -	ns

Table 2. Expression of OX40 on Tph depending on serological and clinical features.

RNP: ribonucleoprotein; aPL: antiphospholipid; LA: lupus anticoagulant; HCQ: hydroxychloroquine; mg/d: milligram per day. Each group was compared by Man Whitney test. Statistically significant results if $p<0.05$.

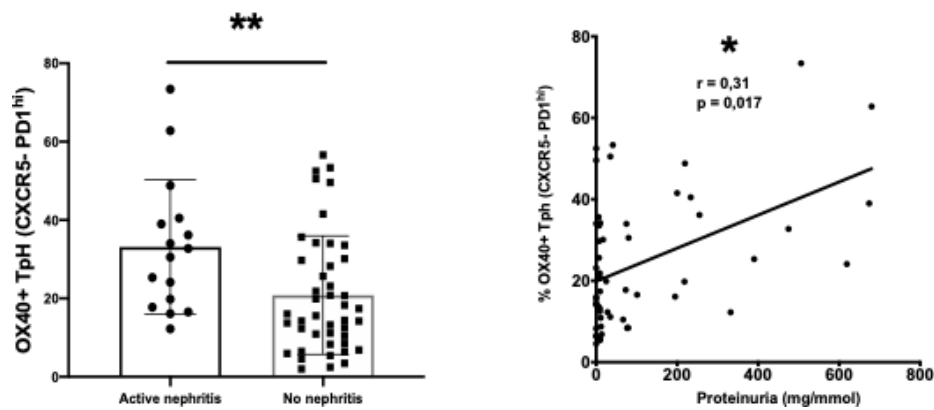


Figure 5. Expression of OX40 on Tph depending on serological and clinical features.

Expression of OX40 depending on different SLE features (Table A). Comparison of expression of OX40 between active renal disease and absence of active renal disease ($p < 0.05$) (A). Correlation between proteinuria (mg/mmol) and OX40 expression on Tph ($p < 0.05$, $r = 0.31$) (B). * $p < 0.05$.

4. Discussion

Our study sheds light on a new pathway by which OX40-OX40L could play a pathological role in lupus. Percentage of OX40+ Tph was closely linked with activity markers (positive correlation with SLEDAI and anti-dsDNA levels, negative correlation with C3 and C4 levels). In addition, OX40+Tph were associated with renal impairment and correlated with proteinuria. OX40 positives Th1, Th2, Th17 and Tfh were also increased in lupus patients compared to healthy subjects. But the expression of OX40 on these sub-populations of T effectors was not associated with SLEDAI in our study, nor with any clinical disease, notably nephritis, suggesting a specific role for OX40+Tph.

The pathological role of aberrant activation of the OX40-OX40L axis has been demonstrated in several autoimmune diseases, including lupus (20,21). However, the mechanisms by which this co-stimulation pathway participates in the pathogenesis of lupus are not fully elucidated. Jacquemin and al. (10) suggested that this axis would participate in a loop of amplification of the immune response against the self in lupus. Indeed, they demonstrated that RNA-containing ICs activate TLR7 and that this induces the expression of OX40L on monocytes. Then, OX40 signals promotes naïve CD4+ T cells to express multiple Tfh molecules and become functional B cell helpers in germinal centers. These B cells in turn produce autoantibodies that form ICs. Our study found no link between OX40 expression on Tfh and disease activity or any clinical manifestations. Nevertheless, this may be due to the lack of power as we analyzed only

61 patients. Moreover, this is a real-life study, with an unselected cohort of patients involving any SLE patient regardless of disease activity, comorbidities or treatment regimen. This may therefore have an impact on the results, especially since OX40 expression on T cells is induced and transient (20). Also, we only looked at the circulating Tfh, but, in autoimmunity, OX40 is upregulated at sites of inflammation (22). It is identifiable on infiltrating lymphocytes in multi-system diseases such as vasculitis but staining is only seen in affected organs (23) and in rheumatoid arthritis OX40 is particularly upregulated on synovial lymphocytes from inflamed joints. In systemic diseases there is an increase in the number of peripheral OX40+ CD4+ T cells but we can think that in our cohort, in active patients, the OX40+ Tfh are in the germinal centers, thus underestimating the level of circulating OX40+Tfh.

