



Études des mécanismes synoviaux impliqués dans la résistance aux agents bloquant le $\text{TNF}\alpha$ dans la Polyarthrite Rhumatoïde

Valérie Badot

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Promoteur : Pr Bernard Lauwerys

Co-Promoteur : Pr Benoît Van den Eynde

2011

Jury de thèse

Promoteur :

Professeur Bernard Lauwerys

Institut de recherche expérimentale et clinique (IREC), Bruxelles
Pôle de pathologies rhumatismales, Université catholique de Louvain, Bruxelles

Co-promoteur :

Professeur Benoît Van den Eynde

Institut Ludwig de recherche sur le cancer et Université catholique de Louvain,
Bruxelles

Président du jury :

Professeur Luc Bertrand

Institut de recherche expérimentale et clinique (IREC), Bruxelles
Pôle de recherche cardiovasculaire, Université catholique de Louvain

Membres du jury :

Professeur Pierre Coulie

Institut de Duve, Université catholique de Louvain, Bruxelles

Professeur Frédéric Houssiau

Institut de recherche expérimentale et clinique (IREC), Bruxelles
Pôle de pathologies rhumatismales, Université catholique de Louvain, Bruxelles

Professeur Laurent Knoops

Institut Ludwig de recherche sur le cancer, Bruxelles
Unité d'hématologie, Cliniques universitaires Saint-Luc

Membres invités extérieurs du jury :

Professeur Florence Apparailly

Institut des neurosciences, INSERM (U844) Montpellier, France

Professeur Dirk Elewaut

Laboratoire d'immunologie moléculaire et inflammation
Département de rhumatologie, Hôpital universitaire de Gand, Belgique

Remerciements

Maintenir une activité clinique de rhumatologue à mi-temps et réaliser un doctorat ainsi que cette thèse a été un énorme défi à relever...bien évidemment je n'aurai jamais pu y arriver sans l'aide essentielle et précieuse des personnes qui m'ont entourée durant ces années. J'espère n'oublier personne...

Au Professeur Bernard Lauwerys, j'exprime toute ma gratitude, mon admiration et mes sincères remerciements. Ton merveilleux savoir, ton intelligence, tes compétences, ta patience, ton enthousiasme, ton sens critique, ton optimisme, ta persévérance, ton dévouement, ton oreille attentive (et qu'est-ce que j'ai du t'ennuyer avec mes questions, mes doutes, mes angoisses, mes incertitudes, et mes histoires), ta bonne (ou mauvaise -si si...parfois...-) humeur, ton obstination, ta mauvaise foi, ta fidélité, ton amitié ont été pour moi d'une richesse extraordinaire au cours de ces années, j'ai énormément appris, mûri, grandi et pris confiance en moi grâce à toi. Jamais assez, je ne pourrai te remercier. Une grande partie de cette thèse te revient. Je n'y serai pas arrivée sans toi, c'est certain...Je te souhaite beaucoup d'autres doctorants et thésards (si je ne suis pas parvenue à te décourager définitivement)... et j'espère que nous réussirons à collaborer et travailler ensemble encore de longues années...Merci sincèrement pour tout.

Je remercie le Professeur Frédéric Houssiau pour m'avoir d'une part acceptée au sein de son équipe (malgré mon appartenance universitaire et hospitalière), mais surtout pour m'avoir soutenue dans ce projet et avoir cru en moi. Frédéric, je te remercie pour ton hospitalité, ta disponibilité, ton intégrité, ta gentillesse, pour ton extraordinaire respect des autres et pour ton amitié. J'ai beaucoup d'admiration pour ce tu réalises dans le monde de la rhumatologie et je suis très fière d'avoir pu y participer un bref instant...

Au co-promoteur, le Professeur Benoît Van den Eynde, je tiens à vous remercier pour votre gentillesse, pour votre accueil au sein de votre équipe et de l'Institut Ludwig ainsi que pour l'aide apportée au cours de ce travail et de la correction du manuscrit. Vous m'avez appris qu'il faut persévérer dans la vie quoiqu'en disent les autres, et qu'une grande partie de l'aboutissement d'un projet dépend surtout de sa propre volonté. Je vous dois beaucoup pour cela.

Au Professeur Pierre Coulie, je tiens à présenter ma profonde reconnaissance pour l'intérêt apporté à cette thèse et aux travaux réalisés. Merci pour votre gentillesse, votre amabilité, votre disponibilité et pour les corrections apportées au manuscrit. Vous m'avez toujours montré un profond respect et j'ai toujours été très impressionnée par votre savoir. Ce fut un plaisir de vous connaître...

Je remercie les autres membres du jury : le Professeur Laurent Knoops pour ses encouragements, ses conseils, sa douceur et sa gentillesse, le Professeur Dirk Elewaut pour l'intérêt porté à nos travaux, pour ses questions lors de la défense privée, ses remarques et ses encouragements, (de même que pour avoir accepté la communication en français) et enfin, un tout grand merci au Professeur Florence Apparailly pour sa disponibilité, pour ses questions pertinentes et ses remarques intéressantes, pour sa spontanéité et sa gentillesse, pour ses compliments et pour avoir apporté une touche féminine à ce comité masculin... Merci au docteur Max Lhonneux et surtout au Professeur Luc Bertrand d'avoir

successivement été les présidents de mon comité, merci pour votre aide précieuse, vos conseils et votre soutien.

Merci au Professeur Anne Peretz qui m'a toujours soutenue dans mes projets depuis mon arrivée dans son service de Rhumatologie du CHU Brugmann. Anne, tu m'as encouragée à débiter ce doctorat et c'est en partie grâce à ta persévérance que j'ai pu obtenir ce mi-temps pour le réaliser... merci... Ton amitié m'est très précieuse.

Merci au Professeur Patrick Durez sans qui je n'aurai jamais fait la rhumatologie. Tout au long de ces années, nous nous sommes croisés mais nous sommes restés très proches. Tes conseils ont toujours été très importants pour moi.

Je remercie également tous les gens ayant participé directement ou indirectement à ce travail et que j'ai eu la chance de rencontrer pendant ces années. Merci à Ilse, pour son aide, son écoute et pour avoir partagé nos angoisses et notre stress la veille de nos séminaires.. Merci à Julie et Aurélie pour leur bonne humeur et leur enthousiasme,... bonne route les filles ! Je vous souhaite beaucoup de succès et d'aussi bons moments que les miens... Merci à Anne-Lise pour m'avoir montré les « secrets de sa cuisine »... Merci à Adrien pour sa collaboration, son timing parfait lors des prélèvements, nos coordinations SMS et pour ces jeudis soirs passés au laboratoire au début de ce doctorat ... Merci à Geneviève, Marie-Christine, et Philippine pour leur aide et leur efficacité.

Merci au Professeur Christine Gallant, et Docteur Ivan Theate pour leur contribution et leur grande disponibilité ainsi que l'équipe d'anatomopathologie pour leur accueil et leurs conseils.

J'ai eu beaucoup de plaisir à rencontrer, à travailler, et discuter avec les gens de l'Institut... Professeur van der Bruggen, cher Pierre, nos discussions autour d'un café vont beaucoup me manquer et je te remercie pour ton accueil chaleureux et tes propos passionnés. Nathalie, ton soutien et ta « positive attitude » ont été très importants pour moi. Grégoire, merci d'avoir partagé ces moments d'écriture de thèse (horreur de mise en page et horribles surprises de dernière minute de ces merveilleux programmes censés nous faciliter la vie)...

Pierre, Marjorie, Alex, Nico, Benoît, merci pour votre bonne humeur, votre accueil et votre aide... Catherine, Luc, Débora, Gérald, Carine, Francis, Vincent, Didier, Vinh, Laurie, Danielle, Emilie, Sophie, Julie, Véro, Violaine, Sabrina... Déjà partis ou non, je vous souhaite de belles choses pour la suite...merci pour ces moments de collaboration, d'apprentissage, de services rendus, de pause-café, de pause-déjeuner, de fous rires, pour les soirées passées ensemble, les verres partagés...Thanks Nisha for everything ! Manu, tes petites attentions ont toujours été un vrai bonheur ! Tina, Samira, Jean-Luc, Paul, votre disponibilité a toujours été un réel plaisir...

Merci à vous, mesdames les secrétaires, efficaces, aimables, toujours souriantes, ce fut un bonheur de vous demander un service, Nathalie, Geneviève, Julie et Suzanne. Merci... « Standing Ovation » à Jo et Jacques, « les héros bien réels » du monde virtuel, qui non seulement m'ont convertie à « l'univers de la pomme », mais qui ont été bien plus qu'une fois mes « sauveurs »...mon ignorance informatique et mes bourdes ont été plus d'une fois l'objet d'un appel en urgence auquel ils ont toujours répondu avec un large sourire (gentillesse ou tendre moquerie ? je ne veux pas le savoir) et avec une grande efficacité.

Bien entendu, je n'aurai pu aboutir à la fin de cette thèse sans l'aide de mes amis qui m'ont supportée pendant ces longs mois où j'ai été à plusieurs reprises découragée, dans le doute, occupée, énervée, désespérée, plaintive, insupportable... Leur oreille attentive, leurs conseils, leurs encouragements, leurs appels « à pas d'heure », m'ont été infiniment précieux et utiles.

Alex, Vio, Anne, Gaku, Seb, Laurent, Corine, Flo, Vermey, Joelle et Luka, Anne et Lio, Souad et Wallid, Simon, Emilie, Nelly, Silvana... je vous adore... merci pour votre soutien, votre patience et votre amitié...

A tous mes amis ou collègues que je n'ai pas vu souvent ces dernières années par manque de temps, à la question récidivante quelque peu agaçante: « et alors cette thèse ? », j'espère enfin pouvoir vous répondre avec un grand sourire à notre prochaine rencontre !

Une pensée à toute mon équipe de capoeira et de percussions (Mister Bean, Tijolo, Saguin, Cocade, Mamut, Matrinxia, Puma, Marrua, Python, Espinho Lua, Simpatia, Axanti, Enguia, Espiga et Professor Braz), qui a permis à Joia d'exorciser ses problèmes et son stress, et de lui apprendre de nouvelles valeurs de vie, d'écouter d'autrui et de dépassement de soi. A chaque année (de doctorat) ...sa corde ! Obrigada a todos !

Merci également à « l'Association Polyarthrite » et à sa présidente Sylviane Duthoit. Je n'oublie pas que ce travail a été réalisé avec le soutien et pour les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde, et qu'il s'agit d'une maladie pénible, douloureuse, lourde à porter et à partager, et j'ai une pensée particulière pour Nicole: Richard me manque aussi ... je vous souhaite beaucoup de courage et je ne l'oublierai jamais...

Enfin, je terminerai en remerciant ma famille: les personnes que j'aime le plus au monde, sans qui je ne serai certes pas là ni n'aurai fait quoi que ce soit dans ma vie... J'espère pouvoir un jour donner autant d'amour que vous m'en avez donné, j'espère que vous êtes aussi fiers que je le suis de vous ... Je dédie cette thèse à mes parents, vous le méritez plus que moi... et je vous promets cette fois... « C'est fini les études ! »...Quoique...

Liste des abréviations

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ADCC	<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> ou Cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AG	Antigène
AIA	Arthrite induite à l'adjuvant
Anti-CCP	Anticorps anti-peptide cyclique citrulliné
ARNm	Acide ribonucléique messager
CCLn	Ligand n de chémokines C-C
CCRn	Récepteur n de chémokine C-C ou β -chémokine
CD	<i>Cluster differentiation</i>
CDC2	<i>Cell division cycle 2</i>
CIA	<i>Collagen induced arthritis</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COMP	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>
CPA	Cellules présentatrice d'antigène
CRP	<i>C-Réactive protéin</i>
CTLA4	<i>Cytotoxic Lymphocyte-associated 4 protéin</i>
CxCLn	Ligand n de chémokine C-X-C ou α -chémokine
CXCRn	Récepteur n de chémokine C-X-C ou α -chémokine
DAS	<i>Disease Activity Score</i>
DD	<i>Death Domain</i>
DMARDs	<i>Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EP	Epitope partagé
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
EVA	Echelle Visuelle Analogique
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
Fc	Fragment cristallizable
FLS	<i>Fibroblast-like synoviocyte</i>
Foxp3	<i>Forkhead box 3</i>
FR	Facteur Rhumatoïde
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GTSE1	G-2 and S-phase expressed 1
GWAS	<i>Genome-Wide Association Studies</i>
HACA	<i>Human antichimeric antibody</i>
HAQ	<i>Health Quality Scale</i>
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN γ	Interféron gamma
IgG	Immunoglobuline G
IL-7Rs	Récepteur soluble de l'IL-7
IL-n	Interleukine-n
IRAK	<i>Interleukin receptor-associated kinase</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KO	<i>Knockout</i>
LFA-1	<i>Leukocyte function-associated-antigen-1</i>
LTB	Lymphotoxine B
LT α	<i>Lymphotoxine-α</i>
MAI	maladies auto-immunes
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MIP-1	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> ou Métalloprotéase Matricielle

MT-MMP	métalloprotéase matricielle de type membranaire
MTX	Methotrexate
NAD	nombre d'articulations douloureuses
NAG	nombre d'articulations gonflées
NF- κ B	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
NFAT5	<i>Nuclear factor of activated T-cells 5</i>
NK	<i>Natural killer</i>
OPG	Ostéoprotégérine
PADI	Peptidyl Arginine deiminase
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PR	Polyarthrite Rhumatoïde
PTPN22	<i>Proteine tyrosine phosphatase non-receptor 22</i>
RAFLS	<i>Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like-synoviocyte</i>
RANK(L)	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B (ligand)</i> ou (Ligand) activateur du récepteur de NF- κ B
RANTES	<i>Regulated upon activation, Normal T cell Expressed, and Secreted</i> , appelé aussi CCL5
ROR	<i>Retinoic-acid-receptor-related-orphan nuclear hormone receptor</i>
SCID	<i>Severe combined immunodeficient</i>
SCIDHuRAg	<i>Souris SCID greffée avec du tissu synovial humain de PR</i>
SCWA	<i>Streptococcal cell wall arthritis</i>
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
STAT	<i>Signal Transducer and activator of transription</i>
TACE	<i>TNFα converting enzyme</i>
TCR	T cell receptor
TGF β	<i>Transforming growth factor</i>
T _H	T helper
TIMP	<i>Tissue inhibitor metalloproteinase</i>
TLR	<i>Toll-like récepteur</i>
TNFR	Récepteur II du TNF α
TNF α	Tumor necrosis factor α
TRAF	<i>TNFR-associated factor</i>
Treg	T régulateur
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
TSLPR	<i>Thymic stromal lymphopoietin receptor</i>
VGEF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VS	vitesse de sédimentation
ZAP70	ζ chain-Associated Protein of 70 kDa

Résumé

Identifier des marqueurs prédictifs de la réponse au traitement est un besoin majeur dans la prise en charge de la polyarthrite rhumatoïde (PR).

Les biothérapies, tels que les agents bloquant le TNF α , ont révolutionné l'évolution et le devenir fonctionnel des patients atteints de PR. Cependant, certains patients résistent aux agents bloquant le TNF α et nécessitent le passage vers une autre molécule laissant libre cours à la maladie de progresser au prix d'un traitement coûteux et potentiellement toxique. C'est pourquoi des marqueurs prédictifs de réponse sont indispensables avant la mise en route de ces traitements.

Dans le but d'identifier des marqueurs de réponse et de comprendre les mécanismes synoviaux impliqués dans la résistance aux agents bloquant le TNF α , nous avons réalisé, en utilisant des micropuces de haute densité, des analyses transcriptomiques sur du tissu synovial provenant de 25 patients atteints de PR, résistants aux traitements de fond, avant et après 3 mois de traitement par adalimumab, un agent bloquant le TNF α . Nous avons observé une signature de non réponse au traitement caractérisée par une surexpression de gènes impliqués essentiellement dans la prolifération cellulaire et la réponse immunitaire. Nous avons confirmé nos résultats, soit en réalisant des mesures d'expression synoviale de certains de ces gènes par RT-PCR en temps réel, soit en réalisant des quantifications de marquages immunohistochimiques des biopsies synoviales de l'ensemble des 25 patients.

Ensuite, nous avons démontré *in vitro* par RT-PCR en temps réel, qu'un panel de gènes appartenant à la signature de non réponse au traitement, impliqué dans la prolifération cellulaire (*Ki67*, *CDC2*, *GTSE1*) ou la réponse immunitaire (*IL-7R α* , *IL-6*, *IDO*), pouvait être induit par des cytokines inflammatoires (TNF α ou IL-1 β) ou par des combinaisons de ces cytokines (TNF α et d' IL-1 β , ou de TNF α et d'IL-17) dans le RAFLS (*Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like-synoviocyte*) suggérant que ces cytokines (ou leur combinaison) participent aux mécanismes de résistance aux agents bloquant le TNF α .

Puis, nous nous sommes intéressés à un des ces gènes en particulier, l'IL-7R α , d'une part car des travaux antérieurs de notre laboratoire avaient déjà démontré qu'il appartenait à la signature de la PR et d'autre part puisque nous l'avons identifié comme un gène de non réponse au traitement par adalimumab.

Nous avons découvert que *in vitro* les RAFLS sont capables de produire deux formes d'IL-7R, une forme membranaire et une forme soluble (IL-7Rs) qui est le résultat d'un épissage alternatif du gène. Le TNF α et l'IL-1 β , seul ou en combinaison (ou la combinaison de TN α et d'IL-17) augmentent la production de l'IL-7Rs dans les RAFLS. Nous avons également montré que l'IL7Rs joue un rôle inhibiteur sur l'activation des lymphocytes T CD4 synoviaux.

Enfin, nous avons détecté l'IL-7Rs dans le sérum de patients contrôles et atteints de PR. Des taux élevés d'IL-7Rs sériques sont observés dans la PR ainsi que chez les patients réfractaires aux agents bloquant le TNF α suggérant que l'IL-7Rs pourrait être un marqueur prédictif d'une non réponse aux agents bloquant le TNF α .

Summary

The identification of new markers of response to therapy is a major medical need in the care of patients with rheumatoid arthritis (RA).

The introduction of TNF blocking agents in the therapy of RA patients resulted in a dramatic improvement in terms of disease course and functional outcomes. However, 30% of the patients do not respond to the drugs, and require alternative therapies. This results in disease progression in these very patients and unnecessary exposure to a costly, and potentially toxic, drug. There is therefore a need of markers predicting response to TNF blockade in RA.

In order to understand the mechanisms of action of TNF blockade in the RA synovium, and identify potential markers of response to therapy, we performed high-density transcriptomic studies using synovial biopsies of 25 methotrexate-resistant RA patients, obtained before and 3 months after initiation of adalimumab therapy (an anti-TNF α blocking antibody).

We found that genes involved in “cell proliferation” and “regulation of immune responses” pathways are significantly over-expressed at baseline in synovial biopsies of patients displaying a poor-response to TNF blockade compared to patients displaying a good- or a moderate-response to the drug. These results were confirmed by RT-PCR and immunostaining experiments.

We next studied the regulation of the expression of a panel of those genes associated with poor-response to TNF blockade : genes involved in cell proliferation (*Ki67*, *CDC2*, *GTSE1*) and genes involved in the regulation of immune responses (*IL-7R α* , *IL-6*, *IDO*). We found that they are induced in vitro in fibroblast-like synovial cells by the addition of TNF- α , IL-1 β and additive or synergistic combinations of TNF α and IL-1 β or TNF α and IL-17, thereby suggesting that these cytokines, or combinations of cytokines, play a role in the resistance to TNF blockade in RA.

Next, we focused on one particular gene, encoding the IL-7R α molecule. In our previous work, we described that over-expression of this gene is characteristic of the RA synovium. Here, we found that over-expression of the gene predicts poor-response to TNF blockade in RA.

We found that RAFLS produce two isoforms of the IL-7R α transcript : one full-length, and one soluble form (sIL-7R), which results from an alternative splicing of the gene. TNF α and IL-1 β , alone or in combination, (or the combination of TNF α and IL-17) induce the expression of sIL-7R in RAFLS. We also demonstrated that sIL-7R plays an inhibitory role on the activation of synovial CD4 T cells.

Finally, we detected sIL-7R in sera of controls and RA patients. Higher sIL-7R serum concentrations are found in RA patients, in particular in patients who will not respond to TNF blockade, thereby suggesting that serum levels of the protein could be a novel marker of response to TNF blockade in RA.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	7
Liste des abréviations	13
Résumé.....	15
Summary	16
TABLE DES MATIERES.....	19
INTRODUCTION.....	23
1. Généralités	25
2. Diagnostic	26
2.1. Critères ACR 1987 et nouveaux critères de classification 2010.....	26
2.2. Biomarqueurs de diagnostic	27
2.2.1. Marqueurs inflammatoires	28
2.2.2. Autoanticorps.....	28
2.2.2.1. Facteurs Rhumatoïdes.....	28
2.2.2.2. Anticorps anti-peptide cyclique citrulliné (anti-CCP).....	28
3. Étiologie et facteurs de risque	31
3.1. Les facteurs génétiques.....	31
3.1.1. Gènes HLA.....	31
3.1.2. Gènes non HLA.....	31
3.2. Autres facteurs	32
4. Physiopathologie de la PR.....	35
4.1. Membrane synoviale et synovite rhumatoïde	35
4.2. Les acteurs cellulaires de la synovite rhumatoïde	39
4.2.1. Les macrophages	39
4.2.1.1. Généralités et importance du macrophage dans la PR.....	39
4.2.1.2. Activation des macrophages synoviaux	39
4.2.1.3. Rôles du macrophage dans la PR	40
4.2.1.3.1. Cellule « inflammatoire »	40
4.2.1.3.2. Cellule présentatrice d'antigène	40
4.2.1.4. Activation via des molécules de co-stimulation	41
4.2.1.5. Blocage de la co-stimulation entre CPA et lymphocytes T activés	41
4.2.2. Lymphocytes T	42
4.2.2.1. Synovite rhumatoïde, clones de lymphocytes T et autoréactivité.....	42
4.2.2.1.1. Oligoclonalité des cellules T autoréactives	42
4.2.2.1.2. Autoantigènes	43
4.2.2.2. Les différentes populations lymphocytaires T CD4+ dans la PR.....	43
4.2.2.2.1. Les lymphocytes T _H 1 / T _H 2	43
4.2.2.2.2. La Polyarthrite Rhumatoïde : maladie T _H 1 ?	44
4.2.2.3. Les lymphocytes T _H 17	45
4.2.2.3.1. Cellules T _H 17 : généralités	45
4.2.2.3.2. Rôle des T _H 17	46
4.2.2.4. Les lymphocytes T régulateurs (Treg)	48
4.2.2.4.1. Généralités.....	48
4.2.2.4.2. Rôle des Treg dans l'arthrite	48
4.2.3. Lymphocytes B	49
4.2.3.1. Rôle du lymphocyte B dans la PR.....	49
4.2.3.1.1. Production d'autoanticorps	49
4.2.3.1.2. Cellule présentatrice d'antigènes pour les cellules T.....	49
4.2.3.1.3. Sécrétion de cytokines.....	49
4.2.3.1.4. Rôle dans le maintien des organisations lymphoïdes	49
4.2.3.2. Thérapeutiques anti-lymphocytes B dans la PR.....	50
4.2.4. Le « RAFLS ».....	51
4.2.4.1. Activation des RAFLS	51
4.2.4.2. Phénotype agressif et invasif du RAFLS.....	51

4.2.4.2.1.	Caractère hyperplasique du RAFLS	51
4.2.4.2.2.	Caractère invasif et destructeur du RAFLS	52
4.2.4.2.3.	Caractère migrateur du RAFLS	53
4.2.4.2.4.	Caractère inflammatoire du RAFLS	53
4.2.4.2.5.	Rôle de cellule présentatrice d'antigène	54
4.2.4.3.	Moyens d'étude du RAFLS	54
4.3.	Cytokines de la synovite rhumatoïde	55
4.3.1.	Le TNF α et son récepteur	55
4.3.1.1.	Le TNF α	55
4.3.1.2.	Les récepteurs du TNF α : TNFRI et TNFRII	55
4.3.1.3.	La signalisation TNF α /TNFRI et TNF α /TNFRII	56
4.3.1.4.	Le rôle du TNF α dans la Polyarthrite	57
4.3.1.5.	Le blocage du TNF α	57
4.3.2.	L'IL-6 et son récepteur	59
4.3.2.1.	L'IL-6	59
4.3.2.2.	Les récepteurs de l'IL-6	59
4.3.2.3.	La signalisation de l'IL-6/IL-6R	59
4.3.2.4.	Activité de l'IL-6 et rôle dans la PR	60
4.3.2.4.1.	Effets systémiques	60
4.3.2.4.2.	Effets immunologiques	60
4.3.2.4.3.	Effets locaux sur la synoviale, l'os et l'articulation	61
4.3.2.5.	Le blocage de l'IL-6/IL-6R	61
4.3.3.	L'IL-1 et son récepteur	63
4.3.3.1.	Famille de l'IL-1	63
4.3.3.2.	Les récepteurs de l'IL-1	63
4.3.3.3.	Signalisation de l'IL-1/IL-1R	64
4.3.3.4.	Activités biologiques de l'IL-1	64
4.3.3.5.	L'IL-1 dans la PR	65
4.3.3.6.	Blocage de l'IL-1	65
4.3.4.	L'IL-17 et son récepteur	67
4.3.4.1.	Découverte, description et structure	67
4.3.4.2.	Famille de l'IL-17	67
4.3.4.3.	Famille des IL-17R	67
4.3.4.4.	Présence de l'IL-17 et de son récepteur dans la PR	68
4.3.4.4.1.	Modèle murin	68
4.3.4.4.2.	Rôle de l'IL-17 sur les FLS et les macrophages	68
4.3.4.4.3.	Rôle de l'IL-17 dans la dégradation ostéocartilagineuse	69
4.3.4.4.4.	Blocage de l'IL-17	69
5.	Évolution et Mesure d'activité de la PR	71
6.	Traitement de la PR	75
OBJECTIFS		79
RESULTATS		83
1. Première publication		85
2. Deuxième publication		101
DISCUSSION		113
1. Marqueurs de réponse aux anti-TNF α		117
1.1. Biomarqueurs démographiques, cliniques ou radiologiques		117
1.2. Biomarqueurs sanguins		117
1.2.1. Marqueurs inflammatoires et auto-anticorps: CRP, FR, anti-CCP		117
1.2.2. Autres marqueurs biologiques		118
1.3. Biomarqueurs identifiés par la pharmacogénétique		119
1.4. Biomarqueurs identifiés par la pharmacogénomique		119
1.4.1. Analyses protéomiques		119
1.4.2. Analyses transcriptomiques		120
1.4.2.1. Analyses transcriptomiques sur sang		120
1.4.2.2. Analyses transcriptomiques synoviales		121

1.4.2.2.1. Analyses des populations cellulaires synoviales	123
1.4.2.2.2. Analyse transcriptomique synoviale.....	123
2. Que signifie la signature moléculaire identifiée chez les mauvais répondeurs aux agents bloquants le TNFα ?	127
2.1. Effets des anti-TNF dans la synoviale	127
2.2. Signature moléculaire prédictive d'une non réponse	128
2.3. Perspectives	130
3. Rôle de l'IL-7Rs dans la physiopathologie de la PR	131
3.1. IL-7/IL-7R α	132
3.1.1. IL-7	132
3.1.2. IL-7R α et signalisation IL-7/IL-7R	132
3.1.3. Fonctions IL-7/IL-7R	134
3.1.4. Régulation de l'IL-7R α et rôle dans les maladies auto-immunes	134
3.2. IL-7/IL-7R dans la PR.....	135
3.2.1. IL-7 et IL-7R α dans le sang et l'articulation.....	135
3.2.2. Rôle de l'IL-7 dans la synovite	135
3.3. L'IL-7Rs: un nouvel acteur de la PR	136
3.3.1. L'IL-7Rs : marqueur d'activation des RAFLS	136
3.3.2. L'IL-7Rs: un inhibiteur de l'IL-7 ?	137
3.3.3. Blocage de l'IL-7R : un intérêt thérapeutique dans la PR ?	137
BIBLIOGRAPHIE	139

INTRODUCTION

INTRODUCTION

1. Généralités

La Polyarthrite Rhumatoïde (PR) est une maladie chronique inflammatoire caractérisée par des douleurs, des gonflements et des déformations articulaires responsables à court ou à long terme d'une impotence fonctionnelle et potentiellement d'une mortalité prématurée. Il s'agit du rhumatisme inflammatoire le plus fréquent (0,2 à 1% de la population), de prédominance féminine (ratio de 2:1 à 4:1) et survenant le plus souvent entre 30 et 55 ans (1-4). Son étiologie en est encore inconnue, cependant cette pathologie auto-immune est décrite pour être multifactorielle. Son évolution est capricieuse. Un diagnostic précoce et une mise en route d'un traitement efficace sont indispensables pour préserver le devenir structurel et fonctionnel du patient.

Le pronostic de la PR s'est vu remarquablement amélioré depuis l'arrivée des biothérapies qui ont révolutionné la prise en charge de la plupart des patients. Les biothérapies les plus utilisées en première intention à ce jour sont les agents bloquant le TNF α . Cependant, certains patients peuvent encore échapper à leur effet nécessitant le passage vers d'autres molécules biologiques.