Conversely, the percentage of OX40+ Tph is highly associated with activity markers and renal impairment. Tph were initially described in the joints and expanded in the circulation of patients with seropositive RA (16). Antigen-specific T cells both in gut and blood of patients with celiac disease were found to have a Tph phenotype (24). And, cells with this phenotype were also increased in small cohort of systemic sclerosis (24), in patients with type 1 diabetes (25) and in SLE (17,18,26). The expansion of Tph cells in multiple autoantibody-associated conditions but not in seronegative RA, supports the idea that Tph cells represent a common driver of pathologic B cell activation in autoantibody-associated autoimmune diseases. Bocharnikov and al. showed that circulating Tph and Tfh were increased comparably in new-onset SLE but that Tph were much more prevalent in established SLE and lupus nephritis patients and were the only ones associated with disease activity (17). This suggests that circulating Tph cells are more strongly associated with the activated T cell response than Tfh in SLE. In addition, we showed a decrease in CCR2+ Tph, suggesting a migration of Tph to inflammatory tissues and especially the kidney. However, we did not find a statistically significant correlation between the CCR2+ Tph level and renal impairment or SLEDAI (data not shown) but since CCR2 phenotyping was only done on 15 patients, it is difficult to conclude. It has already been shown that OX40L-positive CD11c+HLA-DR+ myeloid APCs infiltrate secondary inflammatory lymphoid organs (10). Also, a strong and specific localization of OX40L in the glomerular capillary wall on biopsies from patients with proliferative nephritis was previously described (27). Therefore, the analyses should be supplemented by T-cell and OX40 phenotyping on nephritis biopsies compared to kidney biopsies from non-lupus

patients. This would make it possible to specify the infiltration of nephritis by OX40+ Tph and Tfh.

Concerning the mechanisms of action of Tph cells, it has very recently been described that, like the Tfh cells (28), they stimulate B cells via IL-21 and that they require the transcription factor MAF for this (26). But the co-stimulation pathways that activate Tph and promote Tph-B cells interactions need to be better studied and, in this sense, our study suggests an important role for the OX40/OX40L pathway.

In our study, the expression of ICOS by Tph was significantly higher in lupus patients than healthy subjects (data not shown) and was highly correlated with disease activity and renal disease. Similar results have been found in previous studies for Tfh with an upregulation of ICOS expression by Tfh cells in active SLE patients (14,10). The ICOS-ICOSL axis plays a key role in the differentiation of Tfh cells working in a redundant and cooperative manner with OX40 (9), their survival (11,29), and their interactions with B lymphocytes (8). ICOS and OX40 both enhance the PI3K-Akt (30) pathway, which in turn induces upregulation of IL-21 and IL-4 (31). Tfh and Tph sharing many characteristics, we can think that ICOS plays such an important role for Tph but it must be studied. Finally, a previous study had shown that in lupus patients, the level of Tfh ICOS + was correlated with the level of APC expressing OX40L but that the expression of ICOSL was not increased on APC, suggesting that this axis was not the cause of an exaggerated Tfh response (10).

OX40-OX40L axis blockade may develop into a possible therapeutic approach in SLE alleviating autoantibody production by Tfh and Tph. Blockage of OX40-OX40L engagement has already shown interesting results in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a mouse model of multiple sclerosis, where anti-OX40L monoclonal antibody (32) and a soluble human OX40 immunoglobulin fusion protein binding to murine OX40L (33) improve disease course in the mouse. Similarly, OX40L blockade on collagen-induced arthritis (mouse model of rheumatoid arthritis) (34) and on the murine model of Crohn disease (35) improves the diseases course.

In conclusion, SLE patients display a higher number of OX40+Tph which can participate its pathogenesis notably by promoting the extrafollicular production of autoantibodies in inflammatory tissues by B cells, such as in lupus nephritis. Further investigation is needed for the potential use of TphOX40+ as a biomarker and to understand the mechanisms underlying its pathological role. Notwithstanding, OX40/OX40L axis emerges as a new therapeutic target in SLE.