Il existe un important besoin médical (individualisation des décisions thérapeutiques) et pharmaco-économique (prix élevé des biothérapies) à identifier les patients répondeurs des patients non-répondeurs aux agents bloquant le TNF α , avant l'instauration du traitement. Au cours de cette thèse, nous avons identifié de tels marqueurs sur base d'études transcriptomiques réalisées dans le tissu synovial de malades, et nous avons montré comment ils sont indicateurs de potentiels mécanismes de résistance à ces traitements.

Nous allons au cours de cette introduction décrire les bases nécessaires dans l'approche diagnostique, physiopathologique, et thérapeutique de la PR et ce, afin de comprendre les objectifs et les résultats de mes travaux. Comme nous le verrons, ces marqueurs seront impliqués essentiellement dans la régulation des processus immunitaires (cytokines et récepteurs de cytokines) et dans des processus de prolifération cellulaire, justifiant la raison pour laquelle nous insisterons essentiellement sur l'implication de ces processus dans la synovite rhumatoïde. Dans la discussion, nous montrerons comment les marqueurs que nous avons identifiés se démarquent par rapport à la littérature, et envisagerons diverses perspectives ouvertes par nos travaux.

2. Diagnostic

2.1. Critères ACR 1987 et nouveaux critères de classification 2010

Le diagnostic de la PR repose sur des critères établis et revisités en 1987 par l'ACR (pour *American College of Rheumatology*) (5), basés sur des observations cliniques, biologiques, et radiologiques (*Tableau 1*). La présence de 4 de ces critères permet de diagnostiquer une PR avec une sensibilité de $\pm 80\%$ et une spécificité de $\pm 90\%$ (6).

- Critères cliniques :
 - **Raideur matinale** (articulaire ou périarticulaire) d'au moins une heure ;
 - **Arthrite** d'au moins **3** articulations (gonflement simultané, observé par un médecin par hypertrophie des tissus mous ou épanchement hors hypertrophie osseuse, sur 14 sites articulaires possibles: interphalangiennes proximales, métacarpophalangiennes, poignets, coudes, genoux, chevilles, métatarsophalangiennes);
 - Arthrite touchant la **main** (parmi les sites concernés: les poignets, les métacarpophalangiennes et interphalangiennes proximales);
 - Arthrite **symétrique**;
 - *Ces critères doivent exister depuis au moins 6 semaines*
 - Il s'y ajoute un autre critère clinique, celui relatif à la présence de **nodules rhumatoïdes** définis comme des nodules sous cutanés par un médecin, sauf ceux situés sur les crêtes osseuses, les faces d'extension ou péri-articulaires.
- Critère biologique :
 - Présence de **facteur rhumatoïde** à titres élevés par toute technique donnant un résultat positif chez moins de 5 % de la population normale.
- Critère radiologique :
 - Présence de lésions typiques de la PR sur les radiographies des mains et des poignets, paume contre plaque : **érosions** osseuses ou **déminéralisation en bande**.

Tableau 1. Critères de classification de la PR proposés par l'ACR (1987).

La maladie articulaire pour être classée de PR doit satisfaire à au moins 4 de ces 7 critères (5).

Cependant, il est rapidement apparu que ces critères ne suffisent pas pour la détection de maladie articulaire précoce puisque certains d'entre eux sont déjà la preuve d'une maladie bien installée avec des conséquences structurelles irréversibles (ex: présence d'érosions osseuses radiologiques). En phase débutante de la maladie, ces critères sont d'ailleurs moins performants et voient leur sensibilité diminuer à 77% et leur spécificité à 77% (6).

C'est pourquoi, ont été décrits ces dernières années, de nouveaux critères de classification 2010, (*Tableau 2*), résultat d'une collaboration américano-européenne (ACR / EULAR pour *European League Against Rheumatism*) (7-9) élaborés pour identifier les patients avec une PR débutante justifiant l'introduction précoce d'un premier traitement de fond.

Score Critères d'éligibilité:

- 1) Avoir au moins 1 articulation avec synovite clinique (gonflement)
- 2) En l'absence de tout autre diagnostic pouvant expliquer la synovite

Un score $\geq 6/10$ est requis pour retenir le diagnostic de PR

A. Atteinte articulaire	
1 grosse articulation	0
2-10 grosses articulations	1
1-3 petites articulations (avec ou sans grosses articulations)	2
4-10 petites articulations (avec ou sans grosses articulations)	3
> 10 articulations (dont au moins 1 petite articulation)	5
B. Sérologie (au moins 1 test nécessaire)	
FR négatif et ACPA négatif	0
Faible positivité (FR ou Anti-CCP)	2
Forte positivité (FR ou Anti-CCP)	3
C. Syndrome inflammatoire (au moins 1 test nécessaire)	
CRP normale et VS normale	0
CRP anormale ou VS anormale	1
D. Durée des symptômes	
< 6 semaines	0
≥ 6 semaines	1

Tableau 2 : Nouveaux critères de classification EULAR/ACR 2010 de la PR.

De nouveaux critères de classification pour la PR ont été élaborés par un groupe d'expert de l'ACR et de l'EULAR dans le but de dépister le plus tôt possible des PR débutantes et d'étudier l'efficacité de traitements de la PR à un stade plus précoce de la maladie. L'objectif final est donc un diagnostic précoce et une meilleure prise en charge de la PR liée à l'évolution des biothérapies disponibles et le manque de sensibilité des anciens critères de classification ACR (1987) notamment pour les PR débutantes. Ces critères nécessitent encore d'être validés dans des études afin de pouvoir les utiliser prochainement comme critères de diagnostic de la maladie. Les patients doivent présenter au moins une synovite qui ne peut être dû à une autre pathologie (goutte, lupus, arthrite psoriasique). Ensuite en comptabilisant divers items basés sur l'atteinte articulaire, la biologie, la présence d'autoanticorps et la durée des symptômes, un score sur 10 est établi. Si ce score est supérieur ou égal à 6, le patient est classé pour avoir une PR. L'atteinte articulaire concerne la douleur ou le gonflement articulaire à l'examen clinique mais dont la synovite doit être démontrée par imagerie. L'atteinte des interphalangiennes distales, des premières carpométacarpiennes et des premières métatarsophalangiennes est exclue des sites articulaires explorés. Les grosses articulations concernent les épaules, les coudes, les hanches, les genoux et les chevilles. Les tests négatifs des autoanticorps signifient que les valeurs mesurées (en Unités Internationales) doivent être inférieures ou égales à la normale pour le test utilisé. Une faible positivité est considérée comme supérieure aux valeurs normales mais inférieure ou égale à 3x les valeurs normales. (VS=vitesse de sédimentation, CRP=C-Reactive protéine, Anti-CCP=anti-peptide cyclique citrulliné, FR=Facteur Rhumatoïde) (8).

2.2. Biomarqueurs de diagnostic

Bien qu'il n'existe à l'heure actuelle aucun marqueur sérologique spécifique de la maladie, certains paramètres biologiques peuvent aider au diagnostic comme les marqueurs inflammatoires ou la présence d'autoanticorps.

2.2.1. Marqueurs inflammatoires

Maladie impliquant la production de cytokines pro-inflammatoires, il est très fréquent que la PR s'accompagne, surtout lorsqu'elle est active, mal contrôlée ou lors d'une poussée, d'une élévation des paramètres biologiques de l'inflammation comme la vitesse de sédimentation (VS) et la C-Reactive protéine (CRP). Ces paramètres comme nous le verrons plus tard seront d'ailleurs utilisés dans les mesures d'activité de la maladie.

2.2.2. Autoanticorps

Contrairement à d'autres maladies autoimmunes, où la plupart des autoantigènes et leur rôle dans la maladie ont été caractérisés, les autoantigènes dans la PR sont encore peu connus. Il est possible, mais non prouvé, qu'il existe des autoantigènes primaires, responsables de l'initiation de la maladie, et des autoantigènes secondaires, résultant de l'exposition de néo-épitopes suite à la destruction articulaire. Il est également possible que plusieurs sets différents d'autoantigènes se retrouvent chez les patients souffrant de PR. Des autoanticorps dirigés contre divers autoantigènes (ex: composants du cartilage, protéines nucléaires ou protéines citrullinées) sont décrits dans la PR sans que l'on sache exactement à ce jour leur rôle pathogénique (10, 11). Néanmoins, les plus couramment utilisés en routine clinique dans la PR sont les facteurs rhumatoïdes (FR) et les anticorps anti-peptide cyclique citrulliné (Anti-CCP) (12).

2.2.2.1. Facteurs Rhumatoïdes

Les FR sont des anticorps (le plus souvent IgM) dirigés contre la portion Fc des immunoglobulines IgG (Waalers en 1940 et par Rose en 1948), utilisés comme critère de diagnostic de la PR. Cependant, ils manquent de spécificité dans la maladie puisqu'ils peuvent être présents chez des personnes saines (5%). Leur fréquence augmente naturellement avec l'âge et leur prévalence dans de nombreuses autres pathologies indique qu'ils peuvent être la simple conséquence d'une activation polyclonale des lymphocytes B (12-14).

2.2.2.2. Anticorps anti-peptide cyclique citrulliné (anti-CCP).

Les Anti-CCP, ou encore appelés anticorps dirigés contre des protéines citrullinées (ACPA), identifiés plus tard, sont des marqueurs plus spécifiques de la PR. Décrits depuis les années '60 par différentes équipes, comme des anticorps dirigés contre des protéines spécifiques chez les patients atteints de PR, divers noms leur ont été attribués : anticorps anti-périnucléaires (15), anti-kératine (16), anti-filaggrine (17, 18), anti-Sa (19) . En 1998, Schellekens et al observent que ces anticorps reconnaissent des peptides dits citrullinés (20). La citrullination est un processus de déimination post-traductionnelle caractérisé par le remplacement d'un acide aminé (arginine) par un autre (la citrulline) et lié à l'activité d'enzymes peptidyl arginine déiminases (PAD). Dans la PR, plusieurs protéines pouvant être citrullinées par les enzymes PAD2 et PAD4 synoviales (21) ont été identifiées (par ex: vimentine, fibrinogène, collagène de type II et l' α -enolase) pour être des autoantigènes potentiels pour ces anticorps particulièrement lors de présentation par des molécules HLA de classe II (22). Hill et al ont montré que certains allèles HLA-DR4 se lient préférentiellement à la citrulline de peptide et non à l'arginine, et que des souris transgéniques pour l'allèle HLA-DRB1*0401 peuvent être immunisées et produire des cellules T spécifiques contre des peptides citrullinés. Nous verrons plus tard qu'il existe une prédisposition génétique à la PR

liée à certains allèles HLA de classe II, en particulier, HLA-DRB1. Ces allèles partagent une séquence d'acides aminés appelée « épitope partagé » (EP) qui formerait une poche d'ancrage pour les peptides potentiellement impliqués dans l'activation de lymphocytes T CD4 autoréactifs. Lors de la citrullination des protéines, celles-ci perdent une charge positive et peuvent dès lors s'ancrer plus facilement aux molécules HLA chez les patients porteurs de l'épitope partagé (23).

Pour l'anecdote, d'autres facteurs notamment environnementaux (ex: le tabac) ou infectieux (ex: la périodontite chronique à *Porphyromonas Gingivalis*) ont été décrits pour favoriser le développement d'anticorps anti-CCP, par leur influence sur le processus de citrullination des protéines, mais nous en reparlerons plus tard (24, 25) .

De manière générale, la détection des anticorps anti-CCP est un bon outil diagnostique pour dépister la PR avec une bonne sensibilité (65-75%) et une très bonne spécificité (90-95%) (26). Récemment la présence des ces anticorps a été intégrée dans la description des nouveaux critères de classification de la PR (7). Certains auteurs ont même démontré qu'ils pouvaient être prédictifs du développement de la maladie ou associés à des maladies plus sévères ou érosives (27).

3. Étiologie et facteurs de risque

L'étiologie de la PR reste toujours inconnue à ce jour, mais l'on s'accorde à dire qu'il s'agit d'une maladie multifactorielle qui résulte de l'interaction de différents facteurs génétiques, environnementaux, infectieux ou hormonaux. .

3.1. Les facteurs génétiques

Les études familiales et de jumeaux ont permis de constater l'importance des contributions génétiques par l'étude du risque relatif de développer la maladie dans la famille d'un patient ou des taux de concordance entre jumeaux homozygotes et dizygotes. La prévalence de la maladie chez un membre apparenté au premier degré d'un patient atteint de PR peut aller de 2 à 12% c'est-à-dire 2 à 10 x plus que dans la population générale (28, 29). Le taux de concordance est approximativement de 15 % chez des jumeaux homozygotes c'est-à-dire 5 fois plus que chez des jumeaux dizygotes (30, 31).

Les études génétiques chez l'homme de type GWAS (*Genome-Wide Association Studies*), et l'approche de gènes-candidats ont permis d'identifier à ce jour plus de 30 loci de susceptibilité impliqués dans la PR en distinguant les gènes HLA (*Human Leucocyte antigen*) et non-HLA (32).

3.1.1. Gènes HLA

L'association avec l'HLA-DR dans la physiopathologie de la PR réside dans le fait que plusieurs allèles HLA-DR de prédisposition codent pour une séquence homologue d'acides aminés (motif Q(K/R)RAA, pour *Q*: Glutamine, *K*: Lysine, *R*: arginine, *A*: Alanine) situés en position 70-74 (correspondant à la 3ème partie de la région hypervariable de la chaîne DRB1) qui est commune à plusieurs allèles du système HLA DR1 et DR4 (HLA-DRB1 *0401, *0404, *0405, *0408, *0101, *0102, *1001 et *1402). Cette séquence d'acides aminés (appelée épitope partagé ou EP) est située dans la région impliquée dans la liaison aux peptides antigéniques, suggérant qu'elle joue un rôle critique dans l'activation de lymphocytes T autoréactifs (33-37). Cependant, le locus HLA ne semble contribuer que pour 30 à 50% de la susceptibilité génétique à la PR laissant supposer qu'il existe d'autres facteurs génétiques de susceptibilité non-HLA (31, 38) .

3.1.2. Gènes non HLA

De manière générale, le risque relatif de développer la maladie lié aux gènes non-HLA est faible (1,3 à 1,5) et bien qu'ils aient été confirmés dans des études indépendantes, leur association avec la PR (à la différence des gènes HLA) n'est pas universelle (39) et ne semble être présente que dans certaines ethnies (*PTPN22* surtout chez les caucasiens et non chez les asiatiques (40, 41), *CTLA-4* chez les caucasiens (42), *PADI4* chez les asiatiques (43). Par ailleurs, d'autres gènes candidats, comme le gène *TNF α* , se situent à proximité du locus HLA au niveau de 6p21. Mais à cause des déséquilibres de liaison, il n'est pas toujours facile d'isoler le rôle de ces gènes parmi ceux des gènes HLA qui leur sont proches.

A ce jour, une trentaine de gènes (32) sont validés pour être associés à la PR, mais seuls quelques uns ont un variant fonctionnel dont le rôle dans la maladie a bien été investigué (par ex: polymorphisme de *PTPN22* (44), polymorphisme de *PADI4* (45) ou encore *STAT4* (46), *C5/TRAFl*, *TNFAIP3* (47), *CTLA-4* (48) et *TNFRll* (49) (Tableau 3).

3.2. Autres facteurs

D'autres facteurs environnementaux ou infectieux sont décrits pour intervenir dans le développement ou le maintien de la PR. Parmi les facteurs environnementaux, le tabac est le plus rapporté. Cependant, il ne semble concerner que les patients avec une PR séropositive pour les anti-CCP (50). Le risque semble être augmenté en fonction de la durée et la quantité de tabac. Une relation entre génétique et environnement a été démontrée pour ce facteur. En effet, la coexistence de 2 copies de l'allèle HLA-DRB1*EP et du tabagisme majorent le risque (21x) de développer une PR séropositive pour les anti-CCP par rapport aux patients EP négatif et qui ne fument pas (51, 52).

Des facteurs infectieux ont également été évoqués. La mise en évidence d'ADN de bactéries et de virus dans la synoviale de PR a fait suspecter un rôle microbien dans le développement ou l'entretien de la maladie par différents mécanismes: mimétisme moléculaire, activation des *Toll-like* récepteurs (TLR), ou plus récemment dans l'induction d'autoantigènes citrullinés. Plus récemment, des agents pathogènes de la sphère buccale ou de la flore intestinale ont été décrits pour être impliqués dans l'étiologie de la PR. La parodontite liée à *Porphyromonas Gingivalis* est rapportée par certains auteurs pour être plus fréquente dans la PR et semble être favorisée par le tabac et l'allèle HLA-DRB1*EP. *P. Gingivalis* dont l'ADN est souvent trouvé dans la synoviale des patients avec une PR possède une activité enzymatique bactérienne de type peptidyl arginine déiminase capable de citrulliner les protéines et induire des autoantigènes différents (α -enolase citrullinée par exemple) (53). Les taux d'anti-CCP sont considérablement plus élevés chez les malades atteints de PR et de parodontite suggérant ainsi leur contribution à la pathogénèse de la PR (54).

	Région chromosome	Polymorphisme	Protéine	Fonction	Particularité
PTPN22 (40, 41, 55)	1p13.2	rs2476601 substitution C/T en position 1858 (-R620W-)	<i>Protéine tyrosine phosphatase non-receptor 22</i> Tyrosine phosphatase intracellulaire spécifique de lymphocyte	Rôle de rétrocontrôle négatif sur la transmission du signal induit par le TCR. En présence du polymorphisme de susceptibilité, les T autoréactifs échappent à la délétion clonale dans le thymus	Variant à risque observé dans de nombreuses populations principalement caucasiennes (et non asiatiques)- PR séropositive ou non pour les anti-CCP. Polymorphisme de ce gène impliqué dans d'autres maladies auto-immunes.
PADI4 (43, 56)	1p36.13	rs2240340 (intron)	<i>Peptidyl arginine deiminase type IV</i>	Enzyme impliquée dans le processus de citrullination des protéines	Facteur de susceptibilité restreint aux populations asiatiques. Des méta-analyses montrent qu'un variant de PADI4 est associé à la PR et plus fréquemment chez les asiatiques. PR séropositive pour les anti-CCP
STAT4 (45, 46)	2q32.2	rs7574865 (intron)	<i>Signal Transducer and activator of transcription 4</i> Facteur de transcription.	Rôle dans la signalisation de récepteurs aux cytokines (incluant IFN de type I, IL-12 et IL-23)	Population asiatique et européenne. Également associé au risque de lupus érythémateux disséminé.
Locus C5/TRA1 (40, 47)	9q33.2	Région à l'intersection des 2 gènes Pas d'allèle fonctionnel connu rs108184088	C5: <i>complément C5</i> TRA1: <i>TNF receptor associated factor 1</i>	Protéine intracellulaire jouant un rôle dans la transduction du signal des récepteurs de type II du TNF α	PR séropositive pour les anti-CCP.
CTLA4 (42)	2q33.2	rs3087243	<i>Cytotoxic Lymphocyte-associated 4 protein</i>	Protéine co-stimulatrice exprimée à la surface des lymphocytes T qui joue un rôle de régulation de la réponse immune en inhibant l'activation du lymphocyte T.	Population européenne et non asiatique Polymorphisme associé à d'autres maladies auto-immunes

Locus <i>TNFAIP3/OLIG3</i> (47, 57)	6q23.3	rs10499194 rs6920220	SNP entre les gènes encodant pour <i>oligodendrocyte lineage transcription factor 3</i> et <i>TNFα-induced protein 3</i>	Implication dans la signalisation du TNFR et de la voie de NF κ B	PR séropositive pour les anti-CCP.
<i>CD40</i> (42)	20q12- q13.2	rs4810485	Molécule CD40 ou <i>TNF receptor superfamily member 5</i> Protéine de la superfamille du TNFR	Implication dans la co-stimulation cellulaire. CD40 est exprimé à la surface des CPA et des lymphocytes B qui se lie au CD40 ligand des lymphocytes T	PR séropositive pour les anti-CCP.
<i>IRF5</i> (58, 59)	7q32	rs2004640	<i>Interferon regulatory factor 5</i>	Implication dans la régulation de gènes activés par les interférons de type I	PR séropositive ou séronégative pour les anti- CCP Phénotype non érosif Associés à d'autres maladies autoimmunes
<i>TNFR2</i> (49)	1p36		Récepteur II du TNF α	Rôle dans la signalisation du TNF α	Discussion sur des polymorphismes fonctionnels (196R) impliqués dans la réponse aux traitements ou aux taux circulants de sTNFR

Tableau 3. Gènes non-HLA décrits pour être associés à la PR

Nous avons repris dans ce tableau les différents gènes non-HLA décrits pour être associés à la PR parmi une trentaine de loci identifiés à ce jour (32). L'association n'est cependant pas universelle et la présence des auto-anticorps semble être plus fréquente avec certains d'entre eux. Pour certains de ces gènes, il est observé des variants fonctionnels impliqués dans le développement, la physiopathologie, l'activité ou la sévérité de la maladie voir même de la réponse aux traitements. *TCR* : récepteur des cellules T, *anti-CCP*: anticorps anti-peptide cyclique citrulliné, *PR*: polyarthrite rhumatoïde, *IFN- γ* : interféron gamma, *IL-12*: interleukine-12, *IL-23*: interleukine-23, *NF- κ B*: nuclear factor kappa B, *TNF α* : facteur de nécrose tumorale, *TNFR*: récepteur du TNF α , *CPA*: cellules présentatrices d'antigènes, *sTNFR*: récepteur soluble du TNF α .

4. Physiopathologie de la PR

La polyarthrite rhumatoïde est principalement une maladie de la membrane synoviale. Normalement il s'agit d'un tissu quiescent de soutien avec des propriétés nutritionnelles et homéostatiques. Cependant dans la PR, elle sera le siège de modifications qui vont contribuer aux symptômes et à la destruction ostéocartilagineuse. Même si à ce jour, on n'en connaît pas l'origine, il est bien établi que les interactions entre certaines cellules, en particulier via les cytokines qu'elles produisent, ont un rôle fondamental dans le développement et l'entretien de la maladie.

4.1. Membrane synoviale et synovite rhumatoïde

La membrane synoviale est une structure de tissu cellulaire et conjonctif qui tapisse la capsule articulaire et qui s'attache aux marges des surfaces articulaires cartilagineuses et des structures osseuses. Elle produit le liquide articulaire qui a un rôle de lubrification et de nutrition du cartilage avasculaire, mais elle assure également l'élimination des débris. Paucicellulaire, elle est constituée de trois couches, la couche bordante ou intima (« lining layer »), la couche profonde ou subintima (« sublining layer ») et la sub-synoviale.

L'intima est composée de 1 à 4 assises de synoviocytes, cellules de surface qui s'entrelacent et forment un feutrage bordant l'intérieur de l'articulation: cette couche est avasculaire. Elle n'est pas considérée comme un épithélium ou un endothélium car il y manque des structures spécifiques d'adhésion telles des desmosomes, des jonctions serrées ou une membrane basale, bien qu'il semble que certaines molécules (ex : les cadhérines) jouent un rôle dans le maintien et l'adhésion de ces cellules.

La subintima quant à elle, est une couche vascularisée (contenant capillaires, artérioles et vaisseaux), cellularisée (50 % des cellules sont des synoviocytes, des mastocytes et des histiocytes, 30 à 50% sont des lymphocytes T, 5% des lymphocytes B et très peu de neutrophiles) et organisée, elle contient des fibres de collagène et de la substance fondamentale riche en mucopolysaccharides.

La subsynoviale est très peu cellularisée, elle contient quelques cellules conjonctives banales et des cellules adipeuses baignant dans la substance fondamentale, on peut parfois la confondre avec les éléments capsulo-ligamentaires sous-jacents.

On distingue dans l'intima et la subintima principalement deux types cellulaires de synoviocytes, le type A et le type B (60-62).

Les synoviocytes de type A ou synoviocytes de type macrophagiques (*macrophage-like synoviocyte*, MLS) sont des cellules phagocytaires dérivant de précurseurs myéloïdes de la moelle osseuse, caractérisées par un grand nombre de vacuoles et de lysosomes suggérant leur activité phagocytaire (63). Elles sont complètement différenciées et ont une faible capacité à proliférer. Comme les autres macrophages, elles aident à éliminer les débris cellulaires de l'espace articulaire et agissent comme sentinelles pour les rencontres bactériennes. Leur phénotype est similaire aux populations macrophagiques résidentes retrouvées dans d'autres tissus incluant l'expression de marqueurs membranaires habituellement associés à la lignée

macrophagique (CD11b, CD14, CD68, CD163, FcγR ainsi que des molécules HLA de classe II) (60, 64)

À la différence, les synoviocytes de type B ou synoviocytes de type fibroblastique (*Fibroblast-like synoviocyte* ou FLS) sont des cellules dérivant de précurseurs mésenchymateux qui sont ensuite renouvelés par division cellulaire au sein de la membrane synoviale. À l'inverse des MLS, les FLS n'ont pas de HLA de classe II en surface, n'ont pas de capacité phagocytaire et sont CD68 négatifs (64). Cependant il n'existe pas à ce jour de marqueur spécifique pour les identifier. On peut néanmoins les distinguer des autres fibroblastes par des fonctions qui leur sont propres et par leur importante capacité de synthèse de protéines (65, 66). Ainsi, ces cellules ont un appareil de Golgi très développé, un réticulum endoplasmique granuleux et de nombreuses vésicules de sécrétion, ce qui indique une activité métabolique très intense (61). Une des fonctions principales est d'assurer la protection et la nutrition de la cavité articulaire et du cartilage adjacent, de maintenir l'homéostasie articulaire par la sécrétion de protéines nutritives ou lubrifiantes dans la cavité articulaire comme l'hyaluronan ou la lubricine, et de contrôler également le volume synovial. Les FLS semblent jouer un rôle important dans la régulation du trafic leucocytaire par leur capacité à interagir avec les leucocytes car ils peuvent exprimer à leur surface des ligands impliqués dans la liaison avec d'autres cellules (CD44, VCAM-1 pour *vascular cell adhesion molecule-1*...) (67). Enfin, les FLS interviennent également dans le maintien de la structure et de l'architecture de la membrane synoviale notamment par l'expression de protéines membranaires comme les cadhérines qui assurent les adhésions intercellulaires du même type. La cadhérine-11 semble être principalement exprimée par les FLS de la synoviale et être essentielle à leur fonction architecturale. Les souris déficientes pour cette molécule présentent une membrane synoviale hypoplasique caractérisée par une désorganisation membranaire avec une absence de ségrégation entre la couche bordante et la couche profonde ainsi qu'une réduction du nombre de cellules et de la quantité de matrice extracellulaire (68).

Synovite rhumatoïde

Au cours de la polyarthrite rhumatoïde, la membrane synoviale est le siège d'une infiltration massive de cellules inflammatoires (lymphocytes B ou T, macrophages) pouvant parfois s'organiser en « structure folliculaire à centre germinatif » semblables à un organe lymphoïde secondaire, d'une néovascularisation de la subintima et d'une hyperplasie de la couche bordante liée à la prolifération des fibroblastes synoviaux. On assiste à la formation du « pannus synovial », véritable lésion « *tumoral-like* », siège de multiples interactions cellulaires, de production de médiateurs inflammatoires (cytokines et chémokines) et d'enzymes matricielles (metalloprotéases) qui envahit et détruit le cartilage et les structures osseuses adjacents. Toutes ces cellules ainsi que leurs interactions et les molécules qu'elles secrètent vont activement contribuer à la formation et l'entretien de la synovite rhumatoïde (60) (*Figure 1*).

Il n'est pas simple de décrire individuellement les différents acteurs cellulaires ou moléculaires de la synovite rhumatoïde à l'échelle individuelle. Nous allons cependant au cours de ce chapitre présenter dans une première partie les principaux types cellulaires impliqués dans la physiopathologie de la PR avec les macrophages, les lymphocytes T en particulier les T_H17, les lymphocytes B, et un nouveau phénotype du FLS propre à la PR, le RAFLS. Ensuite dans une deuxième partie, nous résumerons les effets des principales cytokines inflammatoires impliquées dans la PR qui font l'objet de thérapies ciblées disponibles ou en cours de l'être : le TNFα, l'IL-6, l'IL-1β et l'IL-17.

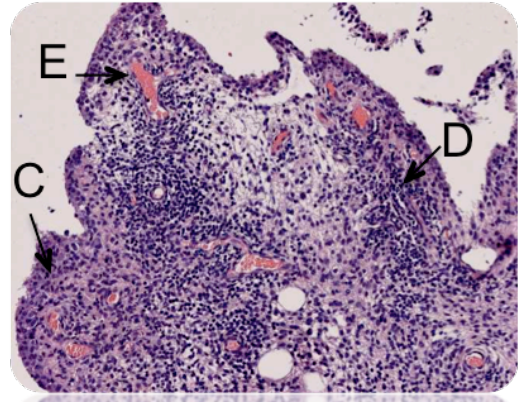
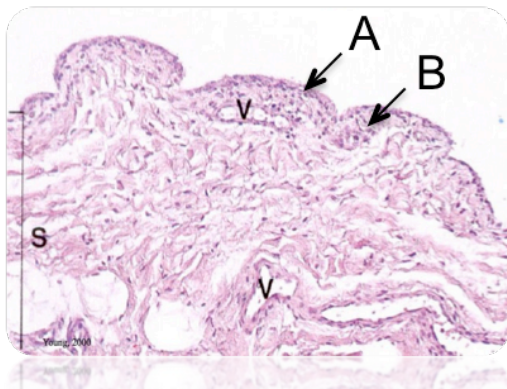


Figure 1. Membrane synoviale et synovite rhumatoïde

- 1) La membrane synoviale normale est composée d'une couche bordante (A) et d'une couche profonde (B) qui recouvrent la subsynoviale (S) constituée essentiellement de tissu conjonctif et de cellules adipeuses.
- 2) La synovite rhumatoïde se caractérise par une hyperplasie de la couche bordante (C), liée principalement à la prolifération des fibroblastes synoviaux, par une infiltration massive de cellules inflammatoires (lymphocytes T et B, macrophages) (D) dans la couche profonde qui sera le siège d'une importante néovascularisation (E).

Les acteurs cellulaires de la synovite rhumatoïde

4.1.1. Les macrophages

4.1.1.1. Généralités et importance du macrophage dans la PR

Les macrophages synoviaux peuvent avoir plusieurs origines. Ils peuvent provenir de monocytes circulants (CD14+) issus de cellules souches hématopoïétiques médullaires (CD34+) distribués dans la synoviale par extravasation et différenciés en macrophages synoviaux (CD68+) sous l'effet de facteurs de croissance (GM-CSF pour *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* par ex.) ou de cytokines environnantes (TNF α par ex.) ou être issus de cellules résidentes (69, 70).

Les macrophages de la synoviale ont un rôle physiologique essentiel d'homéostasie articulaire (élimination des débris cellulaires par exemple) et de défense contre les agents infectieux. Ils participent à l'immunité innée via les TLR (*Toll-like récepteurs*) ou à l'immunité adaptative par leur fonction de cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

Dans la synovite rhumatoïde, on observe une augmentation du nombre de macrophages synoviaux ainsi qu'une activation de ces cellules par différents facteurs (stimulations physiques, TLR, cytokines ou contact cellulaire). Elles semblent jouer un rôle important dans la maladie. Les macrophages synoviaux contribuent d'une part à amplifier la réponse inflammatoire par la production de diverses molécules effectrices ou régulatrices. Et d'autre part, ils activent d'autres cellules de la synovite, notamment les lymphocytes T, par leur fonction de cellules présentatrices d'antigène (71).

On décrit dans la PR une corrélation entre le degré d'infiltration des macrophages synoviaux (CD14+ dans la couche profonde et CD68+ dans la couche bordante) et les destructions ostéoarticulaires évaluées radiologiquement (72). Par ailleurs, la déplétion des macrophages observée dans la synoviale (CD68+ de la sublining) au cours de divers traitements de la PR, corrèle avec la réponse thérapeutique. Une observation ouvrant la porte à l'utilisation de CD68 comme indicateur précoce de la réponse au traitement (exemple : le MTX (73), les corticoïdes (74, 75) ou les anti-TNF α (76)).

4.1.1.2. Activation des macrophages synoviaux

L'activation du macrophage dans la PR peut être dépendante de stimuli extérieurs. Ce sont essentiellement des cytokines inflammatoires qui peuvent activer le macrophage synovial comme celles produites soit par le macrophage-lui-même agissant ainsi de manière autocrine : le TNF α , l'IL-1 β , MIF (pour *Macrophage migration inhibitory factor*), l'IL-15, l'IL-18, l'IL-23, l'IL-27, soit produites par les lymphocytes T activés : l'IL-2, l'IL-17 ou l'IFN γ . Des cytokines régulatrices (IL-4, IL-10 et IL-13) ou des hormones sont également décrites pour activer le macrophage (71, 77).

D'autres stimuli peuvent également activer les macrophages synoviaux via la voie des TLR par exemple, ce qui induit l'expression rapide de cytokines inflammatoires comme le TNF α , l'IL-8 (CXCL8) ou MCP-1 (pour *Monocyte chemoattractant protein-1* appelée aussi CCL2). TLR2 et TLR4, surexprimés dans la synoviale de PR (78), via leurs ligands respectifs (peptidoglycan-PG et liposaccharide-LPS), peuvent induire l'expression de TNF α par les macrophages du liquide synovial de PR (79). Des ligands endogènes de TLR2 (comme la

protéine de stress gp96) et TLR4 (comme la ténascine-C) sont d'ailleurs décrits pour être surexprimés dans la synoviale et contribuer ainsi à l'activation des macrophages (80). Des TLR endosomiaux comme TLR3 ou TLR7 sont également surexprimés dans la synovite rhumatoïde (81). Il est fort probable que les TLR, qui jouent un rôle important dans l'immunité innée, participent à l'initiation et/ou à l'entretien de la PR.. La suppression de cette voie pourrait être une approche thérapeutique future dans la PR (82).

Enfin, les macrophages peuvent être activés au contact direct d'autres cellules. En particulier, les lymphocytes T, ces cellules pré-activées peuvent induire au contact des macrophages, la production de $\text{TNF}\alpha$, d'IL-1 β ou d'IL-10 (83, 84). L'équipe de van Roon et al insiste sur le rôle de l'IL-7 dans la synoviale pour être un acteur important dans l'activation des cellules T CD4⁺ et des monocytes/macrophages, pour autant qu'il existe un contact entre ces cellules (85). Certaines molécules de surface semblent être impliquées dans cette interaction: CD69, LFA-1 ou ICAM-1, CD40 ligand, CD11b, CD45 ainsi que des formes membranaires de cytokines telles que celles du $\text{TNF}\alpha$, de l'IL-1 β , de l'IFN γ ou de l'IL-15 (83).

4.1.1.3. Rôles du macrophage dans la PR

Dans la PR, les macrophages synoviaux activés ont ainsi deux fonctions essentielles celle de cellule inflammatoire et celle de cellule présentatrice d'antigène.

4.1.1.3.1. Cellule « inflammatoire »

Les macrophages synoviaux sont principalement impliqués dans la physiopathologie de la PR par leur phénotype inflammatoire. Activés, ils participent à l'inflammation locale et systémique en devenant les sources principales de cytokines pro-inflammatoires (représentées essentiellement par le $\text{TNF}\alpha$ et l'IL-1 β , mais aussi l'IL-15, l'IL-18, l'IL-23..), ou de molécules régulatrices (le TGF β pour *Transforming Growth factor*, l'IL-10 ou l'IL-27) (71).

Nous décrirons plus tard les fonctions et caractéristiques essentielles des cytokines inflammatoires, tels que $\text{TNF}\alpha$, IL-6 et IL-1 β , principalement impliquées dans la PR pour jouer un rôle essentiel dans la maladie. Ces molécules font l'objet des principales biothérapies anticytokiniques à ce jour disponibles pour traiter la PR. D'autres cytokines produites par ces cellules font l'objet de thérapies plus ciblées mais encore expérimentales.

Par leur production de chémokines (IL-8, MIP-1 pour *macrophage inflammatory protein-1*, MCP-1 ou CXCL13) et facteurs d'angiogenèse, les macrophages synoviaux vont contribuer au trafic leucocytaire dans la synoviale et à sa néovascularisation.

Enfin, au niveau du site pannus-cartilage, les macrophages synoviaux interviennent dans la destruction ostéocartilagineuse, en produisant des enzymes dégradant le cartilage (MMP9, MMP12), en stimulant les RAFLS et en participant à l'ostéoclastogénèse au niveau de l'os sous-chondral (86, 87).

4.1.1.3.2. Cellule présentatrice d'antigène

L'autre fonction essentielle du macrophage synovial impliquée dans la physiopathologie de la PR est celle de CPA. Comme d'autres cellules de la synoviale (ex: cellules dendritiques, RAFLS, ou lymphocytes B), les monocytes/macrophages synoviaux expriment des molécules du CMH de classe II et peuvent activer les lymphocytes T CD4⁺ en leur présentant des antigènes exogènes ou des autoantigènes. L'activation des lymphocytes T CD4⁺ dépend du

premier signal induit par l'interaction de l'antigène spécifique présenté par les molécules CMH de la CPA et du complexe TCR/CD3 du lymphocyte T mais également d'un second co-signal de stimulation/inhibition qui régule le signal intercellulaire. Parmi les molécules du co-signal, on distingue principalement celle de la superfamille des Immunoglobulines (SFIg) et celle de la superfamille du TNFR. La superfamille des TNFR qui a principalement une fonction stimulante pour les cellules T sera discutée plus tard dans le chapitre du $TNF\alpha$.

4.1.1.4. Activation via des molécules de co-stimulation

La SFIg comprend notamment la famille des ligands de CD28 et la famille des ligands de B7. Parmi les molécules homologues de la famille CD28/B7, B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86) sont les plus étudiés et exprimés par une variété de CPA. Ils peuvent interagir avec deux récepteurs lymphocytaires, le récepteur de stimulation CD28 et le récepteur inhibiteur CTLA-4 (CD152). L'expression de CD28 se retrouve sur des lymphocytes T CD4+ et CD8+, et représente le récepteur de co-stimulation majeur des lymphocytes T naïfs. CD28 favorise l'expansion des cellules T stimulées par les antigènes, leur différenciation en cellules effectrices et mémoires, favorise leur survie et peut être impliqué dans le développement et le maintien des Treg. À l'inverse, l'expression de CTLA-4 est essentiellement induite sur les cellules T activées, mais peut être constitutive des Treg. CTLA-4 se lie aux mêmes ligands (B7.1/B7.2) que CD28 mais avec une affinité nettement plus forte et a pour fonction de supprimer la prolifération des cellules T activées ou leur production en cytokines (88, 89).

4.1.1.5. Blocage de la co-stimulation entre CPA et lymphocytes T activés

Dans la PR, la modulation de ces voies de co-stimulation entre les CPA (comme le macrophage par ex.) et le lymphocyte T a été envisagée à visée thérapeutique. En Belgique depuis 2009, pour traiter les PR sévères réfractaires aux DMARDs et initialement, en échec d'un agent bloquant le $TNF\alpha$, on dispose de l'abatacept (Orencia®) (*bien que cette attitude soit modifiée depuis 2010, où tout patient en échec de DMARDs présentant une PR active mesurée par un $DAS28CRP > 3,7$, peut en bénéficier*). Il s'agit d'une protéine de fusion comprenant le domaine extracellulaire de la protéine humaine CTLA-4 liée à une portion modifiée de la région Fc de l'IgG1 humaine appelée CTLA-4 Ig. Cette molécule va agir en se liant aux ligands B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86) sur les CPA, et empêche l'engagement des cellules T sur CD28 et la délivrance du deuxième co-signal positif nécessaire à l'activation optimale du lymphocyte T. Plusieurs études ont confirmé son efficacité dans la PR. (90, 91). Cutolo et al ont proposé que les macrophages pouvaient être une cible du CTLA-4 Ig liée à l'expression de B7.2 sur ces cellules avec comme conséquence une diminution de la production in vitro d'IL-6, de $TNF\alpha$, d'IL-1 β et de TGF β (92).

La famille des ligands de B7 comprend d'autres membres que B7.1 (ou CD80) ou B7.2 (ou CD86) comme ICOS-L pour *Inducible costimulator-ligand*, PD-L1 pour *Programmed cell death 1 Ligand*, PD-L2, B7-H3 et B7-H4 exprimés à la surface des CPA et des cellules lymphoïdes (pour B7.1, B7.2 et PD-L2) qui peuvent interagir avec des récepteurs lymphocytaires qui ne sont pas encore tous connus ou identifiés, ainsi que leurs effets (89). Certaines de ces molécules comme B7-H4 peuvent avoir un intérêt dans la PR (93).

4.1.2. Lymphocytes T

Environ 30 à 50 % des cellules présentes dans la synovite, sont des lymphocytes T, et l'efficacité des médicaments ciblant l'activation ou l'élimination de ces cellules (cyclosporine, ou le blocage de voie de co-stimulation par l'abatacept comme nous venons de le voir) renforce l'hypothèse qu'ils jouent un rôle dans la PR. Cependant, à ce jour, on ne sait toujours pas si le lymphocyte T joue un rôle inducteur dans le développement de la maladie ou plutôt un rôle de maintien de la réponse inflammatoire (94-96).

4.1.2.1. Synovite rhumatoïde, clones de lymphocytes T et autoréactivité

Dans la synovite rhumatoïde, l'infiltration des lymphocytes T (majoritairement CD4+) peut être diffuse ou organisée. Elle est souvent périvasculaire et dans la couche profonde, et forme parfois des agrégats de type « folliculaires » lymphoïdes contenant chez certains patients de véritables centres germinatifs (97-99). Dans la synoviale, ces structures semblent faciliter la présentation antigénique des CPA aux lymphocytes T et favoriser ainsi leur activation. Timmer et al ont montré, par analyse transcriptomique, que les follicules lymphoïdes observés dans la synoviale de PR séropositive pour les anti-CCP, se distinguent par une signature moléculaire associée à une activation lymphocytaire (avec des gènes surexprimés impliqués dans les voies de JAK/STAT, voie de signalisation du TCR, IL-2R, IL-7R et voies de co-stimulation) (100).

Nous allons décrire principalement les cellules T de type CD4+ et leur fonction dans la PR. Leur rôle dans la pathogénèse de la PR est suggéré par l'association des différents allèles CMH de classe II avec la maladie et l'observation de nombreux clones de cellules T CD4+ dans la synovite rhumatoïde. Ces cellules CD4+ semblent jouer un rôle essentiel dans la stimulation d'autres cellules (macrophages, RAFLS) à produire des cytokines inflammatoires (TNF α , IL-1 β) (101).

4.1.2.1.1. Oligoclonalité des cellules T autoréactives

Dans la synoviale on trouve des lymphocytes T mémoires, CD45RO+. Des clones de populations lymphocytaires T CD4+ sont observés dans la PR. Dans le sang et la synoviale, les analyses de répertoire de lymphocytes T montrent des populations oligoclonales (102-104). Dans la synovite rhumatoïde, on trouve des clones de cellules T qui diffèrent d'un patient à l'autre, mais qui peuvent se retrouver dans plusieurs articulations d'un même patient, et à plusieurs moments de sa maladie (105, 106).

Le rôle potentiel dans la PR d'un déficit de tolérance central a été étudié dans le modèle murin SKG (107). Ces souris présentent une mutation dans le gène codant pour ZAP70, une kinase intracellulaire jouant un rôle clé dans la transduction du signal du TCR (108). Ces souris mutées développent une arthrite autoimmune chronique qui ressemble à la PR sous plusieurs aspects, illustrant ainsi le rôle essentiel des lymphocytes T dans cette maladie. L'altération de la transduction du signal du TCR modifie son seuil d'activation leur permettant d'échapper à la sélection négative dans le thymus, ce qui contribue à l'apparition de lymphocytes T autoréactifs en périphérie.. La production thymique de cellules T

arthritogéniques via un shift de sélection génétiquement déterminé du répertoire des cellules T pourrait aussi jouer un rôle dans le développement de la maladie. Rappelons dans ce contexte, l'enrichissement dans la PR (comme dans d'autres maladies auto-immunes) de polymorphismes de PTPN22 pouvant jouer un rôle dans de tels processus (40).

4.1.2.1.2. Autoantigènes

Plusieurs protéines pouvant agir comme autoantigènes ont été identifiées dans la PR. Cependant savoir quel antigène est impliqué dans l'activation des cellules T pathologiques reste à déterminer. Il est possible que les antigènes qui stimulent les cellules T dans le sang soient différents de ceux qui mènent à une réactivation dans la synoviale. Dans ce cas, la réactivation des cellules T pourrait être la conséquence d'une reconnaissance d'un déterminant structural (épitope) qui est partagé entre les antigènes primaires et secondaires (mimétisme moléculaire). Parmi les antigènes endogènes potentiellement impliqués, on retrouve le collagène de type II, gp39 (109), certains protéoglycans, des protéines citrullinées (voir plus haut)...Des lymphocytes activés contre des antigènes extra-articulaires (protéines de choc thermique comme HSP-70, HSP-65, GPI pour *Glucose Phosphate Isomerase*, ADN d'*Escherichia Coli*) ont également été identifiés mais la signification de ces associations est peu claire.

4.1.2.2. Les différentes populations lymphocytaires T CD4+ dans la PR

On a longtemps considéré la PR comme une maladie résultant d'un déséquilibre entre les populations T_H1/T_H2 dans la synovite, cependant la découverte des cellules T_H17 va remettre en question cette dichotomie unique et renforcer le rôle des lymphocytes dans cette pathologie. Nous allons décrire ces différentes populations lymphocytaires en insistant principalement sur les cellules T_H17 puisque ces cellules concernent une partie de nos résultats.

4.1.2.2.1. Les lymphocytes T_H1 / T_H2

Dans les années 1980, Mosmann et Coffman ont les premiers proposé l'existence de deux populations bien distinctes de cellules T CD4+ helper: les T_H1 et les T_H2 caractérisées par un profil de sécrétion cytokinique, et par des fonctions effectrices bien particulières. Sous l'effet de l'IL-12 (secrétée par exemple par les CPA), les CD4+ naïfs adoptent un profil T_H1 produisant des cytokines pro-inflammatoires telles que l'INF γ , le TNF α ou l'IL-2. Ces cytokines jouent principalement un rôle dans les défenses contre les organismes intracellulaires (lèpre, tuberculose..) et ont des fonctions à médiation cellulaire comme l'hypersensibilité retardée ou l'activation de lymphocytes cytotoxiques. L'activation des cellules de type T_H1 met en jeu des facteurs de transcriptions bien particuliers comme STAT4 (via la signalisation du récepteur de l'IL-12), STAT1 (via la signalisation du récepteur de l'IFN γ) et Tbet. À l'inverse sous l'effet de l'IL-4, libérée par les éosinophiles par exemple, les CD4 naïfs peuvent se différencier en cellules de type T_H2 caractérisées par un profil de sécrétion cytokinique particulier comme l'IL-4, IL-5, IL-13, l'IL-10 ainsi que l'IL-25 (ou IL-17E) et activent des facteurs de transcription comme STAT6 et GATA3. Ces cellules jouent un rôle dans la production d'IgE et de molécules impliquées essentiellement dans les réponses

humorales via l'activation des lymphocytes B et de ce fait les défenses contre les parasites ainsi que dans l'asthme et l'allergie (110).

4.1.2.2.2. La Polyarthrite Rhumatoïde : maladie T_H1 ?

Durant longtemps, les pathologies autoimmunes, dont la PR, ont été associées à un déséquilibre T_H1/T_H2 , où la prédominance de cytokines T_H1 (pro-inflammatoire) n'était pas suffisamment compensée par les cytokines T_H2 (anti-inflammatoire) favorisant ainsi les processus inflammatoires.

Des modèles animaux ont été utilisés pour étudier le rôle des populations T_H1 sur l'induction ou le maintien (ou l'effet de traitement) d'une pathologie articulaire inflammatoire de type arthrite chronique érosive ressemblant à la PR.

Il s'agit d'arthrite induite chez des souris, soit par adjuvant dans le modèle CFA (pour *arthrite à adjuvant de Freund* qui permet d'étudier la réaction immunologique à un antigène inconnu), soit par antigènes spécifiques du tissu articulaire (collagène de type II) comme dans le modèle CIA (pour *Collagen-induced arthritis* ou arthrite induite au collagène) ou encore par des antigènes exogènes ou infectieux dans le modèle AIA (pour *arthrite à antigènes*) ou SCWA (pour *Streptococcal cell wall arthritis* - arthrite induite par des parois de streptocoque). Ces modèles permettent d'explorer la réponse immunitaire non spécifique, l'autoimmunité ciblée du cartilage ou de cibles exogènes/infectieuses ainsi que leur effet sur les cellules T_H1 ou encore, le rôle des cytokines produites ($IFN\gamma$) ou induites ($TNF\alpha$) par ces cellules, dans la survenue de la maladie (111, 112).

Cependant, bien qu'on ait démontré le rôle des cellules de type T_H1 et de l' $IFN\gamma$ dans ces modèles murins d'arthrite, l'aggravation de la maladie en l'absence de cytokines de type T_H1 ou de leurs récepteurs a remis en question la fonction essentielle de ces sous-populations lymphocytaires.

Parallèlement, dans la PR, le faible taux d' $IFN\gamma$ dans la synoviale, même s'il est supérieur à celui de l'IL-4, n'a pas suffi à convaincre. De plus le $TNF\alpha$ semble avoir un rôle indépendant de l' $IFN\gamma$ faisant suspecter d'autres influences sur sa production. On ne peut dès lors certainement pas conclure que les cytokines de type T_H1 , $IFN\gamma$ ou $TNF\alpha$, sont les seuls médiateurs des lésions tissulaires.

L'identification des cellules T_H17 a remis en question l'implication unique des populations T_H1/T_H2 comme T effecteurs dans la PR (95, 113).

4.1.2.3. Les lymphocytes T_H17

4.1.2.3.1. Cellules T_H17 : généralités

Les cellules T_H17 sont caractérisées par la production d'un profil de sécrétion cytokinique particulier (ne pouvant être répertorié comme cytokines de type T_H1/T_H2) comprenant l'Interleukine-17A (IL-17A ou IL-17), l'IL-17F, l'IL-21 et l'IL-22 (114-116). Ces cellules, du fait d'un haut potentiel inflammatoire tissulaire, sont depuis quelques années décrites pour jouer un rôle important dans les maladies auto-immunes expérimentales ou humaines (117-119). De nombreux travaux ont été dès lors réalisés, dans l'objectif de comprendre et d'identifier les conditions et les cytokines impliquées dans leur différenciation et leur expansion.

Différenciation des T_H17: rôle de l'IL-6 et du TGFβ

C'est l'environnement cytokinique particulier qui participe à la différenciation de ces cellules.

Différentes équipes ont simultanément découvert que le TGFβ en association avec l'IL-6 induit la différenciation des cellules T naïves en cellules T_H17 (120-122). Ce qui a été une découverte surprenante sachant que le TGFβ est une cytokine impliquée principalement pour ses propriétés immunosuppressives et pour son rôle dans la différenciation de cellules T naïves périphériques en T régulateurs exprimant le facteur de transcription FoxP3 (pour *forkhead box P3*).

Dans ce contexte, l'IL-6 pourrait jouer un rôle pivot dans la balance T_H17/Treg.

La différenciation des T_H17 semble présenter des différences chez l'homme et la souris où la collaboration du TGFβ et de l'IL-6 est observée, alors que chez l'homme, certains auteurs semblent dire que la différenciation CD4⁺ naïfs en T_H17 est possible sous l'effet de l'IL-6 et de l'IL-1β (123) ou de l'IL-1β et de l'IL-23 (124). Ceci laisse à penser que le TGFβ n'est pas indispensable chez l'homme pour la différenciation des T_H17. Cependant, ces expériences sont controversées (125).

Le rôle du TGFβ et de l'IL-6 dans la différenciation des T_H17 a été renforcé par l'analyse des médiateurs intracellulaires. STAT3 est le principal facteur de transcription activé en réponse à l'IL-6 impliqué dans la différenciation des T_H17. D'autres facteurs de transcription spécifiques aux T_H17 sont décrits comme RORγt et RORα pour la souris ou RORC2 pour l'homme. L'expression de ces facteurs est induite sous l'effet du TGFβ et de l'IL-6 d'une manière STAT3 dépendante. La régulation de l'expression de RORγt participe à la sécrétion de l'IL-17, et sa déficience suffit pour empêcher la différenciation des T_H17 (126). À l'heure actuelle, le mécanisme par lequel RORγt et RORα régulent la production de l'IL-17 n'a pas encore été élucidé.

Amplification et rétrocontrôle des T_H17 différenciés : Rôle de l'IL-21

Bien que l'IL-6 et le TGFβ soient requis pour initier la différenciation des CD4⁺ naïfs en cellules T_H17, des stimuli supplémentaires sont nécessaires pour acquérir complètement la fonctionnalité T_H17 dont fait partie l'IL-21, produite par les cellules T_H17. Cette cytokine joue un rôle d'amplification autocrine après que la différenciation des T_H17 soit initiée, en particulier dans un environnement pauvre en IL-6. En effet, en l'absence d'inflammation, c'est-à-dire lorsque des taux peu élevés d'IL-6 sont présents, l'IL-21 produite par les cellules T_H17 servirait, en présence de TGFβ, à maintenir et à amplifier le pool des précurseurs de cellules T_H17, contrairement à ce qui se passe lors d'une présence massive d'IL-6, auquel cas l'IL-21 n'est plus nécessaire (119).

Expansion des T_H17 : Rôle de l'IL-23

L'IL-23 est un membre de la famille de l'IL-12 et est composée de deux sous unités, p19 et p40, partagée avec l'IL-12 (127). Le rôle clé de l'IL-23 dans l'autoimmunité a été démontré dans des souris KO (pour *Knockout*) pour p19 résistantes à l'induction de CIA (128, 129). Rapidement, il est apparu que l'IL-23 est capable d'induire la prolifération de cellules différenciées en T_H17 et d'intervenir dans leur maintien et leur expansion. Contrairement aux cellules T naïves, les cellules T_H17 différenciées expriment le récepteur de l'IL-23, les rendant susceptibles à l'effet prolifératif de cette cytokine (130).

Marqueurs des T_H17

Les cellules T_H17 sont identifiées par leur capacité à sécréter l'IL-17A et l'IL-17F ainsi que d'autres cytokines comme l'IL-21, l'IL-22, l'IL-26, l'IL-6, le TNFα et le GM-CSF. Elles peuvent exprimer spécifiquement des facteurs RORC2 chez l'homme (RORγc chez la souris), assurant la transcription du gène codant pour l'IL-17 et l'expression en surface de l'IL-23R. Ce récepteur n'est cependant pas exclusivement exprimé par les cellules T_H17, et ne peut dès lors servir comme marqueur d'identification. En fait, à ce jour, il n'existe pas de marqueurs de surface spécifiques des T_H17. Des candidats à cette fonction ont été proposés dont CCR6. Ce récepteur de chémokine exprimé sur les T_H17 peut contribuer à leur migration préférentielle dans les sites inflammatoires (123, 131). Plus récemment, CD161, a été rapporté pour être chez l'homme un marqueur potentiellement spécifique des cellules sécrétant l'IL-17 (132).

4.1.2.3.2. Rôle des T_H17

En conditions physiologiques, l'IL-17 joue un rôle de défense anti-infectieuse grâce à sa capacité à rapidement initier une réponse inflammatoire principalement dominée par les polymorphonucléaires neutrophiles. Les réponses inflammatoires dépendant des T_H17 jouent un rôle particulièrement important dans les défenses contre certains agents pathogènes : *Propionibacterium acnes* (bactéries gram positives), *Citrobacter rodentium* et *Klebsiella pneumoniae* (bactéries gram négatives), *Borrelia burgdoferi*, *Mycobacterium tuberculosis* et certains champignons dont *Candida albicans*. Le rôle de l'IL-17 et des cellules T_H17 dans l'élimination de ces agents a été démontré dans certains modèles animaux avec les souris KO pour l'IL-17A ou IL-17RA, mais également chez l'homme avec le syndrome d'Hyper IgE ou Syndrome de Job dans lequel il existe un dominant négatif du facteur de transcription STAT3,

nécessaire au développement des T_H17 (133). Ces patients souffrent d'infections répétées bactériennes (telles que *Klebsiella pneumoniae* ou *Staphylococcus aureus*) et fongiques (par ex: *Candida albicans*) (134).

Néanmoins c'est dans les maladies autoimmunes que le rôle de l'IL-17 et des cellules T_H17 a été le plus étudié. Nous verrons dans le chapitre des cytokines les effets de l'IL-17 dans la PR.

Les cellules T CD4⁺ dans la PR sont donc essentielles dans le contrôle de la réponse immunitaire. Les cellules T_H1 et T_H17 jouent un rôle essentiel dans l'inflammation.

Cependant, d'autres cellules lymphocytaires comme les T régulateurs (Treg) peuvent intervenir dans cette réponse. Normalement ces cellules sont censées contrôler la réponse immunitaire et prévenir les réactions auto-immunes. Dans la PR, ces cellules semblent être moins fonctionnelles soulevant le nouveau paradigme d'un déséquilibre de la balance entre les lymphocytes T_H17, effecteurs et les lymphocytes T régulateurs dans cette pathologie.

4.1.2.4. Les lymphocytes T régulateurs (Treg)

4.1.2.4.1. Généralités

Découverts dans les années 1990, les Treg sont identifiés pour intervenir dans les maladies auto-immunes (MAI). Sakaguchi et al. ont démontré qu'une déficience en Treg est corrélée à l'apparition ou l'aggravation de MAI et que ces cellules sont impliquées dans le maintien de la tolérance (135). Elles interviennent en effet dans la suppression de clones de lymphocytes autoréactifs ayant échappé à la sélection négative dans le thymus, prévenant ainsi leur expansion en cellules effectrices. Leur activité suppressive peut être liée soit à leur capacité à produire des cytokines régulatrices comme l'IL-10, le TGF β ou plus récemment l'IL-35, soit à leur activité directe de lyse cellulaire. Néanmoins, leur fonction suppressive peut être indirecte soit en diminuant la présentation antigénique par les CPA, soit en augmentant la production de molécules à activité suppressive (comme l'IDO pour *Indoleamine 2,3-dioxygénase* ou des molécules de co-stimulation) ou compétitive avec d'autres cellules pour des cytokines (IL-2 par exemple) (136, 137).