References

1. Fava A, Petri M. Systemic lupus erythematosus: Diagnosis and clinical management. *J Autoimmun.* janv 2019;96:1-13.
2. Zonana-Nacach A, Barr SG, Magder LS, Petri M. Damage in systemic lupus erythematosus and its association with corticosteroids. *Arthritis Rheum.* août 2000;43(8):1801-8.
3. Little J, Parker B, Lunt M, Hanly JG, Urowitz MB, Clarke AE, et al. Glucocorticoid use and factors associated with variability in this use in the Systemic Lupus International Collaborating Clinics Inception Cohort. *Rheumatology.* 1 avr 2018;57(4):677-87.
4. Nusbaum JS, Mirza I, Shum J, Freilich RW, Cohen RE, Pillinger MH, et al. Sex Differences in Systemic Lupus Erythematosus. *Mayo Clin Proc.* févr 2020;95(2):384-94.
5. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med.* 16 oct 2003;349(16):1526-33.
6. Graham DSC, Graham RR, Manku H, Wong AK, Whittaker JC, Gaffney PM, et al. Polymorphism at the TNF superfamily gene TNFSF4 confers susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* janv 2008;40(1):83-9.
7. Lee YH, Song GG. Associations between TNFSF4 and TRAF1-C5 gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus: A meta-analysis. *Hum Immunol.* oct 2012;73(10):1050-4.
8. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity.* 16 oct 2014;41(4):529-42.
9. Vogel KU, Edelmann SL, Jeltsch KM, Bertossi A, Heger K, Heinz GA, et al. Roquin Paralogs 1 and 2 Redundantly Repress the Icos and Ox40 Costimulator mRNAs and Control Follicular Helper T Cell Differentiation. *Immunity.* avr 2013;38(4):655-68.
10. Jacquemin C, Schmitt N, Contin-Bordes C, Liu Y, Narayanan P, Seneschal J, et al. OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity.* juin 2015;42(6):1159-70.
11. Bossaller L, Burger J, Draeger R, Grimbacher B, Knoth R, Plebani A, et al. ICOS Deficiency Is Associated with a Severe Reduction of CXCR5⁺ CD4 Germinal Center Th Cells. *J Immunol.* 1 oct 2006;177(7):4927-32.
12. Good-Jacobson KL, Szumilas CG, Chen L, Sharpe AH, Tomayko MM, Shlomchik MJ. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol.* juin 2010;11(6):535-42.
13. Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, Light A, D'Costa K, Kallies A, et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J Exp Med.* 15 févr 2010;207(2):365-78.