Bien qu'étant principalement des cellules T CD4⁺ exprimant fortement CD25 (= récepteur de l'IL-2) et Foxp3, il n'existe à ce jour aucun marqueur de surface spécifique de ces cellules (138). Certains auteurs rapportent des marqueurs potentiellement intéressants pour mieux les identifier: CTLA-4, GITR (pour *Glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor family related gene*), GARP (pour *Glycoprotein A repetitions predominant*), ou encore CD127 (ou IL-7R α) (139-143). Une faible expression d'IL-7R α (= CD127^{low}) sur les Treg est rapportée comme spécifique de ces cellules, même si certains auteurs observent que cette expression pourrait être dépendante de leur état d'activation (144).

4.1.2.4.2. Rôle des Treg dans l'arthrite

Chez l'homme, la situation semble plus complexe que celle des modèles murins. Globalement, les observations s'accordent à dire que la PR est associée à un défaut principalement fonctionnel des Treg alors que les études de leur variation numérique sont plutôt divergentes que ce soit dans le liquide synovial, la synoviale ou le sang périphérique des patients (140, 145-148). De même, certains auteurs décrivent l'effet des anti-TNF α sur les populations Treg dans la PR soit en restaurant leurs capacités suppressives soit en induisant de nouvelles populations différenciées Treg (iTreg) bien que ce soit encore très prématuré (149). Nous n'allons cependant pas développer ce chapitre étant donné qu'il ne concernera pas nos résultats et que ce sujet suscite encore bien des questions.

4.1.3. Lymphocytes B

Pendant de nombreuses années, le rôle du lymphocyte B dans la PR a été considéré comme limité à la production d'autoanticorps. Cependant, des PR évoluant favorablement sous traitement par Rituximab (un agent déplétant les lymphocytes B utilisé dans le lymphome), ont suggéré que ces cellules jouaient un rôle plus important que prévu dans le maintien de la PR et que les thérapies ciblant les lymphocytes B peuvent avoir leur place dans le traitement de la maladie (150, 151).

4.1.3.1. Rôle du lymphocyte B dans la PR

Outre la production d'anticorps, le lymphocyte B peut présenter des antigènes via des molécules HLA et des immunoglobulines de surface (BCR pour *B Cell receptor*), activer les lymphocytes T, ou moduler leur profil de sécrétion de cytokines.

4.1.3.1.1. *Production d'autoanticorps*

Le lymphocyte B est connu depuis longtemps pour un rôle essentiel dans la PR comme producteur d'autoanticorps (ex : FR et les anti-CCP,...) même si, comme nous l'avons vu précédemment, ces anticorps n'ont pas en soi un rôle pathogène dans la maladie comme le sont certains autoanticorps dans d'autres pathologies autoimmunes.

4.1.3.1.2. *Cellule présentatrice d'antigènes pour les cellules T*

Ainsi que d'autres cellules de la synoviale, les lymphocytes B dans la PR peuvent aussi jouer le rôle de CPA (152, 153), comme cela a été confirmé récemment par les travaux de notre groupe. En effet, Gutierrez et al ont démontré que la déplétion des lymphocytes B par l'utilisation de rituximab induit une diminution de l'expression des gènes impliqués dans l'activation lymphocytaire T dans la synovite rhumatoïde, et, plus particulièrement, dans la réponse T_H17 (154, 155). Cette capacité de présentation antigénique semble d'ailleurs nettement supérieure par rapport à d'autres CPA (156). Dans la PR, les immunoglobulines membranaires des lymphocytes B peuvent lier des complexes immuns, en particulier le lymphocyte B producteur de facteurs rhumatoïdes peut capter des antigènes complexés aux IgG par ses immunoglobulines membranaires anti-IgG et ainsi les présenter aux lymphocytes T adjacents.

4.1.3.1.3. *Sécrétion de cytokines*

Le lymphocyte B activé peut dans la PR produire des cytokines inflammatoires comme le font les macrophages, les RAFLS ou les lymphocytes synoviaux. Des études ont montré que les lymphocytes B stimulés produisent du TNF α , de l'IL-6 et des lymphotoxines, lesquels peuvent agir comme des facteurs de croissance et de différenciation mais également comme des amplificateurs de la réponse immunitaire (157).

4.1.3.1.4. *Rôle dans le maintien des organisations lymphoïdes*

La synovite rhumatoïde comme nous l'avons déjà évoqué, peut être associée à la formation de structures folliculaires lymphoïdes avec un centre germinatif composés de lymphocytes T et B (158). Ces structures peuvent jouer un rôle pathogénique même si les facteurs qui y contribuent ne sont pas bien connus et certaines molécules comme les lymphotoxines α et β , ou certaines chémokines comme CXCL13 (pour *C-X-C motif chemokine 13* chémoattractant des lymphocytes B) ou CCL21 (pour *ligand 21 de chémokine C-C*) ont été décrites pour y participer (159, 160). Il est cependant possible, que même si ces structures lymphoïdes ectopiques ne sont pas des marqueurs spécifiques de la PR, elles peuvent être le reflet d'un degré d'inflammation plus élevé (161).

4.1.3.2. Thérapeutiques anti-lymphocytes B dans la PR

Bien que le rôle du lymphocyte B dans la PR ne soit pas encore complètement élucidé, il ne fait aucun doute que le blocage de cette cellule est une éventualité thérapeutique efficace dans la PR. C'est le rituximab qui a été décrit le premier, et par la suite d'autres molécules visant à dépléter les lymphocytes B ou à bloquer leur activation se sont développées ces dernières années. Le rituximab est un anticorps monoclonal chimérique anti-CD20, un antigène spécifique des lymphocytes B exprimé sur plus 95% des cellules B du sang et des organes lymphoïdes (162). Il n'est pas exprimé par les cellules souches ou les précurseurs pro-B ni par les plasmocytes produisant des AC mais bien par les cellules pré-B, immatures et matures ainsi que par les lymphocytes B mémoires. Le rôle du CD20 n'est pas bien connu et les souris déficientes en CD20 n'ont pas d'anomalies phénotypiques immunologiques.

La déplétion des cellules CD20+ se fait soit par un mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC), soit par cytotoxicité dépendante du complément, soit par induction directe de l'apoptose des cellules B. Il n'est pas clair à ce jour lequel de ces mécanismes prédomine, mais des polymorphismes dans le récepteur Fc γ peuvent influencer la réponse au traitement dans le lymphome laissant suspecter un rôle dominant de l'ADCC (163).

Administré dans le lymphome depuis 1998, son utilisation dans la PR a débuté en 2004 et est disponible en Belgique depuis 2008 pour des patients avec une maladie active et réfractaire à un DMARDs et à au moins un anti-TNF α (164, 165).

4.1.4. Le « RAFLS »

Après avoir décrit les macrophages synoviaux, les lymphocytes T et les T_H17 ainsi que les lymphocytes B, une population cellulaire jouant un rôle essentiel dans la synovite rhumatoïde reste à discuter: le RAFLS (Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like-synoviocyte). Ces cellules activées dans la synovite rhumatoïde diffèrent des fibroblastes synoviaux normaux du fait d'un nouveau phénotype participant à l'hyperplasie de la couche bordante et à la formation du pannus synovial.

4.1.4.1. Activation des RAFLS

À ce jour, on ne sait toujours pas, si ce sont les cellules inflammatoires qui initient le processus pathogénique propre à la PR ou si ce sont les RAFLS (95). L'activation et le maintien des RAFLS peuvent être liés à l'environnement pro-inflammatoire synovial. Les stimuli de l'environnement sont de nature soit cellulaire via l'interaction avec les cellules T, les cellules B ou les macrophages, soit cytokinique via le TNF α et IL-1 β produits par les macrophages, via l'IL-17 et l'INF- γ par les cellules T, via l'IL-6 et le TGF β par les FLS eux-mêmes, soit chémokinique via des ligands de récepteurs de chémokines (CCR2, CCR5, CXCR4, et CX3CR1) exprimés sur les FLS (60, 166-168).

D'autres éléments peuvent également contribuer à l'activation des RAFLS. En particulier, certains Toll-like récepteurs, notamment TLR2, TLR3 et TLR4, exprimés par les RAFLS peuvent lier des particules microbiennes, des produits de lésions du cartilage ou des acides nucléiques endogènes (169-172). Ils sont aussi capables d'induire la production de cytokines, de chémokines ou de MMP par le RAFLS.

Enfin, le maintien en activité des RAFLS peut être également lié à des modifications épigénétiques (173). L'hypométhylation de l'ADN est décrite dans les RAFLS pour contribuer au caractère chronique de la PR (174).

4.1.4.2. Phénotype agressif et invasif du RAFLS

Le RAFLS présente un phénotype particulier: prolifération, invasion, migration, production de cytokines inflammatoires et d'enzymes dégradant le cartilage, et enfin présentation d'antigène (175, 176).

4.1.4.2.1. Caractère hyperplasique du RAFLS

L'hyperplasie synoviale peut être liée à une dérégulation de la prolifération ou de l'apoptose des RAFLS responsable de leur nombre élevé dans la synovite principalement au site d'invasion du cartilage et de l'os. Les RAFLS proliférant semblent avoir une susceptibilité réduite à l'apoptose (177). Actuellement, les mécanismes de résistance à l'apoptose ou d'hyperprolifération du RAFLS contribuant à la progression de la PR sont encore inconnus. Certaines hypothèses sont rapportées comme la surexpression de MLN51 (pour *metastatic lymph node 51*), de molécules anti-apoptotiques (sentrine, SUMO-1 pour *small ubiquitin-related modifier 1*, FLIP (inhibiteur de FLICE pour *FADD-like interleukin-1 beta-converting*

enzyme, molécule inhibant l'apoptose induite par FLICE ou synovioline) (178), de proto-oncogènes (Ras, c-fos, c-myc,...) ou la perte fonctionnelle de gènes suppresseurs de tumeurs comme p53 (60, 172, 179, 180). Récemment des facteurs de transcriptions osmoprotecteurs (comme NF-AT5 pour *Nuclear factor of activated T-cells 5*) ont été rapportés pour réguler la prolifération des RAFLS, habituellement induits par des effets osmotiques, ils le sont également par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α et l'IL-1 β (181). L'environnement inflammatoire (particulièrement le TNF α et l'IL-1 β ou la combinaison de cytokines) est bien décrit pour contribuer à la prolifération des RAFLS.

4.1.4.2.2. Caractère invasif et destructeur du RAFLS

Le caractère invasif des RAFLS est lié, d'abord, à leur capacité à s'attacher à certains composants du cartilage (fibronectine, vimentine, COMP pour *Cartilage oligomeric matrix protein*) ou à la matrice extracellulaire via des molécules d'adhésions (intégrines ou cadhérines) (167, 182).

Ensuite, les RAFLS produisent des enzymes dégradant la matrice extracellulaire comme des métalloprotéases matricielles (MMPs) ou des cathepsines (cathepsine L et K) expliquant en partie leur rôle dans la destruction du cartilage ou les érosions osseuses. Les MMPs produites par les RAFLS sont principalement des collagénases (la collagénase-1 ou MMP-1, et MMP-13) et des stromélysines (MMP-3). Les RAFLS produisent également des gélatinases (MMP-2 et MMP-9) mais en quantité moindre et des protéases de type membranaire (MT-MMP) impliquées dans la physiopathologie des RAFLS en activant d'autres MMP ou en clivant des composants matriciels (MT1-MMP ou MMP-14 et MT3-MMP ou MMP-16). À noter qu'il existe un processus naturel d'inhibition de ces enzymes par une famille de molécules antagonisant les MMP, appelés les TIMPs pour *Tissue inhibitor metalloproteinase* (166, 168, 183).

Enfin, les RAFLS participent à l'ostéoclastogenèse en produisant RANKL (=ligand activateur du récepteur de NF- κ B pour *Nuclear Factor-kappa B*) nécessaire à l'activation et à la différenciation des ostéoclastes. Ces phénomènes provoquent une déminéralisation osseuse (ostéoporose périarticulaire) située à proximité des sites inflammatoires ainsi que l'apparition d'érosion osseuse focale. Les ostéoclastes sont des cellules géantes multinucléées, présentes uniquement dans l'os, qui dérivent de progéniteurs hématopoïétiques. Elles sont capables de résorber le tissu minéralisé et jouent un rôle crucial dans le remodelage osseux. Cependant, les mécanismes exacts de différenciation et d'activation de ces cellules dans la PR ne sont pas encore pleinement élucidés. Parmi les mécanismes les plus susceptibles pour jouer un rôle, l'axe RANK-L/RANK/OPG occupe une place de choix. Normalement, les ostéoblastes produisent RANKL qui est une protéine transmembranaire (de la famille du TNF) dont le clivage aboutit à une forme soluble active, qui va se lier à des récepteurs RANK présents à la surface des précurseurs ostéoclastiques permettant ainsi leur différenciation et leur activation. Dans la synovite rhumatoïde, RANKL est produit par les ostéoblastes mais également par les cellules T synoviales activées et les RAFLS (184).

4.1.4.2.3. Caractère migrateur du RAFLS

À côté du caractère proliférant et invasif, un potentiel migratoire du RAFLS a été décrit. Cette propriété particulière, proche du processus tumoral, peut être impliquée dans l'atteinte polyarticulaire, propre à la PR.

C'est dans des modèles de souris SCID (*Severe combined immunodeficient*) que le potentiel migratoire du RAFLS a été mis en évidence. Les souris SCID sont dépourvues de lymphocytes (T et B), lié à une mutation sur le chromosome 16, responsable d'un défaut enzymatique de réparation de l'ADN (Prkdc ou *protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide*), d'un défaut de réarrangement VdJ et du développement de ces cellules en les maintenant immatures (185). Ce modèle murin a permis l'étude des interactions entre la synoviale humaine et le cartilage (186, 187). Après des études *in vitro* prouvant le potentiel invasif des RAFLS sur du cartilage humain, des expériences *in vivo* réalisées sur des souris SCID-HuRAg (c'est à dire des souris *SCID greffées avec du tissu synovial humain provenant de polyarthrite rhumatoïde*), montrent que la greffe de tissu synovial de patients atteints de PR peut être suivie d'un envahissement de cartilage humain normal implanté à proximité de cette greffe (188). D'autres auteurs, confirmeront, les effets invasifs et destructeurs de greffe sous-cutanée de tissu synovial (ou de RAFLS), sur le cartilage murin ou sur du cartilage humain coimplanté à proximité de la greffe (186, 189). Plus tard, Lefevre et al., démontrent le potentiel migratoire des RAFLS, en greffant ces cellules dans des souris SCID ainsi que du cartilage sain, en controlatéral au site du greffon synovial: ils observent que les RAFLS sont capables de dégrader et d'envahir le cartilage humain greffé en controlatéral (190). Toutes ces expériences suggèrent que certaines propriétés du RAFLS sont indépendantes des cellules inflammatoires (même si les propriétés de destruction ostéocartilagineuse sont nettement amplifiées sous l'effet de cytokines inflammatoires) et qu'elles jouent un rôle fondamental dans la PR. Le blocage du RAFLS pourrait dès lors être une approche thérapeutique intéressante sans les effets immunosuppresseurs des traitements chroniques actuels.

4.1.4.2.4. Caractère inflammatoire du RAFLS

L'agressivité du RAFLS peut également être liée à sa capacité à produire des facteurs de croissance (comme GM-CSF, VEGF pour *Vascular endothelial growth factor*, ou TGF β), des cytokines et des chémokines inflammatoires (comme le TNF α , l'IL-1 β , l'IL-6, ou l'IL-8, RANTES, CXCL11, CXCL13,...) (62). La production de ces molécules aura également pour fonction d'attirer et d'interagir avec les autres cellules de la synoviale amplifiant ainsi les cascades inflammatoires.

Le RAFLS est une source importante d'IL-6 dans la synovite (191-193). Il est décrit également pour produire du TNF α , des cytokines appartenant à la famille de l'IL-1: l'IL-1 β , l'IL-18 ou l'IL-33, de l'IFN γ ainsi que des cytokines ayant une activité « *IL-2 like* » comme l'IL-7 et l'IL-15 qui semblent essentielles pour l'activation des cellules T synoviales et leur expansion (60, 194, 195). Certains auteurs ont observé une production élevée de ces dernières cytokines dans la synovite rhumatoïde, ainsi que par les RAFLS purifiés (d'autant plus s'ils sont stimulés par du TNF α ou de l'IL-1 β) en comparaison avec d'autres lignées fibroblastiques issues de patients arthrosiques (196).

4.1.4.2.5. Rôle de cellule présentatrice d'antigène

Les RAFLS peuvent activer les lymphocytes T CD4+ parce qu'ils expriment des molécules HLA de classe II, absentes des fibroblastes normaux. Donc les RAFLS ont un rôle de CPA (197, 198).

4.1.4.3. Moyens d'étude du RAFLS

Le développement des mini-arthroscopies a rendu plus aisée l'étude des FLS et de leur fonction (199, 200). Des protocoles de mise en culture de FLS isolés de biopsies synoviales permettent leur étude sur des périodes prolongées. Il s'agit de cellules adhérentes qui sont habituellement utilisées après 3 à 4 passages, afin d'exclure la présence de cellules inflammatoires initiales ou des synoviocytes macrophagiques. Après 10 à 12 passages, leur capacité de prolifération décline progressivement (66).

L'ensemble de ces cellules dans la synoviale participe à l'inflammation, dès son induction, principalement par l'intervention de sécrétion de cytokines qui amplifient et contribuent ensuite à l'entretien de la réponse inflammatoire. Plusieurs molécules de type cytokine ou chémokine sont décrites pour jouer un rôle dans la synovite. Cependant nous n'allons décrire que certaines d'entre elles du fait d'un rôle évident dans la maladie, de la disponibilité actuelle de thérapies disponibles à ce jour (en en cours de l'être) visant à les bloquer, et enfin parce qu'elles concernent une partie de nos travaux : le $TNF\alpha$, l'IL-6, l'IL-1 β et l'IL-17.

4.2. Cytokines de la synovite rhumatoïde

4.2.1. Le TNF α et son récepteur

4.2.1.1. Le TNF α

L'ADNc du TNF α a été cloné en 1985 par Old et al (201). Le gène du TNF α chez l'homme est porté par le chromosome 6 (6p21.3), il contient 3 introns et 4 exons et son promoteur est un site privilégié de sites de fixation pour des facteurs de transcription comme NF- κ B.

Il s'agit d'une cytokine appartenant à la *superfamille du TNF* (TNF α , lymphotoxine- α , Fas ligand, CD40L pour *ligand de CD40*, RANKL...) synthétisée comme une glycoprotéine transmembranaire de type II (pro-TNF α) de 233 acides aminés et de 25kDa de poids moléculaire qui se trimérise ensuite pour être biologiquement active. Une forme soluble du TNF α (homotrimère de 17-kDa, polypeptide de 157 acides aminés) est ensuite dérivée de son précurseur transmembranaire par clivage enzymatique du domaine extracellulaire. La principale enzyme responsable de ce clivage est une métalloprotéase matricielle appelée TACE (pour *TNF α converting enzyme*, ou ADAM-17 (pour *A Disintegrin an Metalloproteinase 17*) (202, 203).

Le TNF α transmembranaire est exprimé à la surface des macrophages et des lymphocytes T activés, mais également par d'autres cellules comme les cellules endothéliales, les fibroblastes, les mastocytes, les cellules NK (pour *Natural Killer*), les lymphocytes B ou les ostéoclastes (204). Le rôle de la forme membranaire du TNF α a longtemps été négligée face à l'importance des effets de la forme soluble, mais il est aujourd'hui bien démontré, par exemple pour l'apoptose et la mort cellulaire comme dans le modèle murin génétiquement modifié où le TNF α membranaire est rendu non clivable (205, 206).

Les effets pléiotropiques du TNF α résultent de la liaison du TNF α soluble ou membranaire à ses récepteurs.

4.2.1.2. Les récepteurs du TNF α : TNFRI et TNFRII

Les récepteurs du TNF α sont le TNFRI (CD120a; p55/60 (55kDa); TNFRSF1A) et le TNFRII (CD120b; p75/80 (75kDa); TNFRSF1B).

Le TNFRI est le récepteur principal de la signalisation du TNF α et est exprimé dans presque tous les tissus humains. Son gène est situé sur le chromosome 12p13. Il se lie uniquement avec le TNF α (207).

À l'inverse, le TNFRII se lie au TNF α et au TNF β (appelé aussi lymphotoxine- α ou LT α), et n'est exprimé que sur les cellules du système immunitaire. Son gène est situé sur le chromosome 1p36 (208). Certains polymorphismes de ce gène sont décrits pour être associés à la susceptibilité à développer une PR (209).

Ces récepteurs peuvent également être clivés par une enzyme libérant la partie extracellulaire formant un récepteur soluble ayant un potentiel neutralisant. Néanmoins, un épissage

alternatif (de l'exon 7 et 8) du gène de TNFRII est également décrit pour participer à la production de sa forme soluble (210). Bien que le TNFRII puisse être clivé par TACE, l'enzyme de clivage du TNFRI n'est bien pas connue. Il semble que ce clivage enzymatique soit une étape importante dans la régulation de la réponse au TNF α , comme le démontre une maladie autoinflammatoire appartenant aux fièvres héréditaires intermittentes à transmission mendélienne dominante appelée TRAPS (pour *Tumor necrosis factor-Receptor-Associated Periodic Syndrome*). Il existe dans cette pathologie inflammatoire un taux normal ou bas de la forme soluble du TNFRI (sTNFRI) liée à une mutation du TNFRI qui le rend insensible au clivage enzymatique empêchant ainsi la production de la forme soluble neutralisante du récepteur capable de se lier au TNF α avec dès lors une stimulation continue de la signalisation du TNFRI (211).

4.2.1.3. La signalisation TNF α /TNFRI et TNF α /TNFRII

La signalisation du TNF α via son récepteur est complexe !

Alors que les parties extracellulaires liant le TNF α des récepteurs TNFRI et TNFRII présentent un certain pourcentage d'homologie, ces récepteurs se distinguent essentiellement au niveau de leur portion intracellulaire. Bien qu'aucun des deux récepteurs ne possède d'activité enzymatique intrinsèque, ils activent des voies de transduction du signal différentes qui recrutent diverses protéines intracellulaires cytosoliques via des domaines d'interaction spécifique protéine-protéine.

L'engagement du TNF α sur le TNFRI, qui possède un « domaine de mort » appelé DD ou « *death domain* » dans sa portion intracellulaire (ce qui n'est pas le cas pour le TNFRII), va libérer des protéines SODD (pour *Silencer of Death Domain*) c'est-à-dire des protéines cytoplasmiques préassociées au domaine intracellulaire du récepteur non stimulé. Ensuite, un complexe est formé à proximité du récepteur suite à l'activation de protéines adaptatrices comme TRADD (pour *TNFR-associated Death Domain*), TRAF2 (pour *TNFR-associated factor-2*), RIP-1 (pour *receptor interacting protein-1*) et FADD (pour *Fas-Associated protein with Death Domain*). Ce complexe membranaire intervient ensuite dans l'activation de la voie de NF- κ B, dans le recrutement d'enzymes spécifiques (par exemple caspase-8 et IKK β pour *Inhibitor of nuclear factor of kappa B kinase beta*) ou dans l'activation des MAP kinases (ou MAPK pour *mitogen-activated protein kinase*) tel que p38-MAPK ou de JNK (pour *c-Jun N-terminal kinase*).

L'ensemble de ces événements conduisent soit à l'apoptose cellulaire, soit à la transcription de gènes et à la production de protéines impliquées dans la survie, la différenciation ou la prolifération cellulaire (via la synthèse de facteurs anti-apoptotiques par exemple par l'activation de NF- κ B ou de la voie de JNK et de la voie des MAPK) ou enfin à l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire.

L'engagement du TNF α sur le récepteur de type 2 est quelque peu différent car TNFRII ne possède pas de « domaine de mort cellulaire » intracellulaire. Il peut interagir avec les TRAFs comme TRAF1 et TRAF2 qui ensuite s'associent au domaine cytoplasmique du récepteur pour former un complexe hétérodimérique ou seul TRAF2 a un contact direct avec le récepteur (211, 212).

4.2.1.4. Le rôle du TNF α dans la Polyarthrite

Dans la PR, la source essentielle de TNF α est le macrophage activé situé dans la synoviale ou au niveau du site de jonction entre le pannus synovial et le cartilage (213, 214). Néanmoins, on sait à ce jour qu'il peut être produit également par les lymphocytes T et B activés synoviaux et les RAFLS (62, 157, 215).

La présence du TNF α sous sa forme membranaire ou soluble et de ses récepteurs dans la PR a été démontrée dans différentes études dans le sérum, le tissu synovial, ou le liquide articulaire (214, 216-219).

Des souris transgéniques pour le gène du TNF α ont permis d'étudier le rôle du TNF α dans l'arthrite (220). Ces souris développent spontanément dans les 15 premiers jours de vie, des arthrites chroniques sévères, similaires de la PR, caractérisées histologiquement par une hyperprolifération de la membrane synoviale, une infiltration massive de lymphocytes et de polynucléaires et une destruction ostéoarticulaire.

Rôle du TNF α sur les cellules synoviales

L'action du TNF α sur le macrophage synovial a des conséquences majeures dans l'initiation et l'entretien de la synovite rhumatoïde. Une fois produit par le macrophage, le TNF α stimule sa propre production amplifiant ainsi la réponse inflammatoire. Il induit également la production d'autres cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1, l'IL-6, l'IL-7, l'IL-15, l'IL-21, l'IL-23 ou le GM-CSF. Il favorise aussi la production de chémokines impliquées dans la migration et l'infiltration leucocytaire comme l'IL-8 ou RANTES (221, 222).

Il joue également un rôle sur les cellules endothéliales en augmentant l'expression d'intégrines ou de sélectines facilitant l'arrivée de cellules inflammatoires périphériques et l'infiltration cellulaire dans le tissu synovial et la synthèse de VEGF favorisant ainsi l'angiogenèse et la néovascularisation observées dans la synovite rhumatoïde ce qui (223).

Il agit aussi sur les RAFLS en induisant leur prolifération via une expression de molécules anti-apoptotiques (comme la synovioline), et en stimulant leur production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-23, IL-7 par exemple) et de métalloprotéases matricielles (MMP-1, MMP-2, -3 et -9) (221, 224, 225).

4.2.1.5. Le blocage du TNF α

Le rôle essentiel du TNF α dans la physiopathologie de la PR a été principalement démontré par l'efficacité du blocage de cette cytokine dans l'arthrite que ce soit dans les modèles murins (CIA et SCID) ou depuis 1992, chez l'homme (226-228). Feldmann et Maini sont les premiers à avoir traité avec succès des PR sévères et réfractaires avec des anticorps neutralisants chimériques (association de la région variable d'un anticorps murin anti-TNF et d'un fragment Fc d'IgG1 humaine) de forte affinité pour le TNF α , obtenus à partir d'hybridome murin et produit par la société Centocor Inc. (229) Cette molécule s'appellera plus tard l'infliximab ou Remicade® (230). Depuis lors, on a rapidement assisté à un développement d'autres agents biologiques bloquant le TNF α sous la forme d'anticorps monoclonaux avec l'adalimumab (Humira®), le certolizumab pegol (Cimzia®) et le

golimumab (Simponi®) ou sous la forme de récepteur soluble comme l'étanercept (Enbrel®) (231-234).

L'infliximab est un anticorps monoclonal chimérique humain-murin composé de la région variable murine (au niveau du site de liaison du $\text{TNF}\alpha$) et de la région constante humaine IgG1, capable de se lier aux formes membranaires et solubles du $\text{TNF}\alpha$ avec une forte affinité. De nombreuses études ont montré sa bonne efficacité et sa bonne tolérance dans la PR. Il sera également indiqué dans d'autres pathologies comme la maladie de Crohn, la Spondylarthrite Ankylosante ou le Psoriasis. On lui connaît cependant des effets secondaires propres comme la possibilité d'immunogénicité liée au développement d'anticorps anti-infliximab responsables parfois de la perte d'efficacité de la molécule au cours du temps, ainsi que des réactions d'infusion et d'hypersensibilité retardée liée à l'apparition d'anticorps contre la portion murine de l'anticorps. Enfin, comme tous les anticorps bloquant le $\text{TNF}\alpha$, son activité inhibitrice est liée à la formation de complexe stable avec le $\text{TNF}\alpha$ qui est ensuite dégradé. Mais, il est également capable de se lier au $\text{TNF}\alpha$ membranaire et d'induire l'apoptose de cellules exprimant du $\text{TNF}\alpha$ membranaire comme les cellules T CD4+ synoviales ou les macrophages synoviaux, par cytotoxicité soit dépendante de l'anticorps (ADCC) ou soit du complément (CDC) (204, 235).

Parmi les autres anticorps monoclonaux bloquant le $\text{TNF}\alpha$, l'adalimumab et le golimumab sont des anticorps entièrement humains qui ne sont pas distincts des IgG1 humaines normales (231, 233). Le certolizumab est un anticorps humanisé comportant un fragment Fab' d'un anticorps monoclonal recombinant IgG1 dirigé contre le $\text{TNF}\alpha$ auquel il manque la portion Fc. La région charnière du certolizumab est liée de manière covalente à deux chaînes croisées de polyéthylène glycol de 20kDa aboutissant la forme pégylée (232).

L'étanercept est composé de la portion extracellulaire de deux TNFRII (récepteur TNF p75) lié à la portion Fc (domaines CH2 et CH3) de l'IgG1 humaine (234).

Globalement l'efficacité et la tolérance des agents biologiques bloquant le $\text{TNF}\alpha$ sont superposables dans la PR, quelle que soit la molécule bloquante.

4.2.2. L'IL-6 et son récepteur

L'IL-6 est une cytokine produite par de nombreux types cellulaires et aux activités biologiques multiples.

4.2.2.1. L'IL-6

L'ADNc de l'IL-6 a été cloné en 1988 (236). Son gène est situé chez l'homme sur le chromosome 7p21. Protéine de 26kDa, comportant 212 acides aminés et constituée de 4 hélices alpha, l'IL-6 est produite par plusieurs types cellulaires: lymphocytes B, T, monocytes, macrophages, fibroblastes, cellules endothéliales, kératinocytes, cellules mésangiales et cellules tumorales (237).

4.2.2.2. Les récepteurs de l'IL-6

Le récepteur de l'IL-6 comprend deux composants: l'IL-6R α ou chaîne alpha du récepteur de l'IL-6 (CD126), protéine de 80-kDa qui lie à la cytokine, et le récepteur gp130 (CD130), récepteur ubiquitaire commun à plusieurs récepteurs de différentes cytokines appartenant à la superfamille de l'IL-6, il s'agit d'une protéine de 130-kDa qui ne lie pas l'IL-6 mais transduit le signal après l'assemblage du complexe IL-6/IL-6R/gp130 (238, 239). Le complexe récepteur-cytokine comprend la sous-unité IL-6R α et deux sous unités gp130 (240).

Une grande partie des effets de l'IL-6 peut être expliquée par l'ubiquité de l'expression de gp130, alors que l'expression de l'IL-6R (forme membranaire) est restreinte à certains types cellulaires: hépatocytes, monocytes, macrophages, neutrophiles et les lymphocytes B, certains lymphocytes T (CD3+) semblent l'exprimer dans le sang et d'autant plus s'ils infiltrant les tissus périphériques (241).

Il existe également une forme soluble de l'IL-6R (sIL-6R) auquel il manque la partie cytoplasmique et transmembranaire qui conserve sa capacité de liaison à l'IL-6 avec une même affinité que la forme membranaire. À la différence d'autres récepteurs solubles (IL-1 β R ou TNF α R), connus pour inhiber les effets de leur ligand, sIL-6R joue un rôle agoniste vis-à-vis de l'IL-6 puisque le complexe IL-6/sIL-6R s'associe à gp130 et peut activer les cellules cibles qui n'expriment pas l'IL-6R (synoviocytes, chondrocytes ou les cellules endothéliales par exemple) (242).

4.2.2.3. La signalisation de l'IL-6/IL-6R

Le complexe IL-6/IL-6R ou IL-6/sIL-6R va donc s'associer à gp130, ce qui aura pour effet d'induire la signalisation de l'IL-6, on parlera respectivement de *voie de signalisation classique* ou *voie de trans-signalisation*. Ces voies de signalisation impliquent celle des JAK/STAT (principalement JAK1 pour *Janus Kinase 1* et STAT3) et celle des MAP Kinases (Erk1/2 pour *Extracellular signal-regulated kinase*, p38 et JNK) (243, 244).

La forme soluble de gp130 (sgp130) joue le rôle d'inhibiteur naturel du complexe IL-6/sIL-6R. Ce complexe se lie préférentiellement à sgp130 plutôt qu'à la forme membranaire de

gp130 dès qu'il existe un excès molaire de sgp130 conduisant ainsi à l'inhibition de la voie de trans-signalisation (241).

4.2.2.4. Activité de l'IL-6 et rôle dans la PR

L'IL-6 est une cytokine pléiotrope qui présente de multiples fonctions biologiques par son action sur différents tissus et types cellulaires. Il semble que la production de l'IL-6 n'est pas spontanée (à l'exception par les adipocytes qui explique le faible taux sérique observé chez l'homme) mais dépendante de stimuli inflammatoires (245).

Dans la PR, des taux élevés d'IL-6 et de sIL-6R ont été décrits dans le sérum, la synoviale et le liquide articulaire des patients (246-248). Ces taux semblent être directement corrélés à différents aspects cliniques (nombre d'articulations gonflées, raideur matinale), biologiques (taux de CRP, VS, anémie ou le taux d'autoanticorps), fonctionnels ou d'activité de la maladie (249, 250).

4.2.2.4.1. Effets systémiques

L'IL-6 peut jouer un rôle dans les manifestations systémiques observées dans la PR. Elle induit la sécrétion par les hépatocytes, de protéines de phase aiguë, comme la CRP, le fibrinogène ou l'amyloïde sérique A que l'on retrouve dans le sérum des patients atteints de PR. Elle peut induire une anémie sévère chez les patients par la synthèse d'une autre protéine de la phase aiguë, l'hepcidine, régulateur négatif de l'absorption intestinale du fer et du largage de fer par les macrophages. L'IL-6 induit également la production de plaquettes expliquant la thrombocytose observée chez certains patients très inflammatoires. Elle joue également un rôle sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien responsable des symptômes généraux tels que fièvre, asthénie, fatigue et perte de poids ou d'appétit observés dans des PR très actives (244, 251).

4.2.2.4.2. Effets immunologiques

Un des rôles principaux de l'IL-6 dans la PR semble être immunologique. Impliquée dans le développement de la réponse immune adaptative, elle joue un rôle important dans la physiopathologie de la PR en agissant sur les lymphocytes B ou T et particulièrement sur l'induction des T_H17.

Initialement décrite comme un facteur de différenciation des cellules B, l'IL-6 joue un rôle important dans le développement des plasmocytes et sur la production d'immunoglobulines ou d'autoanticorps (FR ou anti-CCP).

L'IL-6 joue un rôle dans le développement des lymphocytes T et notamment des cellules T_H17 comme nous l'avons vu précédemment. En effet chez la souris, les CD4 naïfs selon l'environnement cytokinique peuvent en présence de TGFβ seul se différencier en Treg ou lors de présence combinée de TGFβ et d'IL-6 en cellules T_H17. Un rôle dans la balance de l'inflammation aiguë à chronique a également été attribué à l'IL-6 pour ses effets sur les neutrophiles, importants médiateurs de l'inflammation et de la destruction articulaire dans la PR. L'IL-6 induit la production par les neutrophiles de chémokines et de récepteurs aux chémokines impliqués dans le recrutement des leucocytes et des monocytes et intervenant dans le maintien de processus inflammatoires chroniques (252).

4.2.2.4.3. Effets locaux sur la synoviale, l'os et l'articulation

Enfin l'IL-6 semble jouer un rôle complexe sur l'os et les articulations dans la PR participant ainsi, à la synovite, aux destructions ostéoarticulaires ou à l'ostéoporose chez ces patients.

Rôle sur les RAFLS

Les RAFLS sont des producteurs importants d'IL-6 dans la synovite des patients et sa production est induite principalement par le TNF α , l'IL-17 et l'IL-1 β (192).

Comme nous l'avons vu précédemment, l'IL-6 seule n'agit pas sur le RAFLS, c'est le complexe IL-6/sIL-6R qui induit la prolifération des RAFLS, la production de facteurs angiogéniques (principalement le VEGF) ou l'expression et la production de RANKL induisant la différenciation ostéoclastique et ainsi la destruction articulaire (253, 254).

Enfin l'IL-6 a été décrite pour augmenter la production de pro-matelloprotéases (importants médiateurs de destructions articulaires comme proMMP-1 et proMMP-3) induites par l'IL-1 β par les FLS de même que la production de leurs inhibiteurs naturels (les TIMPs).

Rôle IL-6 sur l'os

Comme cela été démontré précédemment pour le TNF α , l'IL-6 peut induire l'ostéoclastogénèse impliquée dans les érosions osseuses et contribuer ainsi aux destructions articulaires soit de manière indirecte par la production de RANKL via les ostéoblastes ou via l'IL-17 produits par les cellules T_H17 activées, soit de manière directe sur la différenciation ostéoclastique (252). Des taux sériques élevés d'IL-6 et de sIL-6R sont d'ailleurs rapportés pour être corrélés aux destructions radiologiques dans la PR (255).

L'IL-6 joue un rôle dans le recrutement des ostéoclastes par leur action sur les cellules souches hématopoïétiques de la lignée granulocyte-macrophage. Dans l'arthrite induite à collagène, les souris IL-6 $^{-/-}$ développent des arthrites moins sévères et montrent une diminution du nombre des ostéoclastes et du recrutement de ces cellules aux sites articulaires (256).

L'IL-6 peut donc intervenir dans la perte osseuse systémique ou l'ostéoporose localisée aux articulations durant la maladie articulaire inflammatoire.

Le blocage de cette cytokine ou de sa signalisation dans la PR s'est avéré une approche intéressante tant sur le plan systémique, inflammatoire ou osseux, que local sur la synovite ou les destructions ostéoarticulaires.

4.2.2.5. Le blocage de l'IL-6/IL-6R

Le blocage de la voie de l'IL-6 peut se faire via des anticorps dirigés contre l'IL-6 ou son récepteur.

Anticorps anti-IL-6

Wendling et al en 1993 dans une étude ouverte sur 5 patients PR rapporte l'efficacité sur les paramètres cliniques et biologiques d'un anticorps monoclonal de souris anti-IL-6 (B-E8, IgG1) administré en intra-veineux (10 mg/kg, 10 jours de suite). Bien qu'aucun effet secondaire n'ait été observé, il signale un effet transitoire du traitement avec une récurrence des symptômes (en moyenne après 2 mois) et une augmentation des taux sériques d'IL-6 durant la période de traitement ce qui était inattendu et en contraste aux effets anti-inflammatoires observés (257). En réalité, cette observation n'est pas étonnante, puisque le blocage de la cytokine circulante ne suffit pas à bloquer la signalisation de l'IL-6 médiée principalement par le complexe IL-6/sIL-6R/gp130.

Anticorps anti-IL-6R

Un anticorps dirigé contre le récepteur de l'IL-6 a été ensuite développé dans le but de cibler les cellules exprimant l'IL-6R, mais également les cellules ne l'exprimant pas, bien que capables de répondre à l'IL-6 du fait de la présence à leur surface de gp130 se liant au complexe IL-6/sIL-6R. Appelé initialement MRA (pour *Myeloma Receptor Antagonist*), le tocilizumab (RoActemra®), est un anticorps murin humanisé de classe IgG1 dirigé contre le récepteur (membranaire ou soluble) de l'IL-6 (258).

De nombreuses études réalisées dans la PR ont montré l'efficacité de la molécule en cas d'échec au MTX en monothérapie ou en association, sur la clinique ainsi que sur l'effet structural articulaire ou la progression des lésions radiographiques. Ce traitement chez l'homme présente également une bonne tolérance même si certains effets secondaires ont été observés: infections (bien que le risque infectieux soit équivalent aux autres biothérapies), cytolyse hépatique, neutropénie, hypercholestérolémie, risque de malignité, réactions lors de la perfusion et complications digestives (259).

Le tocilizumab est commercialisé et remboursé en Belgique pour la PR sévère en échappement thérapeutique aux DMARDs et anciennement à un anti-TNF α , depuis juin 2011 cette condition n'est plus nécessaire. Il s'administre à la dose de 8 mg/kg en perfusion mensuelle. D'autres indications de ce traitement sont à l'essai actuellement comme l'arthrite juvénile de forme systémique, la maladie de Castleman, la Spondylarthrite Ankylosante, la maladie de Still de l'adulte, la maladie de Crohn, le lupus et le myélome multiple.

4.2.3. L'IL-1 et son récepteur

Première interleukine définie selon la nomenclature internationale, la molécule de l'IL-1 est décrite depuis les années'40 et a connu différentes appellations (260, 261). Son ADNc a été cloné en 1984 (262). Il s'agit d'une cytokine jouant un rôle important dans la physiopathologie de la PR (263). L'IL-1 a en commun avec le TNF α , un large spectre d'activité biologique et agit souvent en synergie avec elle ou avec d'autres cytokines (264, 265).

4.2.3.1. Famille de l'IL-1

L'IL-1 est une interleukine de la famille de l'IL-1 comportant actuellement 11 membres. Seuls l'IL-1 α , l'IL-1 β , l'IL-1Ra, l'IL-18 (ou IL-1F4) et l'IL-33 (ou IL-1F11) ont été bien étudiés à ce jour; le rôle des autres membres, IL-1F5, IL-1F6, IL-1F7, IL-1F8, IL-1F9 et IL-1F10 est encore à démontrer (261).

L'IL-1 α et l'IL-1 β sont des cytokines pro-inflammatoires (+/-17kDa). Elles sont toutes les deux synthétisées à partir de précurseurs (pro-IL-1 α et pro-IL-1 β de +/- 31kDa) par différentes cellules. Elles sont codées par deux gènes différents situés sur le chromosome 2 et chaque gène comprend 7 exons. Ces deux protéines ont 26 % d'homologie. La pro-IL-1 α est biologiquement active et peut être clivée par une protéase, la calpaïne, en une protéine mature plus petite. Dans le noyau des cellules vivantes, cette protéine associée à la chromatine est hautement dynamique. L'IL-1 α est essentiellement liée à la membrane cellulaire et est principalement intracellulaire. À la différence, pour être activée sous forme d'IL-1 β et être sécrétée, la pro-IL-1 β , biologiquement inactive, doit être clivée, principalement par la caspase-1 (ou ICE pour *IL-1 β convertase enzyme*), elle-même activée par un complexe protéique appelé « inflammasome » (266). La pro-IL-1 β représente essentiellement la forme extracellulaire de l'IL-1. Bien que le macrophage soit la principale source d'IL-1, d'autres cellules peuvent la sécréter (fibroblastes, kératinocytes, lymphocytes B principalement) (265, 266).

L'IL-1Ra est un antagoniste endogène du récepteur de l'IL-1 qui existe sous 3 formes intracellulaires (icIL-1Ra1, icIL-1Ra2 et ic-IL-Ra3) et une forme sécrétée (sIL-1Ra). Il est produit essentiellement par les monocytes et les macrophages activés. Il s'agit d'un inhibiteur naturel de l'IL-1 qui entre en compétition avec l'IL-1 et l'empêche de se fixer sur ses récepteurs et ainsi de transmettre le signal de la voie de l'IL-1 (267, 268).

4.2.3.2. Les récepteurs de l'IL-1

Il existe deux récepteurs transmembranaires de l'IL-1 le type I et II.

L'IL-1RI est une glycoprotéine de 80-kDa se liant à l'IL-1 β pour former un complexe, qui recrute ensuite une protéine accessoire du récepteur de l'IL-1, l' IL-1RAcP, pour initier et amplifier la signalisation de la voie d l'IL-1 (269). A la différence, l'IL-1RII est un récepteur « leurre » se liant à l'IL-1 β pour la neutraliser (270). Il s'agit d'une glycoprotéine de 68-kDa partageant une grande homologie avec la portion extracellulaire de l'IL-1RI, mais qui s'en

distingue par sa portion intracytoplasmique plus courte, incapable d'assurer la transduction du signal de l'IL-1.

Ces 3 récepteurs (IL-1RI, IL-1RII et IL-1RAcP) peuvent également exister sous forme soluble (après un clivage enzymatique membranaire), où sIL-1RII et sIL-1RAcP peuvent jouer un rôle inhibiteur de la signalisation de l'IL-1 en séquestrant l'IL-1 β .

Enfin, l'IL-1 β peut par sa liaison au IL-1RII recruter l'IL-1RAcP et priver ainsi IL-1RI de sa protéine accessoire.

Toutes les cellules semblent exprimer ces récepteurs et la présence des récepteurs solubles est détectable chez des sujets normaux (261). Ainsi, l'activité de l'IL-1 β dépend de la balance entre la cytokine, ses récepteurs et ses inhibiteurs.

4.2.3.3. Signalisation de l'IL-1/IL-1R

La signalisation de l'IL-1 débute après formation du complexe IL-1 β /IL-1RI/IL-1RAcP, par l'activation d'une protéine adaptatrice MyD88 qui se lie au domaine TIR de la partie intracellulaire du récepteur. La présence d'un *death domain* dans MyD88 permet le recrutement de kinases activées (IRAK1-4 pour *Interleukin receptor-associated kinase 1-4*) qui ensuite se lient avec d'autres protéines adaptatrices (TRAF-6) conduisant à l'activation d'autres kinases (JNK, ERKs et IKK) et finalement de facteurs de transcription (NF κ B par exemple) impliqués dans la régulation d'expression de gènes de l'inflammation ou de cytokines (IL-6, TNF α ..) et de chémokines (CCL2, IL-8..)(261).

4.2.3.4. Activités biologiques de l'IL-1

L'IL-1 possède de nombreuses activités biologiques systémiques et locales impliquées dans la physiopathologie de plusieurs situations inflammatoires aiguës ou chroniques dont la PR.

Son rôle systémique a été démontré dans certaines maladies dites « auto-inflammatoires » héréditaires où il existe une production excessive d'IL-1 β due à l'activation de l'inflammasome. Ces maladies se distinguent des maladies auto-immunes par l'absence d'autoanticorps ou de lymphocytes T activés et sont principalement liées à une anomalie de l'immunité innée. Elles se caractérisent le plus souvent par des fièvres récurrentes, des arthrites, des manifestations cliniques liées à un environnement inflammatoire et des taux massifs de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF α et IL-6). La plupart de ces maladies autoinflammatoires sont familiales et liées à la présence de mutations d'un seul gène, cependant certaines maladies complexes comme la maladie de Behçet, la maladie de Crohn voire la goutte semblent également y appartenir (271, 272).

L'injection d'IL-1 β provoque de la fièvre, par son effet sur le centre thermorégulateur hypothalamique, de l'anorexie, de l'hypotension, de la leucopénie et de la thrombopénie (273). L'IL-1 β est un médiateur systémique qui agit comme une véritable « hormone de l'inflammation » sur différents tissus, contrairement à l'IL-1 α qui est principalement un régulateur intracellulaire et un médiateur local de l'inflammation. L'IL-1 peut être un inducteur de cytokines pro-inflammatoires (dont celles de la famille de l'IL-1 et du TNF α ou

de l'IL-6), de production de protéines hépatiques aiguës de l'inflammation, et de stimulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien par la production d'ACTH (pour *Adreno Cortico Trophic Hormone*), de somatostatine ou d'hormone de croissance...

4.2.3.5. L'IL-1 dans la PR

Des taux élevés d'IL-1 β plasmatiques et surtout synoviaux sont observés dans la PR en comparaison aux contrôles sains ou à d'autres conditions articulaires (inflammatoires, dégénératives, ou traumatiques) et ces taux sont corrélés à l'activité clinique de la maladie (274, 275). Bien que des auteurs remettent en cause le rôle anti-inflammatoire de l'IL-1Ra, du fait d'une production mesurée plus importante dans l'arthrose que dans la PR, suggérant dès lors que la sécrétion d'inhibiteur naturel de l'IL-1Ra est supprimée dans cette pathologie, l'effet global de l'IL-1 β dans la PR pourrait résulter d'un déséquilibre entre une production synoviale insuffisante d'IL-1Ra pour contrebalancer la production excessive d'IL-1 β (276, 277).

La source principale d'IL-1 β dans la synovite provient des macrophages et des RAFLS (194, 276). Dans la synoviale, l'IL-1 induit principalement la production de cytokines inflammatoires (comme le TNF α , l'IL-6 et l'IL-1). Elle agit aussi sur la prolifération des RAFLS (278) et participe à la destruction du cartilage (via les chondrocytes) et à l'apparition des érosions osseuses (via l'expression de RANKL sur les RAFLS ou les macrophages favorisant ainsi l'ostéoclastogénèse et la résorption osseuse) (279-281). Elle est également décrite pour intervenir dans l'induction et la différenciation des cellules T_H17 (en combinaison avec l'IL-6 ou avec l'IL-23) (123, 124). L'IL-1 β a aussi la particularité d'agir en synergie avec le TNF α sur ces diverses fonctions biologiques comme nous le confirmerons dans nos expériences.

Le rôle de l'IL-1 dans la PR a été mis en évidence dans de nombreux modèles murins. L'injection intra-articulaire unique d'IL-1 β recombinant murin provoque chez la souris une rupture rapide de la synthèse de protéoglycans dégradant ainsi le cartilage alors que très peu d'inflammation locale est observée localement dans l'articulation. Cependant, si les injections intra-articulaires sont répétées, on peut observer une infiltration massive de cellules inflammatoires accompagnée d'une extravasation cellulaire dans l'espace articulaire, et d'une dégradation du cartilage (280).

Lors d'un transfert de gène humain IL-1 β dans les articulations de lapin, l'exposition chronique à l'IL-1 β conduit au développement d'une forme hautement agressive d'arthrite similaire à celle de la PR (inflammation intense, infiltration massive de leucocytes, d'hypertrophie synoviale et d'hyperplasie, de formation d'un pannus agressif avec érosions du cartilage articulaire et osseux péri-articulaire). Des effets systémiques sont également observés, de même qu'une élévation des taux de TNF α et d'IL-1 β dans le liquide articulaire (282).

4.2.3.6. Blocage de l'IL-1

D'autre part le blocage de l'IL-1 dans les modèles murins a également supporté le rôle de cette cytokine dans l'arthrite. L'IL-1 β comme le TNF α joue un rôle fondamental dans le

développement d'arthrite dans le modèle CIA. Le blocage du $\text{TNF}\alpha$ dans ce modèle, améliore les arthrites s'il est administré directement avant ou peu après leur apparition. Alors que le blocage de l'IL-1 peut empêcher l'initiation et le maintien des arthrites dans la CIA. Joosten et son équipe ont constaté que le $\text{TNF}\alpha$ avait un effet plus important sur l'inflammation locale et aux stades précoces de l'arthrite, mais moindre sur les lésions ostéocartilagineuses. Alors que l'IL-1 β a moins d'effet sur l'inflammation initiale articulaire mais semble plus impliquée dans l'infiltration cellulaire et la destruction ostéocartilagineuse (283).

Le modèle murin KO pour IL-1Ra est un autre modèle spontané d'arthrite démontrant le rôle de l'IL-1 (284). Koenders et al ont observé dans ce modèle des taux élevés de cellules $\text{T}_{\text{H}}17$ détectés avant l'apparition d'arthrites, où l'IL-17 semble contribuer au développement de l'inflammation et des érosions osseuses suggérant ainsi que l'IL-1 est fortement impliquée dans la production d'IL-17 par ces cellules (285).

Toutes ces données expérimentales supportent bien le rôle de la voie de l'IL-1 dans la physiopathologie de la PR, et l'intérêt de son blocage dans son traitement. Différentes approches de blocage ont été développées. L'administration d'IL-1RI recombinant de a été testée dans une petite étude sans succès (286). À l'inverse, l'antagoniste recombinant humain du récepteur de l'IL-1, l'anakinra (metHuIL-1Ra) ou Kineret® s'est montré plus intéressant. L'administration sous-cutanée quotidienne de cette molécule a montré une efficacité clinique ainsi qu'une bonne tolérance chez les patients avec une PR active dans plusieurs études randomisées, en association avec le MTX ou en monothérapie (287-289). Cependant, l'efficacité de cette molécule même s'il n'existe pas d'études comparatives le démontrant, semble moins bonne en comparaison aux biothérapies disponibles. En Belgique, cette molécule n'est d'ailleurs pas disponible pour les patients atteints de PR, alors qu'elle est dans d'autres pays. On pense aujourd'hui que le manque d'efficacité de cette molécule peut être lié au mauvais principe de blocage de l'IL-1; la demi-vie trop courte de la molécule ou la nécessité de dose importante d'IL-1Ra pour contrebalancer l'excès d'IL-1 peut y contribuer. L'effet moindre observé ne semble pas être lié à l'importance attribuée à l'IL-1 β dans la physiopathologie de la PR en comparaison à l'effet du $\text{TNF}\alpha$ (290).

Puisqu'une synergie est décrite entre le $\text{TNF}\alpha$ et l'IL-1 β dans la synovite rhumatoïde, certains auteurs ont tenté de traiter des PR actives en bloquant les 2 voies par combinaison d'éta nercept et d'anakinra. Aucune supériorité de la combinaison des deux biothérapies n'a été observée sur l'efficacité clinique, à l'inverse des effets secondaires qui sont plus importants (par ex: infections sévères, neutropénie et réactions au site d'injection) (291).

Il existe d'autres molécules pour bloquer la voie de l'IL-1: des anticorps monoclonaux anti-IL-1 (Canakinumab), un récepteur soluble dimérique, appelé anti-IL1 trap (ou Rilonacept) composé des domaines de liaison des parties extracellulaires du récepteur de type I (IL-1R1) et d'une protéine accessoire du récepteur (IL-1RAcP) liés à la portion Fc de l'immunoglobuline humaine IgG1, ou des anticorps monoclonaux anti-IL-1R (AMG108). Ces différentes voies d'approches sont étudiées pour certaines dans la PR mais principalement dans d'autres maladies où leur indication semble plus pertinente comme dans l'arthrite juvénile de forme systémique, les maladies autoinflammatoires héréditaires ou la goutte chronique (292-294).

4.2.4. L'IL-17 et son récepteur

Nous venons de présenter les principales cytokines jouant un rôle dans la synovite rhumatoïde pour lesquelles nous disposons de molécules thérapeutiques visant à bloquer leur effet dans la PR. Cependant, d'autres cytokines semblent aussi avoir un rôle important dans la pathogénèse de la PR, expliquant probablement en partie, l'échappement thérapeutique observé à ces biothérapies disponibles à ce jour. Parmi ces cytokines, l'interleukine-17 semble avoir une place intéressante dans la PR, même si les études sont encore discutées, elle pourrait constituer le bras armé des lymphocytes T dans la pathogénie de la PR, et son blocage en fait une voie thérapeutique prometteuse.

4.2.4.1. Découverte, description et structure

Découverte en 1993, appelée initialement CTLA-8 puis IL-17 et plus récemment IL-17A, cette cytokine est décrite comme un produit de cellules T activées ayant un rôle sur les cellules mésenchymateuses et sur la production d'une série de cytokines associées à l'inflammation. (295-297). Elle est ensuite définie pour appartenir à un profil de sécrétion cytokinique propre à un nouveau sous-groupe cellulaire T, les lymphocytes T_H17 comme nous l'avons déjà vu précédemment. Ce profil cytokinique comprend l'interleukine-17 (ou IL-17A), l'IL-17F, l'IL-21 et l'IL-22. Toutes ces molécules participent à la réponse inflammatoire et sont impliquées dans la défense contre les pathogènes extracellulaires et les champignons, de même que dans certaines maladies inflammatoires chroniques.

4.2.4.2. Famille de l'IL-17

L'IL-17 est une glycoprotéine dimérique de 2 x 155 acides aminés. Son gène (ainsi que celui de l'IL-17F) est situé sur le chromosome 6p12. Cette cytokine appartient à la famille de l'IL-17, caractérisée par une séquence de 4 cystéines comprenant 6 membres: l'IL-17A, l'IL-17B, l'IL-17C, l'IL-17D, l'IL-17E (= l'IL-25 qui est une cytokine non produite par les T_H17 mais par les T_H2) et l'IL-17F. Chaque cytokine semble avoir une activité biologique qui lui est propre. L'IL-17A et l'IL-17F sont les plus homologues, partageant 50% de leurs acides aminés et sont impliquées dans une variété de maladies auto-immunes et inflammatoires, notamment la PR même si le rôle de l'IL-17F est plus discuté (298-300).

4.2.4.3. Famille des IL-17R

La famille IL-17R comprend 5 membres: l'IL-17RA, l'IL-17RB, l'IL-17RC, l'IL-17RD et l'IL-17RE.

L'IL-17RA forme avec l'IL-17RC le récepteur de l'IL-17A et de l'IL-17F (sous forme homo ou hétérodimère) mais il forme également avec l'IL-17RB le récepteur de l'IL-17E. La signalisation via ce dernier récepteur stimule une immunité plutôt de type T_H2.

L'IL-17RB peut également se lier avec l'IL-17B avec une moindre affinité (301).

À l'exception de l'IL-17RA, des épissages alternatifs des gènes ont été décrits pour tous les autres récepteurs. En effet, l'IL-17RB et l'IL-17RC possèdent une forme membranaire assurant la signalisation et une forme soluble qui peut agir comme un leurre par leur capacité à se lier au ligand (302). L'IL-17RA est exprimé sur toutes les cellules hématopoïétiques ainsi que sur les ostéoblastes, les cellules endothéliales et épithéliales expliquant ainsi les effets multiples de l'IL-17 (300).