14. Choi J-Y, Ho JH, Pasoto SG, Bunin V, Kim ST, Carrasco S, et al. Circulating Follicular Helper-Like T Cells in Systemic Lupus Erythematosus: Association With Disease Activity: Circulating Tfh-Like Cells in SLE. *Arthritis Rheumatol.* avr 2015;67(4):988-99.
15. Chang A, Henderson SG, Brandt D, Liu N, Guttikonda R, Hsieh C, et al. In Situ B Cell-Mediated Immune Responses and Tubulointerstitial Inflammation in Human Lupus Nephritis. *J Immunol.* 1 févr 2011;186(3):1849-60.
16. Rao DA, Gurish MF, Marshall JL, Slowikowski K, Fonseka CY, Liu Y, et al. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature.* févr 2017;542(7639):110-4.
17. Makiyama A, Chiba A, Noto D, Murayama G, Yamaji K, Tamura N, et al. Expanded circulating peripheral helper T cells in systemic lupus erythematosus: association with disease activity and B cell differentiation. *Rheumatology [Internet].* 15 mars 2019 [cité 16 nov 2019]; Disponible sur: <https://academic.oup.com/rheumatology/advance-article/doi/10.1093/rheumatology/kez077/5382093>
18. Lin J, Yu Y, Ma J, Ren C, Chen W. PD-1+CXCR5-CD4+T cells are correlated with the severity of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology [Internet].* 10 juin 2019 [cité 16 nov 2019]; Disponible sur: <https://academic.oup.com/rheumatology/advance-article/doi/10.1093/rheumatology/kez228/5513262>
19. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* sept 2019;71(9):1400-12.
20. Croft M. Control of Immunity by the TNFR-Related Molecule OX40 (CD134). *Annu Rev Immunol.* mars 2010;28(1):57-78.
21. Fu Y, Lin Q, Zhang Z, Zhang L. Therapeutic strategies for the costimulatory molecule OX40 in T-cell-mediated immunity. *Acta Pharm Sin B.* mars 2020;10(3):414-33.
22. Webb GJ, Hirschfield GM, Lane PJL. OX40, OX40L and Autoimmunity: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* juin 2016;50(3):312-32.
23. Wilde B, Dolff S, Cai X, Specker C, Becker J, Totsch M, et al. CD4+CD25+ T-cell populations expressing CD134 and GITR are associated with disease activity in patients with Wegener's granulomatosis. *Nephrol Dial Transplant.* 6 août 2008;24(1):161-71.
24. Christophersen A, Lund EG, Snir O, Solà E, Kanduri C, Dahal-Koirala S, et al. Distinct phenotype of CD4+ T cells driving celiac disease identified in multiple autoimmune conditions. *Nat Med.* mai 2019;25(5):734-7.
25. Ekman I, Ihantola E-L, Viisanen T, Rao DA, Nääntö-Salonen K, Knip M, et al. Circulating CXCR5-PD-1hi peripheral T helper cells are associated with progression to type 1 diabetes. *Diabetologia.* sept 2019;62(9):1681-8.
26. Bocharnikov AV, Keegan J, Wacleche VS, Cao Y, Fonseka CY, Wang G, et al. PD-1hiCXCR5- T peripheral helper cells promote B cell responses in lupus via MAF and IL-21. *JCI Insight [Internet].* 17 oct 2019 [cité 16 nov 2019];4(20). Disponible sur: <https://insight.jci.org/articles/view/130062>
27. Aten J, Roos A, Claessen N, Schilder-Tol EJ, Ten Berge IJ, Weening JJ. Strong and selective glomerular localization of CD134 ligand and TNF receptor-1 in proliferative lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol JASN.* août 2000;11(8):1426-38.
28. Gensous N, Schmitt N, Richez C, Ueno H, Blanco P. T follicular helper cells, interleukin-21 and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology.* 7 août 2016;25(8):kew297.
29. Akiba H, Takeda K, Kojima Y, Usui Y, Harada N, Yamazaki T, et al. The Role of ICOS in the CXCR5 + Follicular B Helper T Cell Maintenance In Vivo. *J Immunol.* 15 août 2005;175(4):2340-8.
30. Preite S, Huang B, Cannons JL, McGavern DB, Schwartzberg PL. PI3K Orchestrates T Follicular Helper Cell Differentiation in a Context Dependent Manner: Implications for Autoimmunity. *Front Immunol [Internet].* 7 janv 2019 [cité 22 mars 2020];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.03079/full>
31. Gigoux M, Shang J, Pak Y, Xu M, Choe J, Mak TW, et al. Inducible costimulator promotes helper T-cell differentiation through phosphoinositide 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci.* 1 déc 2009;106(48):20371-6.

32. Nohara C, Akiba H, Nakajima A, Inoue A, Koh C-S, Ohshima H, et al. Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis with Anti-OX40 Ligand Monoclonal Antibody: A Critical Role for OX40 Ligand in Migration, But Not Development, of Pathogenic T Cells. *J Immunol.* 1 févr 2001;166(3):2108-15.
33. Weinberg AD, Bourdette DN, Sullivan TJ, Lemon M, Wallin JJ, Maziarz R, et al. Selective depletion of myelin-reactive T cells with the anti-OX-40 antibody ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med.* févr 1996;2(2):183-9.
34. Jiang J, Liu C, Liu M, Shen Y, Hu X, Wang Q, et al. OX40 signaling is involved in the autoactivation of CD4+CD28- T cells and contributes to the pathogenesis of autoimmune arthritis. *Arthritis Res Ther* [Internet]. déc 2017 [cité 29 mars 2020];19(1). Disponible sur: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13075-017-1261-9>
35. Totsuka T, Kanai T, Uraushihara K, Iiyama R, Yamazaki M, Akiba H, et al. Therapeutic effect of anti-OX40L and anti-TNF- α MAbs in a murine model of chronic colitis. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* 1 avr 2003;284(4):G595-603.