Les voies de signalisation de l'IL-17 avec son récepteur ne sont pas encore très claires. Il semble qu'il y ait un recrutement de TRAF6 et de TAK1 via Act1 associée à l'IL-17RA et l'IL-17RC (301, 303, 304). Quoi qu'il en soit, l'IL-17 semble partager de nombreuses voies de transcription avec l'IL-1 β , les TLR et le TNF α résultant dans l'activation de NF κ B et la voie des MAP kinases (incluant ERK1, ERK2, JNK et p38) avec pour conséquence une expression amplifiée de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire.

4.2.4.4. Présence de l'IL-17 et de son récepteur dans la PR

Plusieurs auteurs ont démontré une présence accrue d'IL-17 dans le tissu synovial, le liquide articulaire ou le sérum de PR en comparaison aux patients arthrosiques ou contrôles (305-308). La concentration d'IL-17 dans le sérum, et l'expression du gène dans la synovite rhumatoïde, présentent essentiellement dans les zones riches en cellules T et dans les zones périvasculaires, semblent être associés à l'activité et la sévérité de la maladie, et la réponse aux anti-TNF α (308, 309).

L'IL-17RA est exprimé sur toutes les cellules de la synovite (301, 310). La liaison de l'IL-17 à son récepteur est responsable d'effets particulièrement pertinents dans la PR: production de cytokines inflammatoires (TNF α , IL-6 et IL-1 β) par les cellules synoviales, production des MMP par les RAFLS et les macrophages et expression de RANKL par les ostéoblastes..

4.2.4.4.1. *Modèle murin*

Chez la souris, en effet, la simple injection d'IL-17 dans l'articulation suffit à induire une inflammation articulaire (311). À l'inverse, les souris KO pour l'IL-17 sont partiellement protégées de la CIA. Dans ce modèle, une diminution de la réponse cellulaire T spécifique aux antigènes ainsi qu'une production moindre d'anticorps spécifique du collagène sont observés (312). De même, des anticorps anti-IL-17 ou un récepteur soluble (sIL-17R fusion FC IgG1) améliorent les symptômes articulaires des souris (313, 314).

Chez l'homme, les effets de l'IL-17 dans la synoviale ont été abondamment étudiés.

4.2.4.4.2. *Rôle de l'IL-17 sur les FLS et les macrophages*

Un des rôles fondamentaux de l'IL-17 dans la physiopathologie de la PR est d'induire la production de médiateurs inflammatoires par les cellules de la synoviale principalement les RAFLS et les macrophages.

L'IL-17 est décrite pour stimuler la production et l'expression du TNF α et de l'IL-1 β par le macrophage humain (315). Sur les RAFLS, l'IL-17 induit la production d'IL-6 et d'IL-8, mais moindre que ne le font l'IL-1 β ou le TNF α (305). La production de ces cytokines par les RAFLS sous l'effet de l'IL-17 est nettement majorée si elles ont déjà été induites par de l'IL-1 β ou du TNF α . Par contre, il y a une synergie entre l'IL-17 et le TNF α ou l'IL-1 β sur la production d'IL-6 ou d'IL-8 par les RAFLS (310). Un effet synergique est également rapporté entre le TNF α , l'IL-1 β et l'IL-17 sur la production par le RAFLS de CCL20, une chémokine impliquée dans la migration des lymphocytes T mémoires et des cellules dendritiques immatures (316).

Enfin, des travaux récents ont indiqué que l'IL-17 pouvait également jouer un rôle sur la prolifération des RAFLS. Certains auteurs ont montré dans un modèle murin (SCWA) que l'IL-17 induit la synovioline, une molécule susceptible de prolonger la survie des RAFLS (317). De même, on décrit un rôle de l'IL-17 dans la régulation de la prolifération des RAFLS via le contrôle de l'expression Cyr61, une molécule d'adhésion, impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire (318).

4.2.4.4.3. *Rôle de l'IL-17 dans la dégradation ostéocartilagineuse*

L'IL-17 joue un rôle dans la dégradation du cartilage en bloquant la synthèse de protéines matricielles par les chondrocytes ou en stimulant la libération d'enzymes de dégradation du cartilage par les RAFLS, les chondrocytes et les macrophages. Il est récemment apparu que l'IL-17 joue un rôle important sur la stimulation de l'axe RANK/RANKL dans la PR (319).

4.2.4.4.4. *Blocage de l'IL-17*

Ainsi, l'IL-17 semble avoir plusieurs fonctions pathogéniques dans la synovite rhumatoïde, son blocage pourrait être dès lors une approche thérapeutique intéressante. Deux anticorps monoclonaux humanisés anti-IL-17A sont en cours d'évaluation dont le Secukinumab (AIN457) et le LY2439821 (320, 321).

5. Évolution et Mesure d'activité de la PR

La PR est une maladie chronique dont l'évolution naturelle n'est pas prévisible pour un patient déterminé puisqu'elle peut être progressive et active au cours du temps, elle peut aussi évoluer en poussée avec des phases d'accalmie ou au contraire être peu symptomatique malgré une progression à bas bruit, responsable de destruction ostéoarticulaire sous-jacents. À ce jour, on ne dispose pas de marqueurs prédictifs de son évolution au moment du diagnostic.

À la différence, on dispose de marqueurs d'activité de la maladie. Les symptômes et l'impotence fonctionnelle secondaire sont des paramètres importants dans l'évaluation de l'activité de la maladie, au même titre que les paramètres biologiques inflammatoires ou l'examen physique et l'appréciation de l'état du malade par le médecin. Enfin, l'évolution radiologique des articulations doit également être considérée pour juger de l'activité de la PR et de ses conséquences.

Depuis 1993, dans le but d'uniformiser des essais thérapeutiques et la réponse au traitement, des critères d'activité de maladie ont été mis au point par les organisations rhumatologiques internationales, l'American Collège of Rheumatology (ACR) et l'European League Against Rheumatism (EULAR), en association avec des méthodologistes de l'Outcome Measures in Rheumatology (OMERACT) (322-325). Ces critères reposent principalement sur des paramètres inflammatoires et sur les symptômes perçus par le patient. Les paramètres inflammatoires concernent le nombre d'articulations gonflées (NAG), le nombre d'articulations douloureuses (NAD) et l'inflammation biologique (VS ou CRP). Les symptômes reposent sur la douleur évaluée par le patient sur une échelle visuelle analogique (EVA), la capacité fonctionnelle évaluée par le patient par des échelles validées comme le HAQ pour *Health Quality Scale* ou le SF-36 (pour *short form health survey*) et l'appréciation globale de l'activité de la maladie évaluée par le patient et le médecin (326, 327).

Ces paramètres permettent de calculer des scores d'activité ou de rémission de la maladie ainsi que des critères de réponse au traitement. Validés pour être utilisés en routine clinique, ils permettent d'améliorer l'évaluation de la PR, son suivi ainsi que l'efficacité de ses traitements (328).

Nous avons utilisé ces critères dans nos travaux, afin de discriminer les répondeurs aux agents bloquant le TNF α des non-répondeurs. Les paragraphes ci-dessous en contiennent une brève description.

Le *Disease Activity Score* (DAS) (*Tableau 4*) est une échelle d'activité développée par l'EULAR (329). Cet score sera simplifié sur base de l'examen de 28 articulations appelé le DAS28-CRP ou -VS qui prend en considération la mesure de 3 ou 4 paramètres (330). Il permet de distinguer les différences d'activité de la PR: on définira une PR très active lorsque le $DAS28 > 5.1$, une PR modérément active lorsque $3.2 < DAS28 \leq 5.1$, une PR faiblement active si le $DAS28 \leq 3.2$. La rémission de la maladie est initialement définie si le $DAS28 \leq 2.6$ (ou un $DAS < 1.6$), même si certains auteurs discutent encore le seuil de rémission pour l'abaisser à 2,4 (331, 332).

DAS = 0.56 x racine (NAD28) + 0.28 x racine (NAG 28) + 0.33 x log VS + 0.0142 x EVA état global du patient
DAS28-4 (CRP) = 0.56 x racine (NAD28) + 0.28 x racine (NAG28) + 0.36 x log (CRP mg/L+1) + 0.014 x (EVA état global du patient) + 0.96
DAS28-3 (CRP) = [0.56 x racine (NAD28) + 0.28 x racine (NAG28) + 0.36 x log (CRP+1)] x 1.10 + 1.15
DAS28-4 (VS) = 0.56 x racine (NAD28) + 0.28 x racine (NAG28) + 0.7 x log (VS) + 0.014 x (EVA état global du patient)
DAS28-3 (VS) = [0,56 x racine (NAD28) + 0,28 x racine (NAG28) + 0,7 x log (VS)] x1.08 + 0.16

Tableau 4. Mesure du score DAS 28.

L'indice DAS 28 mesure un score d'activité de la maladie sur 28 articulations (que l'on évalue comme douloureuses ou gonflées). Ce score comprend également d'autres paramètres, comme les paramètres biologiques inflammatoires avec la mesure de la VS (mm/h) ou de la CRP (mg/L). On peut également considérer un 4^{ème} paramètre (on parle alors du DAS28-4 variables) dans le calcul du score d'activité de la maladie en y ajoutant l'appréciation globale de l'état général du patient mesuré par une échelle visuelle analogique sur 100mm (333). *DAS: Disease activity score; NAD28: Nombre d'articulation douloureuse; NAG28: nombre d'articulation gonflée; CRP: C-reactive protein; EVA= échelle visuelle analogique 100 mm. Racine = √*

Parmi les critères de réponse au traitement, on distingue les critères de réponse américains (critères de réponse de l'ACR) et les critères de réponse européens (critère de réponse de l'EULAR).

Les critères de réponse de l'ACR (Tableau 5) sont mesurés selon l'évolution d'un pourcentage d'amélioration (20%, 50%, 70% ou 90%) d'un certain nombre de paramètres cliniques, biologiques ou fonctionnelles. On considère les patients comme répondeurs dès une réponse ACR20. La rémission est définie selon la FDA (pour *Food Drug and Administration*) comme une réponse clinique majeure (ACR70) maintenue pendant 6 mois consécutifs, sans progression structurale et sous le même traitement de fond (334). Souvent utilisés dans les études cliniques, ils le sont moins facilement dans la pratique courante.

Les Critères de réponse de l'ACR (Mesurés a partir de 7 variables)
Nombre d'articulations douloureuses /68 (=NAD) Nombre d'articulations gonflées /66 (=NAG) Échelle visuelle analogique de la douleur en mm /100 Échelle visuelle analogique de l'activité de la maladie par le patient en mm /100 Échelle visuelle analogique de l'activité de la maladie par le médecin en mm /100 Évaluation de la fonction physique par le patient (par le HAQ par exemple) Variables biologiques (VS ou CRP)

Tableau 5. Critères de Réponse de l'ACR.

On définit la **réponse ACR20, ACR50, ACR70 ou ACR90** en fonction de la diminution sous l'effet du traitement de 20%, 50%, 70% ou 90 % du nombre de NAG ou NAD associé à la diminution de 20%, 50%, 70% ou 90 % d'au moins 3 des 5 dernières variables. Définis au départ par l'*American Rheumatism Association* (ARA actuellement ACR) en 1981 ces critères ont été revisités en 1995 (330, 335).

Les critères de réponse de l'EULAR (*Tableau 6*) sont calculés sur base de l'évolution de l'activité de la maladie (par la mesure du DAS28) sous l'effet du traitement et du score d'activité final. Ce score permet de distinguer les patients en bons répondeurs, répondeurs modérés et mauvais répondeurs (324). Ces critères sont utilisés dans les études cliniques et régulièrement en pratique courante.

Critères de réponse de l'EULAR			
DAS 28 activité	Réponse thérapeutique (différence entre le DAS 28 initial et final)		
	Différence > 1,2	0,6 < Différence ≤ 1,2	Différence ≤ 0,6
DAS ≤ 3,2 <i>Activité faible</i>	Bonne réponse		
3,2 < DAS ≤ 5,1 <i>Activité modérée</i>		Réponse modérée	
DAS > 5,1 <i>Activité sévère</i>			Non réponse

Tableau 6. Critères de Réponse de l'EULAR.

La réponse thérapeutique EULAR sur l'activité de la maladie est obtenue par le différentiel de deux mesures du DAS28 au cours d'une période déterminée (par exemple en début ou fin de traitement). Ce différentiel de DAS28 est ensuite comparé à l'activité résiduelle de la maladie en fin de période et permet ainsi de définir une bonne réponse, une réponse modérée ou une non réponse au traitement. L'activité de la maladie est définie comme faible, modérée ou sévère en fonction de la mesure du DAS à un moment donné. *DAS= disease activity score.* (324).

6. Traitement de la PR

À ce jour, le défi du traitement de la PR réside dans le fait que cette maladie est hétérogène et que son évolution n'est pas prévisible à l'échelle individuelle: elle peut être chronique et rester modérée sans séquelle avec une évolution spontanément favorable ou au contraire rapidement progressive en s'accompagnant de lésions ostéoarticulaires irréversibles. Nous avons à l'heure actuelle très peu de marqueurs prédictifs de son évolution potentielle ou de son pronostic. Donner le bon médicament au bon moment et au bon patient reste un défi de taille dans la prise en charge de la PR.

Il est clairement établi qu'un traitement de fond antirhumatismal (ou DMARDs pour *Disease-modifying antirheumatic drugs*), dont le chef de file reconnu est le Méthotrexate (MTX), doit être administré le plus tôt possible et surtout si la PR montre des signes d'activités ou de sévérité, bien que ces derniers soient encore mal définis (érosions osseuses, présence d'anti-CCP, HAQ>0,5), afin d'en améliorer le pronostic à plus long terme.

La réévaluation régulière de la maladie par la mesure de score d'activité de la maladie (DAS28) est indispensable pour définir l'état de rémission et pour déterminer les réponses au traitement (Δ DAS28 ou critère ACR20, 50 ou 70). La non réponse au traitement conduira à le modifier soit en augmentant les doses du traitement en cours, soit en le combinant à d'autres soit en s'orientant vers une autre molécule.

D'autres traitements de fond sont utilisés si le patient est intolérant ou en cas d'effets secondaires liés au MTX: l'hydroxychloroquine (Plaquenil®) et la sulfasazaline (Salazopyrine®) pour les polyarthrites modérées, le leflunomide (Arava®), l'azathioprine (Imuran®) ou la ciclosporine (Neoral®) pour les formes plus sévères. Préalablement, la combinaison de DMARDs était une option pour traiter les polyarthrites les plus sévères ou ne répondant pas à un traitement de fond instauré, cependant ces combinaisons thérapeutiques n'étaient pas dénuées d'effets secondaires immédiats (infections et troubles hématologiques, insuffisance hépatique ou rénale par exemple) ou à long plus terme (risque oncologique ou cardiovasculaire).

La corticothérapie (longtemps considérée comme le principal traitement avant l'avènement des DMARDs) s'est vue au cours du temps nettement réduite en terme de prise quotidienne. Les doses plus importantes étant réservées lors de poussées aiguës ou sévères de la maladie, ou lors d'atteinte systémique, permettant ainsi d'éviter les conséquences désastreuses liées à la prise chronique et prolongée de ces médicaments.

L'ère des biothérapies marquée par les agents bloquant le $\text{TNF}\alpha$, premiers agents biologiques disponibles, a bouleversé la prise en charge et le devenir des patients atteints de PR leur assurant un meilleur pronostic de vie, une meilleure qualité fonctionnelle, un ralentissement des déformations et des destructions ostéocartilagineuses avec une moindre impotence fonctionnelle secondaire. Comme nous l'avons déjà cité à plusieurs reprises dans cette introduction, nous disposons aujourd'hui d'un choix thérapeutique nettement plus large et efficace pour traiter nos patients (anti-cytokiniques contre le $\text{TNF}\alpha$, l'IL-6, l'IL-1, modulateurs de co-stimulation avec le CTLA-4 Ig, ou anti-cellulaires contre le CD20 des lymphocytes B). Les biothérapies dans la PR disponibles en Belgique sont reprises dans le Tableau 7.

Au début de nos travaux, il était recommandé d'initier une biothérapie par des agents bloquant le TNF α réservant une place aux autres biothérapies en cas d'échec d'au moins un anti-TNF α (336, 337). Aujourd'hui, en pratique quotidienne en Belgique, n'importe quelle biothérapie (agents bloquant le TNF α , abatacept et tocilizumab), à l'exception du rituximab (qui nécessite encore l'échec préalable d'un anti-TNF α), peut être accessible (et remboursée) en première intention pour les patients en échec (ou intolérance) d'au moins deux DMARDs et dont la PR reste active de manière modérée à sévère (par la mesure du DAS28>3,7).

En dépit de l'efficacité évidente des biothérapies, environs deux tiers des patients traités par anti-TNF α (voire par toute autre biothérapie) répondront à ces molécules alors qu'un tiers des patients n'y répondra pas, même après 6 mois d'utilisation. La prescription d'une autre biothérapie sera dès lors envisagée. En ce qui concerne les anti-TNF α , le choix peut s'orienter soit vers un autre agent bloquant le TNF α , soit un vers une autre voie de blocage.

L'absence de réponse « primaire » au traitement, qui concerne donc un tiers des patients, doit être distinguée d'une perte de réponse « secondaire » liée à la diminution d'effets du traitement initialement efficace en relation avec l'apparition d'anticorps contre les molécules thérapeutiques.

Les anticorps les plus fréquemment décrits sont des anticorps anti-chimériques (HACA pour *Human Anti-Chimeric antibody*) dirigés contre la partie murine de l'infliximab. 8 à 43% des patients développent ces anticorps au cours du traitement dans la PR (338, 339). Bien que discuté, l'ajout concomitant de méthotrexate, l'augmentation de la posologie d'infliximab ou un raccourcissement du délai entre les perfusions sont parfois proposés pour maintenir une efficacité thérapeutique (340, 341).

Des anticorps anti-adalimumab sont également décrits pour apparaître au cours du traitement mais leur influence sur la réponse clinique reste controversée même si des taux sériques élevés peuvent être associés à des concentrations sériques d'adalimumab plus basses et une moins bonne réponse au traitement (342, 343). La présence d'anticorps anti-« agents monoclonaux » chez les patients atteints de PR devenus réfractaires à un anti-TNF α a été décrite pour être associée à une meilleure réponse lors d'un switch thérapeutique vers un récepteur soluble (etanercept), et leur dosage en routine clinique pourrait être intéressant pour dépister les patients qui échappent au traitement bien que répondant initialement favorablement (344).

L'absence de réponse « primaire » à un agent bloquant le TNF α repose par contre sur des mécanismes inconnus, et c'est cette question que nous avons voulu aborder dans cette thèse.

Quelle que soit la raison de non-réponse à une biothérapie, de nombreuses conséquences sont à craindre de l'utilisation inadéquate d'un traitement biologique dans la PR: risque d'effets secondaires potentiels à court (infectieux par exemple) ou à long terme (encore peu connus comme le risque néoplasique), incertitude sur la nécessité de mise en route ou d'efficacité à l'échelle individuelle, risque de laisser évoluer une maladie non contrôlée, ou encore coût non négligeable de ces nouveaux traitements (+/- 1000 euros/mois).

C'est pourquoi l'identification des patients susceptibles de répondre à ce type de traitement avant leur mise en route est indispensable. Définir des marqueurs de réponse pour mieux sélectionner les patients pouvant bénéficier de ces biothérapies est nécessaire afin d'améliorer la balance bénéfice/risque tant pour le patient que sur le plan économique.

	Nom commercial	Principe et molécules	Mode	Posologie	Firme	Prix
AINS		Anti-inflammatoire non stéroïdien	PO (ou IM)			
	Corticostéroïdes	Medrol® (Solumedrol®)	PO (ou IV)			
DMARDS						
Methotrexate	Ledertrexate®	Antimétabolite	PO ou IM	7,5 à 15 mg/sem	Pfizer	7€/mois
Leflunomide	Arava®	Antimétabolite	PO	10-20 mg/j	Sanofi-Aventis	40-80€/mois
Sulfasalazine	Salazopyrine®	Immunomodulateur	PO	1,5-3 g/j	Pfizer	20€/mois
Hydroxy chloroquine	Palquenil®	Immunomodulateur	PO	200-400mgj	Sanofi-Aventis	4,2€/mois
Biothérapie						
Anti-TNFα						
Infliximab	Remicade®	AC monoclonal chimérique	IV	3-5 mg/kg/8 sem	MSD	581-1162€/mois
Adalimumab	Humira®	AC monoclonal humain	SC	40mg/2sem	Abbott	1087€/mois
Golimumab	Simponi®	AC monoclonal humain	SC	50mg /4 sem	MSD	1184€/mois
Certolizumab	Cimzia®	AC monoclonal humanisé >Fragment Fab pégylé	SC	200mg /2 sem	UCB	1014€/mois
Etanercept	Enbrel®	Récepteur soluble protéine de fusion IgG1Fc humaine anti-p75 TNFR	SC	50mg/sem	Pfizer	1167€/mois
Anti-IL-6						
Tocilizumab	Roactemra®	AC monoclonal agoniste du récepteur de l'IL-6	IV	8mg/kg/4sem	Roche	1083-1444€/mois
Anti-IL-1						
Anakinra	Kineret®	récepteur antagoniste recombinant du de l'IL-1	SC	100mg/j	AMGEN	
Canakinumab	Ilaris®	AC monoclonal humain anti-IL1 IL1-Trap-Portion extracellulaire IL-1RAcP et IL-1RI couplée Fc IgG humaine	SC	150 mg/8sem	NOVARTIS	5796€/mois
Rilonacept	Arcalyst®		SC	160mg/sem	Regeneron	
Blocage de co-stimulation						
Abatacept	Orencia®	Protéine de fusion CTLA4 -IgG	IV	500-1000mg/mois	BMS	868-1763€/mois
Anti-lymphocytes B						
Rituximab	Mabthera®	AC monoclonal chimérique anti-CD20	IV	2 cures/15j/min 6mois	Roche	6000 €/cure

Tableau 7. Les traitements actuels de la PR.

Le traitement des PR débutantes à modérées commence par la mise en route de molécules de type antalgique, anti-inflammatoire ou immunomodulatrice. Un traitement de fond est instauré d'emblée si la PR modérée s'avère active ou plus sévère. En Belgique, les biothérapies sont actuellement prescrites en cas d'échec ou d'intolérance au traitement de fond (au moins deux molécules) et si la maladie reste active de manière modérée à sévère (selon les critères DAS28). Le rituximab est administré après échec d'au moins un anti-TNFα. Toutes ces molécules sont prises en charge en Belgique par le système de sécurité sociale à l'exception des inhibiteurs de la voie de l'IL-1, dès lors non disponibles pour les patients. Certaines de ces biothérapies (infliximab, certolizumab, abatacept) nécessitent un schéma d'induction avant le schéma d'entretien décrit dans ce tableau. AINS: Anti-inflammatoire non stéroïdien, PO: per os, IM: intra-musculaire, AC: anticorps, IV: intra-veineux, SC: Sous-cutané. MSD: Merck Sharp & Dohme, UCB: Union Chimique Belge.

OBJECTIFS

OBJECTIFS

A l'heure actuelle, et ce de manière générale pour toutes les biothérapies, les agents bloquants le TNF α dans la PR sont très efficaces pour 30% des patients, modérément efficaces pour 40% d'entre eux, et inefficaces chez 30 % considérés dès lors comme « non répondeurs » au traitement avec un risque que la PR progresse, malgré des médicaments potentiellement « toxiques » et très coûteux.

A ce jour, aucun marqueur de réponse avant le début de la mise en route d'une biothérapie ne peut orienter notre choix thérapeutique.

De plus, nous ne disposons que peu d'informations sur les effets moléculaires dans la synoviale des patients en réponse au traitement par anti-TNF α ou par biothérapie en général.

1. Nous avons tout d'abord, cherché à déterminer les influences d'un traitement anti-TNF α sur les signatures moléculaires synoviales dans la PR.
2. Ensuite nous avons voulu savoir s'il existait une signature moléculaire synoviale pouvant prédire la réponse à ce traitement, et si parmi cette signature, certains marqueurs pouvaient être utilisables en routine clinique pour dépister des patients futurs non répondeurs aux agents bloquants le TNF α .
3. Enfin, nous aimerions déterminer quels pourraient être les mécanismes synoviaux impliqués dans la résistance aux traitements anti-TNF α .

RESULTATS

RESULTATS

1. Première publication

Nous avons commencé par étudier les effets de l'adalimumab, un anticorps monoclonal anti-TNF α sur les populations cellulaires (CD68+, CD15+, CD3+ et CD20+) et sur l'expression génique globale de biopsies synoviales prélevées chez 25 patients atteints de PR sévère et réfractaire aux DMARDs, avant et 12 semaines après l'instauration du traitement.

Nous avons observé, que l'adalimumab induisait une diminution significative du nombre de macrophages synoviaux (CD68+) chez tous les patients, un effet déjà décrit lors de l'utilisation d'agents bloquant le TNF α . Si l'on restreint ces analyses aux 20 patients qui ont répondu au traitement, on voit une diminution dans la synoviale du nombre de macrophages, mais également du nombre de lymphocytes T et de neutrophiles (et non de lymphocytes B).

Le profil d'expression des gènes a été déterminé en utilisant des micropuces (GeneChip HG U133 Plus 2.0), contenant pas moins d'un million de sondes, informatives pour environ 50.000 transcrits provenant d'au moins 40.000 gènes différents. Nous avons identifié 632 gènes différentiellement exprimés dans le tissu synovial en réponse au traitement. Ces gènes se regroupent dans des signatures moléculaires particulières, à savoir des gènes impliqués dans la « division cellulaire » et dans « la régulation de la réponse immunitaire » et leur expression diminue sous l'effet de l'adalimumab.

Nous avons ensuite démontré qu'il existe un profil d'expression de gènes spécifique (dont 411 étaient surexprimés et 28 réprimés) dans la synoviale des futurs non répondeurs au T0 (définis selon des critères de réponse validés par l'EULAR) en comparaison à des patients présentant une réponse modérée ou une bonne réponse. La signature de non réponse comprend principalement une surexpression de gènes impliqués à nouveau dans « la prolifération cellulaire » et dans « la régulation des réponses immunitaires » au sens large (comprenant interleukines et récepteurs d'interleukines).

Nous avons confirmé ces résultats en réalisant dans un premier temps des PCR en temps réel au départ d'ARN extrait des mêmes biopsies synoviales. Nous avons ainsi démontré que l'expression de certains gènes sélectionnés (comme *LTB*, *CCL5* ou *CTLA-4*) est bien diminuée sous l'effet du traitement. Ensuite, nous avons confirmé nos résultats par des études d'immuno-marquages de coupes synoviales (en congélation ou en paraffine), pour des protéines sélectionnées. Nous avons ainsi montré que l'expression de *Ki67* (molécule de prolifération), d'*IL-7Ralpha*, d'*IL-18rap*, d'*IL-18* ou de *CXCL11* (molécules impliquées dans la réponse immunitaire) est plus élevée dans le tissu synovial des futurs non répondeurs au T0.

Ensuite, nous nous sommes interrogés sur la signification de la signature identifiée chez les futurs non répondeurs. C'est pourquoi, nous avons réalisé des expériences *in vitro* sur des cultures de fibroblastes synoviaux issus de patients atteints de PR, et nous avons étudié par PCR en temps réel la régulation d'un panel représentatif de ces gènes (comme *IL-7Ralpha*,

IDO, *IL-6*: des molécules impliquées dans la réponse immunitaire et *CDC2*, *Ki67*, *GTSE1*: des molécules impliquées dans la prolifération cellulaire). Nous avons ainsi démontré que ces gènes sont induits dans les RAFLS par le $\text{TNF}\alpha$, mais également par l' $\text{IL-1}\beta$, ainsi que par des combinaisons synergiques de $\text{TNF}\alpha$ et d' $\text{IL-1}\beta$, ou de $\text{TNF}\alpha$ et d' IL-17 suggérant que ces dernières cytokines jouent un rôle dans la résistance au traitement par agents bloquants le $\text{TNF}\alpha$.

Ces expériences et résultats ont été publiés dans

Arthritis Research and Therapy

2009 ; 11(2) : R57

« Gene expression profiling in the synovium identifies a predictive signature of absence of response to adalimumab therapy in rheumatoid arthritis »

Gene expression profiling in the synovium identifies a predictive signature of absence of response to adalimumab therapy in rheumatoid arthritis

Valérie Badot^{1,2}, Christine Galant³, Adrien Nzeusseu Toukap¹, Ivan Theate³, Anne-Lise Maudoux¹, Benoît J Van den Eynde⁴, Patrick Durez¹, Frédéric A Houssiau¹ and Bernard R Lauwerys¹

¹Rheumatology Department, Cliniques Universitaires Saint-Luc, Université catholique de Louvain, Avenue Hippocrate 10, B-1200 Brussels, Belgium

²Rheumatology Department, CHU Brugmann, Place Arthur Van Gehuchten 4, 1020 Brussels, Belgium

³Pathology Department, Cliniques Universitaires Saint-Luc, Université catholique de Louvain, Avenue Hippocrate 10, B-1200 Brussels, Belgium

⁴Ludwig Institute for Cancer Research, Avenue Hippocrate 74, B-1200 Brussels, Belgium

Corresponding author: Bernard R Lauwerys, bernard.lauwerys@uclouvain.be

Received: 5 Oct 2008 Revisions requested: 2 Dec 2008 Revisions received: 7 Mar 2009 Accepted: 23 Apr 2009 Published: 23 Apr 2009

Arthritis Research & Therapy 2009, 11:R57 (doi:10.1186/ar2678)

This article is online at: <http://arthritis-research.com/content/11/2/R57>

© 2009 Badot *et al.*; licensee BioMed Central Ltd.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Introduction To identify markers and mechanisms of resistance to adalimumab therapy, we studied global gene expression profiles in synovial tissue specimens obtained from severe rheumatoid arthritis (RA) patients before and after initiation of treatment.

Methods Paired synovial biopsies were obtained from the affected knee of 25 DMARD (disease-modifying antirheumatic drug)-resistant RA patients at baseline (T0) and 12 weeks (T12) after initiation of adalimumab therapy. DAS28-CRP (disease activity score using 28 joint counts-C-reactive protein) scores were computed at the same time points, and patients were categorized as good, moderate, or poor responders according to European League Against Rheumatism criteria. Global gene expression profiles were performed in a subset of patients by means of GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays, and confirmatory immunohistochemistry experiments were performed on the entire cohort.

Results Gene expression studies performed at baseline identified 439 genes associated with poor response to therapy. The majority (n = 411) of these genes were upregulated in poor responders and clustered into two specific pathways: cell

division and regulation of immune responses (in particular, cytokines, chemokines, and their receptors). Immunohistochemistry experiments confirmed that high baseline synovial expression of interleukin-7 receptor α chain (IL-7R), chemokine (C-X-C motif) ligand 11 (CXCL11), IL-18, IL-18 receptor accessory (IL-18rap), and MKI67 is associated with poor response to adalimumab therapy. *In vitro* experiments indicated that genes overexpressed in poor responders could be induced in fibroblast-like synoviocytes (FLS) cultures by the addition of tumor necrosis factor- α (TNF- α) alone, IL-1 β alone, the combination of TNF- α and IL-17, and the combination of TNF- α and IL-1 β .

Conclusions Gene expression studies of the RA synovium may be useful in the identification of early markers of response to TNF blockade. Genes significantly overexpressed at baseline in poor responders are induced by several cytokines in FLSs, thereby suggesting a role for these cytokines in the resistance to TNF blockade in RA.

ANOVA: analysis of variance; anti-CCP2 antibody: anti-citrullinated cyclic peptide antibody (second-generation test); CCL5: chemokine ligand 5; cRNA: complementary RNA; CRP: C-reactive protein; Ct: cycle threshold; CTLA4: cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4; CXCL11: chemokine (C-X-C motif) ligand 11; DAS: disease activity score; DAS28: disease activity score using 28 joint counts; DAVID: Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; DMARD: disease-modifying antirheumatic drug; EULAR: European League Against Rheumatism; FLS: fibroblast-like synoviocyte; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GCOS: GeneChip Operating Software; GEO: Gene Expression Omnibus; GO: Gene Ontology; HRP: horseradish peroxidase; IL: interleukin; IL-18rap: interleukin-18 receptor accessory; IL-7R: interleukin-7 receptor α chain; LTB: lymphotoxin beta; PBMC: peripheral blood mononuclear cell; PCR: polymerase chain reaction; RA: rheumatoid arthritis; RT: reverse transcriptase; RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction; SEM: standard error of the mean; TNF: tumor necrosis factor.

Introduction

Tumor necrosis factor (TNF) antagonists are used routinely in severe rheumatoid arthritis (RA) patients who failed conventional disease-modifying antirheumatic drug (DMARD) therapy. According to large clinical trials, the three available drugs (adalimumab, infliximab, and etanercept) display similar effects in terms of efficacy, tolerability, and side effects [1-5]. These studies also indicate that about 25% of RA patients treated with TNF antagonists do not display any significant clinical improvement. Thus far, however, there are no validated tools that can predict whether an individual RA patient will respond to TNF blockade. Yet the identification of poor responders prior to initiation of therapy would direct the use of alternative methods of treatment, thereby preventing disease progression in these patients and saving unnecessary costs.

TNF antagonists interfere with many pathways involved in RA synovial inflammatory processes; these include local production of chemokines and cytokines [6-9], vascular proliferation and endothelial expression of adhesion molecules [10,11], cell trafficking into the synovium [8], proliferation of synovial macrophages [12-14], and production of matrix metalloproteinases [15]. Which of these pathways are critical in determining the clinical improvement associated with the use of TNF-blocking agents is still unknown. In the present study, we therefore wanted to investigate the effects of adalimumab on global gene expression changes in the RA synovium in order to obtain a molecular picture of the effects of TNF blockade in synovial tissue. We also investigated whether clinical, histological, and molecular characteristics of synovial biopsies at baseline are associated with response to therapy.

We harvested synovial biopsies in 25 severe RA patients followed prospectively before and 12 weeks after initiation of adalimumab therapy. Global gene expression studies and pathway analyses were performed in a subset of these patients, and confirmatory immunohistochemistry experiments were performed in the entire cohort. We found that adalimumab induces a significant decrease in the expression of genes involved in cell division in all patients. In responders, we also observed a decreased expression of genes involved in the regulation of immune responses (in particular, cytokines, chemokines, and their receptors). Moreover, we demonstrated that high baseline expression of selected genes from these families (cell division and regulation of immune responses) is associated with poor clinical response to therapy, thereby providing clinicians with potential tools to identify these patients prior to initiation of adalimumab treatment. Finally, we demonstrated that genes overexpressed in poor responders are induced in fibroblast-like synovial cell (FLS) cultures by the addition of several cytokines or combinations of cytokines: TNF- α , IL-1 β , the association of TNF- α and IL-17, and the association of TNF- α and IL-1 β .

Materials and methods

Patients and synovial biopsies

Twenty-five patients (18 women and 7 men, median age 55.2 years, range 18 to 83 years) with RA were included in the study. All patients met the American College of Rheumatology criteria for the diagnosis of RA [16]. Mean disease duration was 10 years (range 1 to 36 years). All patients had active disease at the time of tissue sampling and were resistant to conventional therapy. They all had erosive changes imaged on conventional x-rays of the hands and/or feet. All of them had a swollen knee at inclusion. Mean baseline serum C-reactive protein (CRP) level was 29.6 mg/L (range 5 to 122 mg/L), and mean baseline DAS28 (disease activity score using 28 joint counts)-CRP (three variables) evaluation was 5.55 (range 4.07 to 8.26). Twenty-two patients had positive anti-citrullinated cyclic peptide (anti-CCP2) antibody titers. All patients were treated with DMARDs, 23 with methotrexate (median dose 15 mg/week, range 7.5 to 20 mg/week), and 2 with leflunomide (20 mg/day); 18 of them were treated with low-dose steroids (prednisolone $\leq$ 7.5 mg/day). Six patients had been included in double-blind clinical trials before inclusion in the present study (1 in a Golimumab versus placebo trial, 3 in a MapKinase inhibitor versus placebo trial, and 2 in a TNF- α -converting enzyme [TACE] inhibitor versus placebo trial). These trials were stopped at least 3 months prior to initiation of TNF-blocking therapy. All drug dosages were stable from at least 3 months prior to initiation of TNF-blocking therapy until completion of the study. No steroid injections were allowed during the duration of the study.

Adalimumab therapy was initiated at a dosage of 40 mg subcutaneously every other week. Disease activity at baseline (T0) and 12 weeks after initiation of therapy (T12) was evaluated using DAS(28)-CRP (three and four variables) scores, and response to therapy was assessed according to the European League Against Rheumatism (EULAR) response criteria [17] that categorize patients as responders (good or moderate) and non-responders (or poor responders) based on changes in DAS activity between T0 and T12 and absolute DAS values at T12.

Synovial biopsies were obtained by needle arthroscopy of the affected knee of all patients at T0 and T12. For each procedure, four to eight synovial samples were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for later RNA extraction. The same amount of tissue was kept at -80°C for immunostaining experiments on frozen sections. The remaining material was fixed in 10% formalin and paraffin-embedded for conventional optical evaluation and immunostaining of selected markers. All of the experiments (RNA extraction, histology, and immunohistochemistry) were performed on at least four biopsies harvested during every procedure in order to correct for variations related to the potential heterogeneous distribution of synovial inflammation. The study was approved by the ethics commit

tee of the Université catholique de Louvain, and informed consent was obtained from all patients.

Fibroblast-like synoviocyte cultures

FLSs were purified from seven additional synovial biopsies from DMARD-resistant RA patients as previously described [18]. Briefly, minced synovial fragments were digested in 1 mg/mL hyaluronidase solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 15 minutes at 37°C and 6 mg/mL collagenase type IV (Invitrogen, Paisley, UK) for 2 hours at 37°C. Next, cells were washed, resuspended in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 1% antibiotics-antimycotics (Invitrogen) and 1% minimum essential medium sodium pyruvate (Invitrogen), and seeded at 10,000 cells per square centimeter in six-well plates. When the cells reached confluence, adherent cells were detached using sterile 0.5% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (Invitrogen) and used as FLSs between passages 3 and 9. For the cytokine stimulation experiments, cells were seeded in 24-well plates at 25,000 per well. Unless stated otherwise, the following cytokine concentrations were used: TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 10 ng/mL, IL-1 β (R&D Systems) 10 ng/mL, IL-6 (Peprotech, London, UK) 10 ng/mL, IL-7 (R&D Systems) 100 ng/mL, and IL-17 (R&D Systems) 50 ng/mL. After overnight incubation with the indicated cytokines, cells were harvested and total RNA was extracted using the Nucleospin[®] RNA II extraction kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). RNA from some experiments was used for microarray hybridizations while the remaining material was used for cDNA synthesis and real-time polymerase chain reaction (PCR) experiments.

Microarray hybridization

Total RNA was extracted from the synovial biopsies using the Nucleospin[®] RNA II extraction kit (Macherey-Nagel), including DNase treatment of the samples. At least 1 μ g of total RNA could be extracted from 12 samples at T0 and from 12 samples at T12 for further processing. Out of these 12 samples at T0 and 12 samples at T12, 8 originated from the same patients and were used in the paired analyses of gene expression before and after therapy. RNA quality was assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer and RNA nanochips (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). All samples had a 28s/18s ratio of greater than 1.8. Labeling of RNA (complementary RNA [cRNA] synthesis) was performed in accordance with a standard Affymetrix[®] procedure (One-Cycle Target Labeling kit; Affymetrix UK Ltd., High Wycombe, UK); briefly, total RNA was first reverse-transcribed into single-stranded cDNA using a T7-Oligo(dT) Promoter Primer and Superscript II reverse transcriptase (RT). Next, RNase H was added together with *Escherichia coli* DNA polymerase I and *E. coli* DNA ligase, followed by a short incubation with T4 DNA polymerase in order to achieve synthesis of the second-strand cDNA. The purified double-stranded cDNA served as the template for the *in vitro* transcription reaction, which was carried

out overnight in the presence of T7 RNA polymerase and a biotinylated nucleotide analog/ribonucleotide mix. At the end of this procedure, the biotinylated cRNA was cleaned and then was fragmented by a 35-minute incubation at 95°C.

GeneChip[®] Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays (spotted with 1,300,000 oligonucleotides informative for 47,000 transcripts originated from 39,000 genes) (Affymetrix UK Ltd.) were hybridized overnight at 45°C in monoplicates with 10 μ g of cRNA. The slides then were washed and stained using the EukGE-WS2v5 Fluidics protocol on the GeneChip[®] Fluidics Station (Affymetrix UK Ltd.) before being scanned on a GeneChip[®] Scanner 3000. For the initial normalization and analysis steps, data were retrieved on Affymetrix GeneChip Operating Software (GCOS). The frequency of positive genes (genes with a flag present) was between 45% and 55% on each slide. After scaling of all probe sets to a value of 100, the amplification scale was reported to be inferior to 3.0 for all slides. The signals yielded by the poly-A RNA, hybridization, and house-keeping controls (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [GAPDH] 3'/5' ratio of less than 2) were indicative of the good quality of the amplification and hybridization procedures.

The same protocol was used for the amplification and the hybridization of RNA obtained from cultured FLSs. One microgram of total RNA was used in the initial reaction. After the initial normalization steps on GCOS, the frequency of positive genes was between 42% and 45% on each slide. The amplification scale was inferior to 1.5 for all slides, and the GAPDH 3'/5' ratio was inferior to 1.3. The data discussed in this publication have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) of the National Center for Biotechnology Information [19] and are accessible through GEO series accession numbers [GEO:GSE15602] and [GEO:GSE15615].

Quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction experiments

Quantitative real-time RT-PCR evaluation of lymphotoxin beta (*LTB*) [GenBank: [NM_002341.1](#)], chemokine ligand 5 (*CCL5*) [GenBank: [NM_002985](#)], and cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (*CTLA4*) [GenBank: [NM_005214.3](#)] gene expression was performed in synovial biopsies at T0 and T12. cDNA was synthesized from a subset of RNA that originated from 10 samples at T0 and 8 samples at T12 using RevertAid Moloney murine leukemia virus RT (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) and Oligo(dT) primers. Quantitative RT-PCR was performed on a MyiQ single-color RT-PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, Nazareth Eke, Belgium) using SYBR Green detection mix. For each sample, 5 ng of cDNA was loaded in triplicate with 1 $\times$ SYBR Green Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the following 10 mM primers: *β -actin*: 5'-ggcatcgtgtaggactccg-3' and 3'-ctggaaggtggacagcga-5'; *LTB*: 5'-gaggaggaccagaaacagat-3' and 3'-tagccgacgagacagtagagg-5'; *CCL5*: 5'-catattcctcggacaccacac-3' and 3'-gatgtactccgaac-

ccattt-5'; and *CTLA4*: 5'-ctcttcacccctgtcttctgc-3' and 3'-gactcagtcacctggctgtc-3'. The melting curves obtained after each PCR amplification confirmed the specificity of the SYBR Green assays. Relative expression of the target genes in the studied samples was obtained using the difference in the comparative threshold ($\Delta\Delta C_t$) method. Briefly, for each sample, we determined a value for the cycle threshold (C_t), which was defined as the mean cycle at which the fluorescence curve reached an arbitrary threshold. The ΔC_t for each sample was then calculated according to the formula $C_{t_{\text{target gene}}} - C_{t_{\text{actin}}}$; $\Delta\Delta C_t$ values then were obtained by subtracting the ΔC_t of a reference sample from the ΔC_t of the studied samples. Finally, the levels of expression of the target genes in the studied samples as compared with the reference sample were calculated as $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Quantitative evaluation of *IL-7R* [GenBank: [NM_002185](#)], *IL-6* [GenBank: [NM_006000](#)], *INDO* [GenBank: [NM_002164](#)], *GTSE1* [GenBank: [NM_016426](#)], *CDC2* [GenBank: [NM_001786.3](#)], and *MKI67* [GenBank: [NM_002417.4](#)] gene expression was similarly conducted in FLSs using the following primers: *IL-7R*: 5'-ttcttgaggatgcagctaaa-3' and 3'-aagcccaaccaacaagagtt-5'; *IL-6*: 5'-gccagctatgaactcctct-3' and 3'-tgaagaggtgagtggctgtct-5'; *INDO*: 5'-ggatcatggagatgcgtaa-3' and 3'-accaatagagagaccaggaagaa-5'; *GTSE1*: 5'-acgtgaacatggatgacccta-3' and 3'-gttcgggaaccggattattta-3'; *CDC2*: 5'-ggtaagtggtagccatgaaa-3' and 3'-ccaggaggatagaatccaag-5'; and *MKI67*: 5'-ccccaaccaaaagaaagtctc-3' and 3'-gactagagagctggagggtcta-5'.

Histopathology and immunohistochemistry on paraffin-embedded sections

Fresh synovial biopsy tissue samples ($n = 25$ at T0 and $n = 25$ at T12) were fixed overnight in 10% formalin buffer at pH 7.0 and embedded in paraffin for histological and immunohistochemical analyses. Serial histological sections were stained with hematoxylin and eosin and analyzed by two observers (CG and IT) who were blinded to the clinical data. The following parameters were evaluated: vascular hyperplasia, perivascular lymphoplasmocytic cell infiltrates, diffuse lymphoplasmocytic cell infiltrates, follicular structures, thickness of the synovial lining layer, macrophages, polymorphonuclear cell infiltrates, fibrinoid necrosis, and fibrosis. A global semi-quantitative score including the whole biopsy areas was given for these parameters (0 to 3 scale: 0 indicates absence and 3 indicates high level). A specific score was assigned for the hyperplasia of the synovial lining layer: 0 (indicates one or two cell layers), 1 (three or four), 2 (five or six), and 3 (at least seven). Inter-observer correlation (Spearman r) was greater than 85% for every parameter tested except for synovial hyperplasia, which scored at 75%.

Immunolabeling experiments were performed using a standard protocol. After removal of paraffin and inactivation of endogenous peroxidases with 0.3% H_2O_2 for 30 minutes at room

temperature, sections were incubated in 10 mM sodium citrate buffer (pH 5.8) and heated in a bain-marie at 98°C for 75 minutes to retrieve the antigenic sites. Non-specific binding was blocked by a 30-minute incubation with 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 10% (vol/vol) normal goat serum and 1% (wt/vol) bovine serum albumin. Sections then were incubated overnight at 4°C with the primary antibody. The following antibodies were used: CD3 (Neomarkers, Westinghouse, CA, USA), CD20 (Biocare Medical, Concord, CA, USA), CD68 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), CD15 (Biocare Medical), MKI67 (DakoCytomation), IL-18 (MBL, Nagoya, Japan), and gp130 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). After three washes in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), specifically bound antibodies were labeled for 1 hour at room temperature with Envision™ (DakoCytomation), and the activity of peroxidases was revealed by a 10-minute incubation with 0.5 mg/mL diaminobenzidine in Tris-HCl buffer. As a final step, sections were washed in tap water and lightly counterstained with hematoxylin.

Immunohistochemistry on frozen sections

After initial blocking of endogenous peroxidases with a peroxidase-blocking reagent (DakoCytomation), frozen sections of the synovial biopsy samples were stained with primary antibodies for the following molecules: interleukin-7 receptor α chain (IL-7R) (Sigma-Aldrich), chemokine (C-X-C motif) ligand 11 (CXCL11) (also named *ITAC*, interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant) (Abcam, Cambridge, UK), and IL-18 receptor accessory (IL-18rap) (Abnova, Taipei, Taiwan). After incubation with the primary antibody, slides were sequentially incubated with an EnVision horseradish peroxidase (HRP) rabbit or mouse secondary antibody conjugated to an HRP-labeled polymer (Dako EnVision+System; DakoCytomation) and diaminobenzidine-positive chromagen (DakoCytomation). The slides were subsequently counterstained with hematoxylin for further analyses.

Quantitative scoring of immunostaining

Quantitative analysis of the immunostained sections was performed using ImageJ software [20] in accordance with the Digital Image Analysis process [21]. Six digitalized pictures (magnification $\times 400$) were obtained for each slide by two operators (VB and A-LM) who were blinded to the identity of the specimens. Each picture included lining and sublining regions when possible. When the distribution of the staining was heterogeneous, the pictures were taken in order to be representative of the globality of the slide. The surface staining (S) and the surface of the nuclei (N) were determined for each image, and the area of staining then was normalized by calculating the ratio of surface staining to nuclei staining.

Statistical analyses

Statistical analyses of the microarray data were first performed using TMEV 4.0 [22]. Differences in gene expression between T0 and T12 were evaluated using paired Student t tests after

processing of the scaled data for elimination of the genes with a flag absent in more than half of the samples and selection of the 8,000 genes that displayed the widest inter-individual variations in the remaining genes. Further statistical analyses were performed using Genespring® software (Agilent Technologies, Inc.). For each slide, scaled data were normalized to the 50th percentile value for each chip and to the median value for each gene. The data were assessed by analysis of variance (ANOVA) for identification of differential gene expression at T0 among good, moderate, and poor responders, with the minimal level of differential expression between good and moderate versus poor responders set at 1.5-fold. Data obtained from the FLS cultures were similarly analyzed on Genespring®, using the same normalization steps and statistical tests.

Pathway analyses were performed using Gostat [23], an application that finds statistically overrepresented Gene Ontology (GO) terms within a group of genes [24]. These analyses were restricted to the terms inside the 'biological process' group of gene ontologies. Additional pathway analyses were performed using DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) [25], an application that interrogates additional functional annotation databases (Kegg pathways, BioCarta, and InterPro) and finds overrepresented biological themes within a group of genes.

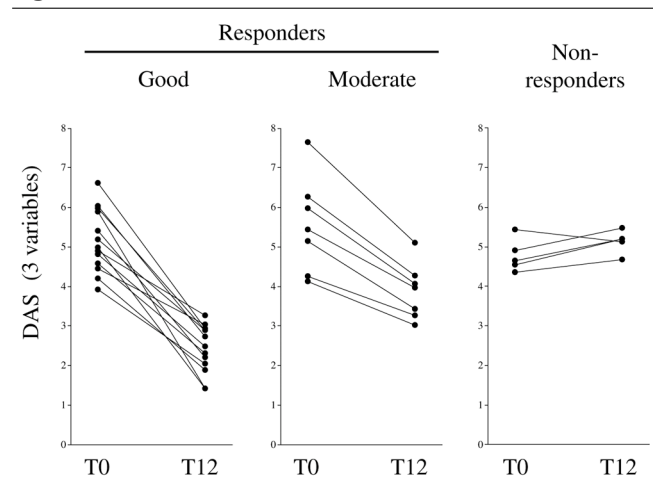
Results

Clinical responses

Disease activity was prospectively evaluated at baseline (T0) and 12 weeks after initiation of adalimumab therapy (T12) based on DAS28-CRP (three variables) score evaluations. According to EULAR response criteria, 20 patients were responders at T12 (13 good and 7 moderate responders) whereas 5 were non-responders to adalimumab therapy (Figure 1). The use of DAS28-CRP (four variables) scores that include visual analog scale general health evaluation by the patient resulted in classification of the same 20 and 5 patients into responders versus non-responders, respectively. However, when this index was used among the responders, there were 11 good and 9 moderate responders.

We investigated whether baseline clinical characteristics were associated with response to therapy. DAS28-CRP (three variables) scores were not significantly different at baseline in responders (mean $\pm$ standard error of the mean [SEM]: 5.289 ± 0.213) and non-responders (mean $\pm$ SEM: 4.774 ± 0.186 , $P = 0.34$). Similarly, DAS28-CRP (four variables) scores (mean $\pm$ SEM responders: 5.6725 ± 0.984 ; mean $\pm$ SEM non-responders: 5.066 ± 0.302 , $P = 0.19$), CRP values (mean $\pm$ SEM responders: 27.9 ± 7.4 mg/L; mean $\pm$ SEM non-responders: 36.4 ± 21.4 mg/L, $P = 0.64$), and anti-CCP2 antibody titers (mean $\pm$ SEM responders: 477.2 ± 122.8 U/mL; mean $\pm$ SEM non-responders: 381.8 ± 208.7 U/mL, $P = 0.72$) were not significantly different in responders versus non-responders at baseline.

Figure 1



Evolution of disease activity score (DAS) (three variables) in 25 individual rheumatoid arthritis patients before (T0) and 12 weeks after (T12) initiation of adalimumab therapy. Patients are categorized into (good or moderate) responders or non-responders according to European League Against Rheumatism criteria.

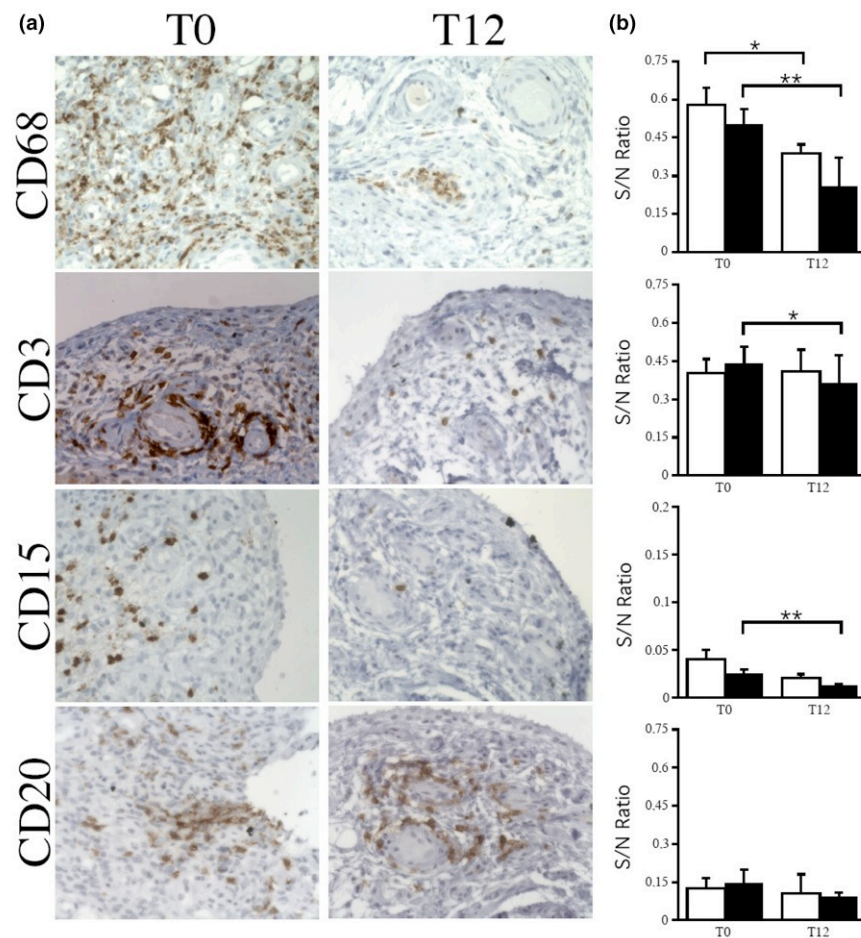
Immunohistochemistry studies

First, we evaluated the effects of adalimumab therapy on the histopathological characteristics of the synovial biopsies harvested at T0 in a clinically affected knee and at T12. Semi-quantitative evaluation and paired comparisons of the biopsies indicated that adalimumab induced a significant decrease in the number of infiltrating polymorphonuclear cells between T0 and T12. By restricting the analyses to the biopsies from the 20 patients who responded to therapy, we could find evidence of a significant decrease in polymorphonuclear cell infiltration, fibrinoid necrosis, and diffuse lymphoplasmocytic cell infiltrates (data not shown).

The effects of adalimumab on synovial cell populations were further investigated by immunohistochemistry. Quantitative analyses of CD68⁺, CD15⁺, CD3⁺, and CD20⁺ cells and paired analyses indicated that adalimumab induced a significant decrease in the numbers of CD68⁺ synovial cells in the sublining between T0 and T12 in all patients. When we considered the changes occurring only in the patients who responded to therapy, we found that adalimumab induced a significant decrease in the numbers of sublining CD68⁺, CD15⁺, and CD3⁺ cells. By contrast, there were no changes in the numbers of CD20⁺ cells (Figure 2).