3 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail est le fruit de la collaboration entre le laboratoire ImmunoConcept (CNRS UMR 5164) et les services cliniques de Médecine Interne (hôpitaux Haut Lèveque et Saint André) et de Rhumatologie (hôpital Pellegrin) dont sont issus les patients. Cette thèse m'a initiée à l'immunologie fondamentale et à l'étude de la physiopathologie du lupus. Cela a élargi mon regard de clinicienne et me permettra d'aborder les questions thérapeutiques avec une nouvelle perspective.

Cette étude permet de confirmer l'intérêt de l'axe OX40/OX40L dans la physiopathologie du lupus et suggère un potentiel rôle spécifique des Tph activés exprimant l'OX40, notamment sur l'atteinte rénale. Les OX40+ Tph pourraient ainsi constituer une nouvelle cible thérapeutique mais ces résultats doivent d'abord être confirmés et des études supplémentaires doivent être réalisées in vivo et in vitro.

Ainsi, nous allons continuer à inclure des patients pour avoir un échantillon plus large, plus représentatif et des résultats plus puissants. Une analyse longitudinale des patients sera aussi réalisée à différents moments du suivi, pour monitorer l'expression d'OX40 dans le temps en fonction de l'activité de la maladie et les atteintes cliniques chez un même patient. Cela permettra de préciser le caractère biomarqueur de l'expression d'OX40 sur les Tph. Il est aussi important de compléter le travail par le phénotypage des lymphocytes T et d'étudier l'expression d'OX40 sur des biopsies rénales de patients atteints de néphrite lupique afin de rechercher un infiltrat pathologique de LTph OX40 +, une co-localisation Tph-LB qui attesterait de leur rôle auxiliaire in situ et d'étudier la formation de structures lymphoïdes ectopiques. In vitro, des analyses sur les lymphocytes B et leurs interactions avec les Tph sont actuellement en cours pour étudier la coopération Tph/LB et tenter de comprendre les mécanismes par lesquelles les Tph aident à la formation de structures lymphoïdes ectopiques. Enfin, les effets de l'inhibition de la voie OX40/OX40L par un anticorps anti-OX40 sont également à l'étude par l'équipe du Pr BLANCO au laboratoire ImmunoConcept.

Serment d'Hippocrate

Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.

Les OX40+ Tph (CXCR5⁺, ICOS⁺, PD-1^{hi}): un nouveau biomarqueur de l'activité de la maladie et de l'atteinte rénale dans le lupus?

Introduction. Le lupus érythémateux systémique est une maladie auto-immune hétérogène dans sa présentation. Sa physiopathologie est complexe. L'axe de co-stimulation OX40/OX40L a été décrit comme pouvant être impliqué dans la pathogénèse en participant à une boucle d'amplification de la production des autoanticorps par des lymphocytes B stimulés par les lymphocytes Tfh (CXCR5⁺, ICOS⁺, PD-1⁺). Récemment, une nouvelle sous population de lymphocytes auxiliaires a été décrite, les Tph (CXCR5⁺, ICOS⁺, PD-1^{hi}). Cependant, leur rôle dans la physiopathologie du LED et la manière dont l'axe OX40/OX40L est impliqué dans leur fonction, est encore inconnu.

Objectif. Étudier l'expression d'OX40 par les différentes sous-populations de lymphocytes T auxiliaires et rechercher une association entre l'expression d'OX40 sur ces LT et un profil clinique particulier de la maladie.

Méthodes. Les échantillons de sang de 61 patients atteints de LED suivis au CHU de Bordeaux et de 38 sujets contrôles ont été prélevés de façon prospective. Le nombre et la proportion de chaque sous-type de lymphocytes T (LTh1, LTh2, LTh17, LTfh et LTph) ainsi que le pourcentage de chaque sous-type exprimant OX40 ont été déterminés par cytométrie de flux. Ces données ont été croisées aux données cliniques en utilisant STATA© 13.1 software.