We also investigated whether synovial immunohistochemistry parameters were different among the patients at T0, classified according to their EULAR response. ANOVAs comparing poor to moderate and good responders demonstrated that the amounts of fibrosis and fibrinoid necrosis were significantly higher in the synovial biopsies from the non-responders at baseline (data not shown). By contrast, we did not evidence any significant variation at T0 in the numbers of CD68⁺, CD3⁺

Figure 2



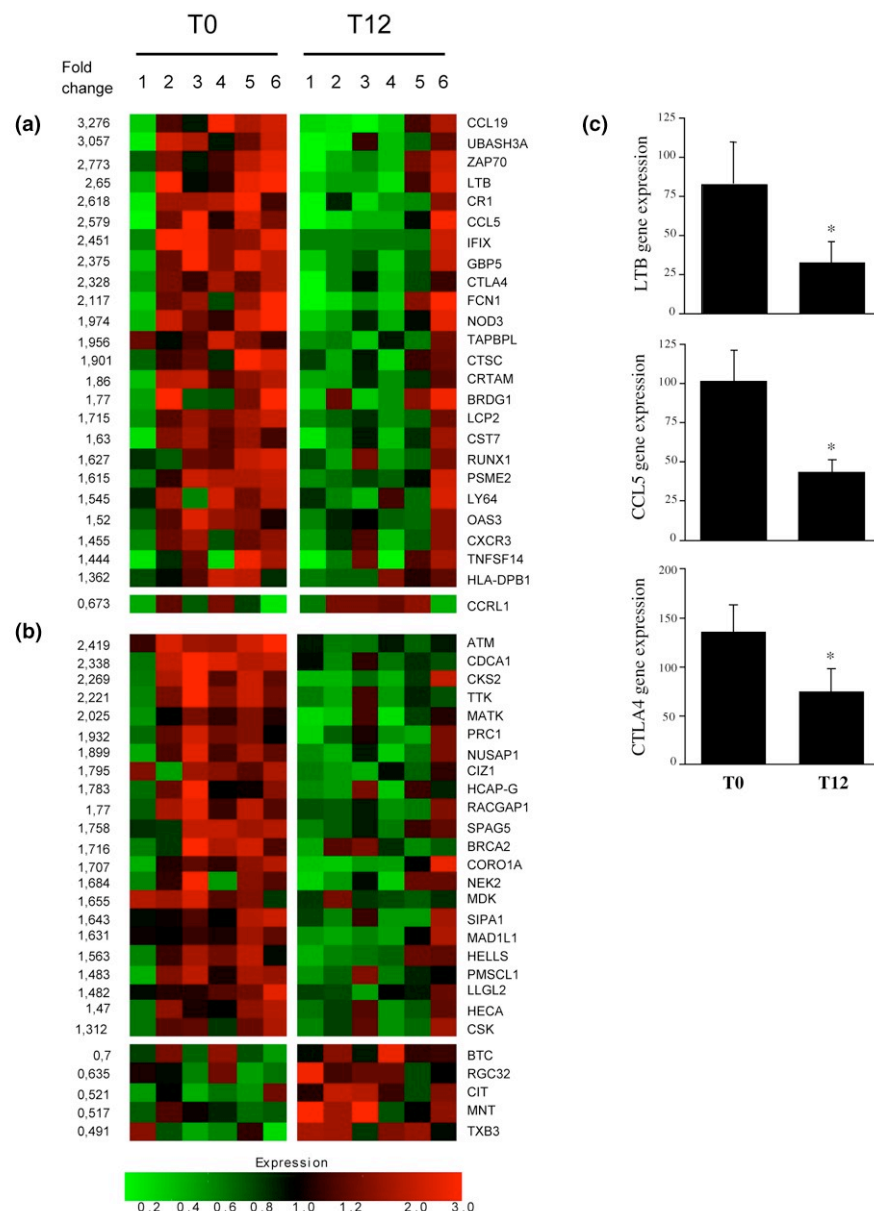
Changes in immunohistochemistry parameters in the synovial biopsies of severe rheumatoid arthritis patients. Biopsies were collected prior to (T0) (n = 25) and 12 weeks after (T12) (n = 25) initiation of adalimumab therapy. (a) Characteristic images of the stained markers (sublining C68, CD3, CD20, and CD15) (original magnification $\times 400$). (b) Ratio of surface staining to staining of the nuclei (S/N). Slides stained for CD68, CD3, CD15, and CD20 were analyzed using ImageJ with six digitalized pictures (magnification $\times 400$) obtained for each sample. Open boxes refer to all patients, and closed boxes refer to responders. Results are the mean and standard error of the mean of S/N ratio. * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$ versus good and moderate responders using Wilcoxon matched-pairs signed rank tests.

CD15⁺, and CD20⁺ cells (evaluated by digital quantification) according to response to therapy.

Effects of adalimumab therapy on synovial gene expression profiles

Next, we investigated the effects of adalimumab therapy on global gene expression profiles of synovial biopsies that were harvested at T0 and T12. RNA was extracted from eight synovial tissue samples at T0 and T12, labeled, and hybridized in monoplexates on GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 slides. According to paired Student *t* tests, 254 out of 54,675 transcripts were differentially expressed between T0 and T12 in all samples (Additional data file 1); 144 of them were down-regulated and 110 were up-regulated. To investigate whether these genes clustered in specific pathways, we analyzed the frequency of the available GO annotations in the list by means

of online data-mining software. We found that genes differentially expressed between T0 and T12 were significantly enriched in GO families involved in cell division (9% of the GO annotated genes). If we restricted the analyses to the six patients who responded to therapy, we found 632 genes differentially expressed between T0 and T12. Interestingly, the latter genes clustered in two distinct families: genes involved in the regulation of immune responses and genes involved in the regulation of cell division (Figures 3a and 3b). To fine-tune these pathway analyses, we interrogated additional functional annotation databases (Kegg pathways, InterPro, and BioCarta) using DAVID. We found that the genes involved in the regulation of immune responses further distributed in pathways such as signal transduction, T-cell activation, antigen processing/presentation, and apoptosis. We confirmed our microarray data by performing real-time PCR evaluations of



Genes differentially expressed before (T0) and 12 weeks after (T12) start of adalimumab in synovial biopsy specimens of rheumatoid arthritis patients who responded to therapy. Paired Student *t* tests indicated that 632 (out of 54,675) genes displayed significant differences in expression between T0 and T12 in six synovial tissue samples obtained from RA patients who responded to adalimumab therapy. Pathway analyses indicated that a significant percentage of these genes clustered into two distinct pathways: genes involved in the regulation of immune responses (a) and genes involved in cell division (b). Fold-change values are the mean level of decreased expression at T12 as compared with T0. (c) Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction studies of the expression of selected genes in rheumatoid arthritis synovial biopsy tissue before (T0) (n = 10) and 12 weeks after (T12) (n = 8) initiation of adalimumab therapy. Samples were loaded in triplicate, and results are the mean and standard error of the mean of gene expression, relative to the mean gene expression in a standard sample normalized to 1. **P* < 0.05. CCL5, chemokine lig- and 5; CTLA4, cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4; LTB, lymphotoxin beta.

selected genes from the immune response gene families. As shown in Figure 3c, we found that *LTB*, *CCL5*, and *CTLA4* gene expression was significantly lower at T12 as compared with T0.

Correlation between clinical responses and gene signatures

We wondered whether clinical responses to therapy were associated with different patterns of gene expression at T0. We used ANOVA tests in order to identify genes differently

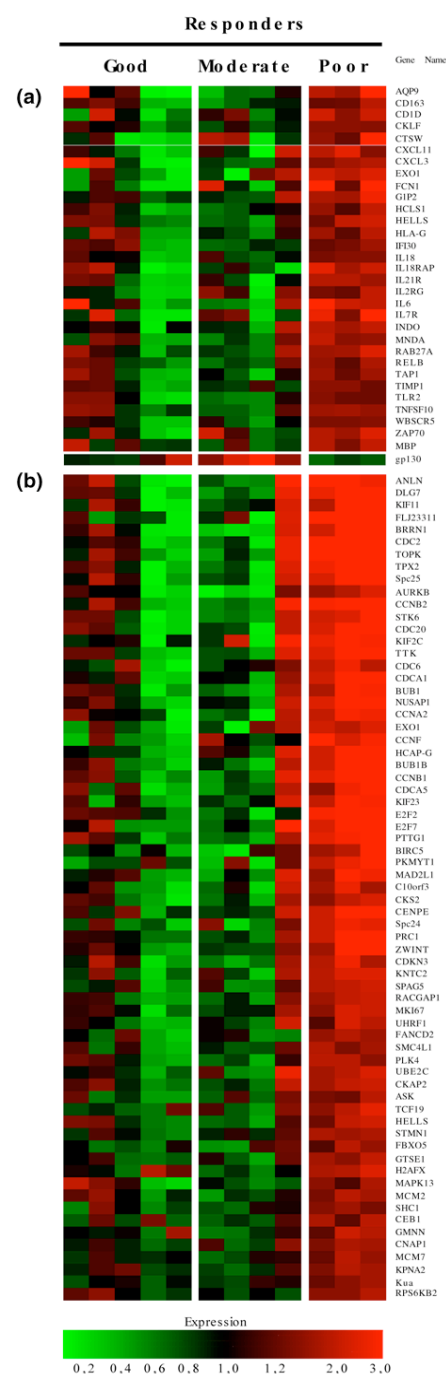
expressed at T0 between 12 patients categorized as poor (3), moderate (4), and good (5) responders. We identified 524 genes that were differentially expressed between the three groups. In particular, 411 transcripts were found to be upregulated and 28 were downregulated in poor responders at T0 as compared with the two other groups. GO pathway analyses indicated that these genes were characterized by a distinct signature made of genes involved in the regulation of the cell cycle (28% of the GO annotated genes) and genes involved in the regulation of immune responses (15% of the GO annotated genes) (Figure 4). Interrogation of additional databases using DAVID indicated that the genes involved in the regulation of immune responses belong to pathways involved in the regulation of signal transduction, antigen processing/presentation, T-cell activation, and apoptosis.

To confirm our microarray findings related to differential gene expression at baseline depending on response to therapy, we performed immunostaining experiments on the synovial biopsy specimens obtained from the 25 patients included in the study. We evaluated the synovial expression of selected molecules from the immune response group at T0 using specific antibodies: IL-7R, CXCL11, IL-18, and IL-18rap. MKI67 was selected as a proliferation marker among the group of genes involved in the regulation of cell division. Quantitative evaluation of the slides confirmed that synovial expression of IL-7R, CXCL11, IL-18, IL-18rap, and MKI67 at T0 was significantly higher in poor as compared with moderate and good responders (Figure 5). There was no correlation between the digital quantifications of any of these molecules and cellularity markers (CD3, CD68, CD20, and CD15), thereby indicating that their synovial overexpression does not result from a shift in cell populations in non-responders.

Genes overexpressed in poor responders are induced in fibroblast-like synoviocytes by the addition of several cytokines

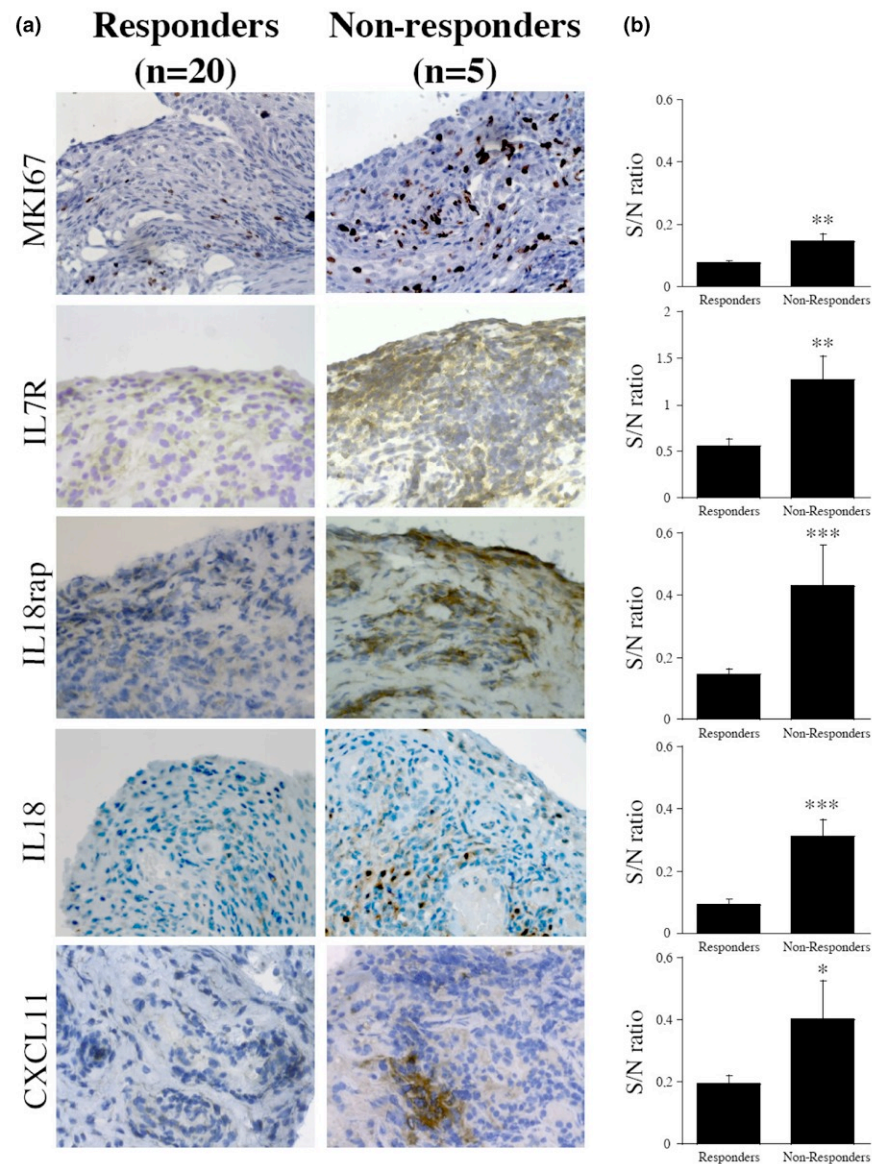
We wondered whether the genes overexpressed at T0 in non-responders were informative about synovial mechanisms of resistance to TNF blockade. In particular, we investigated whether these genes could be induced by TNF- α itself – which would indicate that their overexpression results from the overwhelming presence of TNF- α in the synovium – or whether they could be induced by other pro-inflammatory cytokines. FLSs were incubated overnight with TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-17, and combinations of these cytokines. Real-time PCR experiments were performed in order to study the expression of genes known to be overexpressed at baseline in poor responders (*IL-7R*, *IL-6*, *INDO*, *CDC2*, *GTSE1*, and *MKI67*). TNF- α alone, IL-1 β alone, and the combination of TNF- α or IL-1 β with IL-17 display stimulatory effects on some of the genes of this panel, whereas the combination of TNF- α and IL-1 β had a significant stimulatory effect on the whole set of genes tested (Figure 6). Notably, the effects of the combination of TNF- α with either IL-17 or IL-1 β were synergistic on

Figure 4



Genes differentially expressed at baseline between poor versus moderate and good responders to adalimumab therapy. Five hundred twenty-four genes were found to be differentially expressed among good, moderate, and poor responders at baseline by analysis of variance ($P < 0.05$). *Post hoc* (Student-Newman-Keuls) tests were used to discriminate genes that were specifically upregulated ($n = 411$) or downregulated ($n = 28$) in poor responders as compared with the two other groups. Pathway analyses indicated that these genes were significantly enriched in genes involved in the regulation of immune responses (a) and genes involved in cell division (b).

Figure 5



Baseline immunostaining for selected synovial markers of response to adalimumab therapy. Synovial samples of rheumatoid arthritis patients who responded or who did not respond to adalimumab therapy were stained at baseline with polyclonal antibodies directed at MKI67, interleukin-7 receptor α chain (IL-7R), interleukin-18 receptor accessory (IL-18rap), IL-18, and chemokine (C-X-C motif) ligand 11 (CXCL11). (a) Characteristic images of the stained markers are shown in responders ($n = 20$) versus non-responders ($n = 5$) (original magnification $\times 400$). (b) Ratio of surface staining to staining of the nuclei (S/N). Slides were analyzed using ImageJ with six digitalized pictures (magnification $\times 400$) obtained for each sample. Results are the mean and standard error of the mean of S/N ratio. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$ using Wilcoxon matched-pairs signed rank tests.

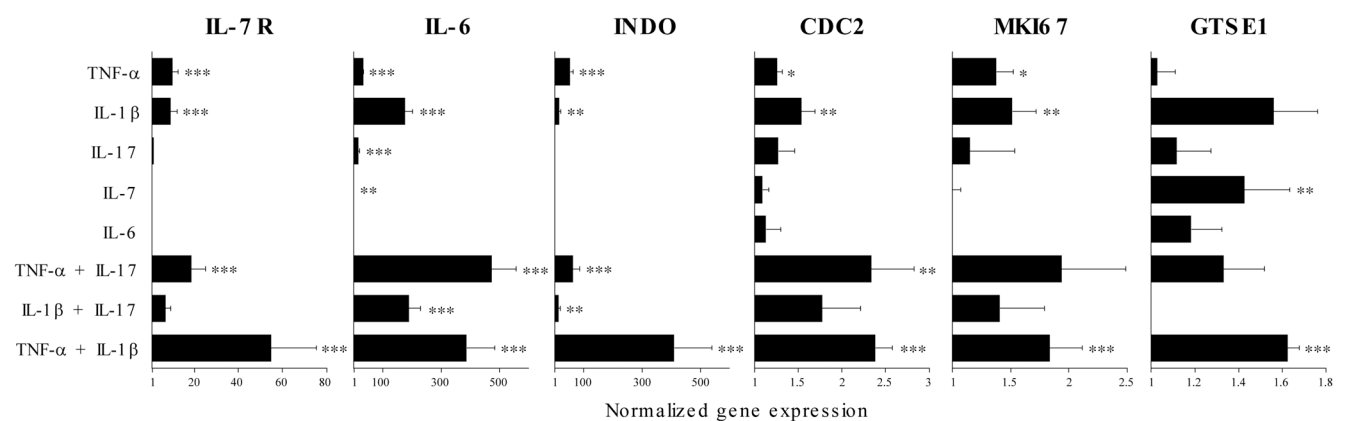
several targets: IL-6 and CDC2 for TNF- α and IL-17, and IL-7R, IL-6, INDO, and CDC2 for TNF- α and IL-1 β .

Discussion

We studied synovial tissue from DMARD-resistant RA patients before and 12 weeks after initiation of therapy with adalimumab. Adalimumab therapy resulted in a significant decrease in the number of CD68⁺ cells and in the expression of genes involved in cell division in all patients. In responders, we found

a significant decrease in the numbers of CD68⁺, CD3⁺, and CD15⁺ cells. From a gene expression point of view, responders were characterized by significant changes in the expression of genes involved in cell division and in the regulation of immune responses. Moreover, ANOVAs performed at baseline indicated that overexpression of selected genes belonging to both families was associated with poor response to therapy, an observation that was confirmed by immunostaining experiments. Finally, *in vitro* experiments performed in FLSs indi-

Figure 6



Genes overexpressed at baseline in poor responders are significantly induced by the combination of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in fibroblast-like synovial cells (FLSs). FLSs were cultured overnight in the presence of TNF- α (10 ng/mL), IL-1 β (10 ng/mL), IL-6 (10 ng/mL), IL-7 (100 ng/mL), IL-17 (50 ng/mL), or combinations of several of these cytokines. RNA was extracted and real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction evaluation of *IL-7R*, *IL-6*, *INDO*, *CDC2*, *GTSE1*, and *MKI67* was evaluated in at least four different experiments. Results are expressed as the mean fold change in gene expression and standard error of the mean, relative to the mean gene expression of the baseline condition normalized to 1. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$ using Wilcoxon signed rank tests.

cated that several cytokines and combinations of cytokines had a significant effect on the expression of a panel of genes overexpressed in poor responders at T0.

Several studies, aimed at the identification of prognostic markers of response to TNF blockade in RA, were recently published. Transcriptome analyses were performed recently by Sekiguchi and colleagues [26] in one study and by Lequerré and colleagues [27] in another study using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from RA patients treated with infliximab. In a first set of 6 responders versus 7 non-responders, the latter identified 41 transcripts associated with response to therapy in baseline PBMC samples. They confirmed the association of 20 of these transcripts with response to therapy in an additional set of 20 patients [27]. It is striking, however, that the genes identified by these authors do not belong to any relevant pathway. It should be stressed in that perspective that RA is not a systemic disease. The inflammatory mechanisms targeted by TNF-blocking agents are located in the synovium, and gene expression profiles of RA PBMCs are not representative of these synovial tissue-specific pathways. In our previous studies, we found that transcriptomic analyses performed on synovial biopsies could discriminate RA from other joint disorders based on the analysis of synovial molecular profiles only, thereby demonstrating the power of this approach [28]. In this perspective, Lindberg and colleagues [29] investigated changes in global gene expression profiles in the synovium from a small group of RA patients before and after therapy with infliximab. They found a significant decrease in the expression of 1,058 genes in a subset of four patients with positive synovial immunostaining for TNF- α . These genes were enriched in families of genes involved in inflammatory processes.

Clinicians would be interested in measurable parameters that could predict response to TNF blockade prior to its initiation rather than in modifications of gene expression under therapy. Thus, van der Pouw Kraan and colleagues [30] performed global gene expression profiles in RA synovial tissue obtained in 6 non-responders and 12 responders prior to infliximab therapy. They found that responders were characterized by the overexpression of genes involved in specific pathways such as T-cell-mediated immunity, macrophage-mediated immunity, cytokine- and chemokine-mediated signaling pathways, major histocompatibility complex II-mediated immunity, and cell adhesion. Unfortunately, they did not perform any confirmatory experiment (real-time PCR or immunohistochemistry) in order to verify the reality of their microarray data [30]. Their results were also potentially biased by the fact that the synovial biopsies from the responders included in their study were characterized by higher percentages of CD3⁺ and CD163⁺ cells; therefore, it is not surprising that genes produced by these cells are overexpressed in tissues enriched for them. This kind of bias is very common in gene expression studies performed in heterogeneous tissues; in these studies, one must be aware that differences found in gene expression could be due to differences in cell populations across the samples rather than to true differences in pathogenic mechanisms at the single-cell level.

In the present study, we wanted to increase the validity of such microarray observations by performing additional RT-PCR and immunohistochemistry experiments and by linking our data to potential mechanisms of resistance to TNF blockade in RA. Our findings about the changes induced by adalimumab in synovial tissue between T0 and T12 are well in line with previous data from the literature. In particular, the significant

decrease in CD68⁺ cells is a well-documented characteristic of TNF-blocking agents in RA. Our gene expression studies show that adalimumab interferes with two major pathways of pathophysiological relevance in the RA synovium: regulation of immune responses and cell proliferation. Activation of these pathways is a major characteristic of the RA synovium [31,32], and our gene expression data confirm the well-documented role of TNF- α and TNF-blocking agents in the regulation of these pathogenic events.

The main interest of our study is that we identified significant differences in gene expression profiles at T0 according to the pattern of clinical response to therapy, while baseline clinical and histochemical characteristics were not different between responders and non-responders. In particular, we found that poor responders are characterized by a significant overexpression of genes involved in cell division and in the regulation of immune responses. The differential baseline expression of selected genes (*IL-7R*, *CXCL11*, *IL-18*, *IL-18rap*, and *MKI67*) among the samples (n = 25) was validated by immunostaining experiments, thereby qualifying them as potential predictive markers of response to adalimumab therapy in RA. The confirmation of these results in larger numbers of patients could result in the development of a diagnostic test to guide individualized therapy.

Strikingly, the genes overexpressed in poor responders are induced in FLSs by several cytokines, indicating that the absence of response could be due to the uncontrolled action of one or several of these cytokines. Earlier studies failed to demonstrate any correlation between synovial expression of TNF- α , IL-1 β , or other cytokines and clinical response to TNF-blocking agents [33,34]. However, the biological effect of a cytokine results not only from the presence of the cytokine itself, but also from the concentration of its natural inhibitors (such as soluble TNF receptors or IL-1 receptor antagonists). Molecular signatures, therefore, are more suited to evaluate the biological action of a cytokine than raw evaluation of its synovial concentration.

By indicating that a representative panel of genes overexpressed in poor responders are induced in FLSs by TNF- α , IL-1 β , and the combination of TNF- α with either IL-17 or IL-1 β , our results raise the possibility that resistance to TNF blockade could be related to the effects of these cytokines on pro-inflammatory processes in poor responders. However, the study of gene expression signatures does not allow us to make strong mechanistic statements. Further experiments, therefore, are needed in order to test the *in vitro* sensitivity of synovial cells from TNF-blocking therapy-resistant patients to increasing concentrations of TNF- α , IL-1 β , or IL-17-blocking agents and finally to identify the mechanisms of resistance to TNF blockade in RA.

Conclusions

Using high-density oligonucleotide-spotted microarrays and immunohistochemistry experiments, we identified baseline markers of response to TNF blockade in a group of RA patients treated with adalimumab. We demonstrated that the genes overexpressed in the poor responders are induced by TNF- α , but also by IL-1 β , in FLS cultures and by the combination of TNF- α with IL-17 or IL-1 β , thereby suggesting that one (or several) of these cytokines plays a role in the mechanisms of resistance to adalimumab therapy. Our data also allow us to initiate larger studies in order to confirm the prognostic value of our markers in individual therapeutic decisions.

Competing interests

A patent application (WO 2008/132176) for the use of synovial markers as predictive markers of response to TNF blockade in RA was deposited by the Université catholique de Louvain (B.R. Lauwerys, B.J. Van den Eynde, Frédéric A. Houssiau and Valérie Badot). All other authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

VB helped to acquire, analyze, and interpret the data and helped to perform the statistical analyses and to write the manuscript. CG helped to acquire, analyze, and interpret the data. ANT, IT, A-LM helped to acquire the data. BJVdE, PD, and FAH helped to design the study and contributed to the writing of the manuscript. BRL helped to design the study and to acquire, analyze, and interpret the data and helped to perform the statistical analyses and to write the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Additional files

The following Additional files are available online:

Additional file 1

A table listing the genes differentially expressed between T0 and T12 in the synovium of adalimumab-treated RA patients. Microarray data were analyzed on TMEV 4.0 after elimination of the genes with a flag absent in more than half the samples and selection of the 8,000 genes that displayed the widest inter-individual variations. In all patients, 254 genes were found to display significant differences in expression between T0 and T12 using Student's t-tests. Fold changes are the ratio between mean expression at T0 above mean expression at T12. See <http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/ar2678-S1.doc>

Acknowledgements

This work was supported by an unrestricted grant from Abbott Laboratories (Parc Scientifique, Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-La-Neuve,

France) and by grants from the Région Wallonne (Biowin), the Fonds de la Recherche Scientifique et Médicale (Belgium), and the Fonds Spécial de Recherche (Communauté française de Belgique). The authors wish to thank Kristel van Landuyt (Laboratorium voor Skeletontwikkeling en Gewrichtsaandoeningen, Katholieke Universiteit Leuven) for providing protocol and demonstration of FLS cultures.

References

- Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, Moreland LW, Weisman MH, Birbara CA, Teoh LA, Fischkoff SA, Chartash EK: Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum* 2003, 48:35-45.
- Burmester GR, Mariette X, Montecucco C, Monteagudo-Saez I, Malaise M, Tzioufas AG, Bijlsma JW, Unnebrink K, Kary S, Kupper H: Adalimumab alone and in combination with disease-modifying antirheumatic drugs for the treatment of rheumatoid arthritis in clinical practice: the Research in Active Rheumatoid Arthritis (ReAct) trial. *Ann Rheum Dis* 2007, 66:732-739.
- Weinblatt ME, Kremer JM, Bankhurst AD, Bulpitt KJ, Fleischmann RM, Fox RI, Jackson CG, Lange M, Burge DJ: A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *N Engl J Med* 1999, 340:253-259.
- Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Kalden JR, Antoni C, Smolen JS, Leeb B, Breedveld FC, Macfarlane JD, Bijl H, Woody JN: Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1994, 344:1105-1110.
- Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Davis D, Macfarlane JD, Antoni C, Leeb B, Elliott MJ, Woody JN, Schaible TF, Feldmann M: Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998, 41:1552-1563.
- Ulfgren AK, Andersson U, Engstrom M, Klareskog L, Maini RN, Taylor PC: Systemic anti-tumor necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis down-regulates synovial tumor necrosis factor alpha synthesis. *Arthritis Rheum* 2000, 43:2391-2396.
- Barrera P, Joosten LA, den Broeder AA, Putte LB van de, van Riel PL, Berg WB van den: Effects of treatment with a fully human anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody on the local and systemic homeostasis of interleukin-1 and TNF-alpha in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2001, 60:660-669.
- Taylor PC, Peters AM, Paleolog E, Chapman PT, Elliott MJ, McCloskey R, Feldmann M, Maini RN: Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000, 43:38-47.
- Catrina AI, af Klint E, Ernestam S, Catrina SB, Makrygiannakis D, Botusan IR, Klareskog L, Ulfgren AK: Anti-tumor necrosis factor therapy increases synovial osteoprotegerin expression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006, 54:76-81.
- Ballara S, Taylor PC, Reusch P, Marme D, Feldmann M, Maini RN, Paleolog EM: Raised serum vascular endothelial growth factor levels are associated with destructive change in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2001, 44:2055-2064.
- Paleolog EM, Hunt M, Elliott MJ, Feldmann M, Maini RN, Woody JN: Deactivation of vascular endothelium by monoclonal anti-tumor necrosis factor alpha antibody in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996, 39:1082-1091.
- Tak PP, Taylor PC, Breedveld FC, Smeets TJ, Daha MR, Kluin PM, Meinders AE, Maini RN: Decrease in cellularity and expression of adhesion molecules by anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996, 39:1077-1081.
- Smeets TJ, Kraan MC, van Loon ME, Tak PP: Tumor necrosis factor alpha blockade reduces the synovial cell infiltrate early after initiation of treatment, but apparently not by induction of apoptosis in synovial tissue. *Arthritis Rheum* 2003, 48:2155-2162.
- Catrina AI, Trollmo C, af Klint E, Engstrom M, Lampa J, Hermanson Y, Klareskog L, Ulfgren AK: Evidence that anti-tumor necrosis factor therapy with both etanercept and infliximab induces apoptosis in macrophages, but not lymphocytes, in rheumatoid arthritis joints: extended report. *Arthritis Rheum* 2005, 52:61-72.
- Catrina AI, Lampa J, Ernestam S, af Klint E, Bratt J, Klareskog L, Ulfgren AK: Anti-tumour necrosis factor (TNF)-alpha therapy (etanercept) down-regulates serum matrix metalloproteinase (MMP)-3 and MMP-1 in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2002, 41:484-489.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, Medsger TA Jr, Mitchell DM, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL, Hunder GG: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988, 31:315-324.
- van Gestel AM, Prevoo ML, van 't Hof MA, van Rijswijk MH, Putte LB van de, van Riel