Résultats. L'expression d'OX40 par chaque sous type de LT auxiliaires était plus importante chez les patients lupiques que chez les sujets contrôles. Cependant, seul le pourcentage d'OX40+Tph était corrélé aux marqueurs d'activité de la maladie, à savoir le SLEDAI (corrélation positive entre OX40+Tph% et le SLEDAI ; $r=0.33$; $p=0.008$), le taux d'Ac anti ADN ($r=0.38$; $p=0.003$), et les taux de C3 (corrélation négative entre OX40+Tph% et le C3 ; $r=-0.49$; $p=0.0002$) et de C4 ($r=-0.41$; $p=0.017$). Les Tph ICOS⁺ activés étaient corrélés aux marqueurs d'activité mais pas les Tfh ICOS⁺. Enfin, le pourcentage d'OX40+ Tph était associé à l'atteinte rénale active (moyenne $\pm$ DS du pourcentage d'OX40+ Tph circulants chez les patients avec une néphrite active $33.1\% \pm 17.1\%$ vs $20.8\% \pm 15.1$ chez les patients sans néphrite; $p=0.007$) et positivement corrélée à la protéinurie ($r=0.31$; $p=0.017$).

Conclusion. Les patients lupiques ont un pourcentage d'OX40+ Tph augmenté par rapport aux sujets sains et ce nombre est associé aux marqueurs d'activité clinique et biologique et à l'atteinte rénale.

Mots clés: lupus systémique, biomarqueurs, néphrite, T follicular helper (Tfh), T peripheral helper (Tph), OX40, ICOS, CXCR5.

OX40+ Tph (CXCR5⁺, ICOS⁺, PD-1^{hi}): a novel biomarker of disease activity and renal involvement in lupus?

Introduction. Systemic lupus erythematosus is an autoimmune disease that is heterogeneous in presentation and complex in pathophysiology. The OX40/OX40L co-stimulation axis has been described as potentially implicated in pathogenesis by participating in a loop of amplification of autoantibody production through T follicular helpers (CXCR5⁺, ICOS⁺, PD-1⁺) - stimulated B cells. Recently a new subpopulation of T helpers, the T peripheral helpers (Tph) (CXCR5⁺, ICOS⁺, PD-1^{hi}), has been described. However, their role in the physiopathology of SLE and how OX40/OX40L axis is involved in their function, is still unknown.

Objective. To study the expression of OX40 by the different sub-populations of helper T lymphocytes and to look for an association between OX40 expression on these T cells and a particular clinical profile of the disease.

Methods. Blood samples from 61 SLE patients followed in Bordeaux University hospital and 38 controls were studied. The fraction of each subtype of T cells (LTh1, LTh2, LTh17, LTfh and LTph) as well as the percentage of each subtype expressing OX40 were determined by flow cytometry. These data were cross-referenced with clinical data using STATA© 13.1 software.

Results. The expression of OX40 by each T cell helper subtype was greater in SLE patients compared to the control subjects. However, only the percentage of OX40+ Tph was correlated with disease activity markers namely the SLEDAI (positive correlation between OX40+Tph% and SLEDAI; $r=0.33$; $p=0.008$), anti-dsDNA antibody levels ($r=0.38$; $p=0.003$), C3 (negative correlation between OX40+Tph% and C3; $r=-0.49$; $p=0.0002$) and C4 levels ($r=-0.41$; $p=0.017$). Activated ICOS⁺ Tph correlated with activity markers but not ICOS⁺ Tfh. Finally, the percentage of OX40+ Tph was associated with active renal impairment (mean $\pm$ SD of percentage of circulating OX40+ Tph in patients with nephritis $33.1\% \pm 17.1\%$ vs $20.8\% \pm 15.1$ in patients without nephritis; $p=0.007$) and positively correlated with proteinuria ($r=0.31$; $p=0.017$).

Conclusion. SLE patients have an increased percentage of OX40+ Tph compared to healthy subjects and this number is associated with clinical and biological activity markers as well as renal impairment.

Key words: systemic lupus erythematosus, biomarkers, nephritis, T follicular helper, T peripheral helper, OX40, ICOS, CXCR5.

Thèse de docteur en médecine, spécialité Rhumatologie

Université de Bordeaux, UFR des Sciences Medicales, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux.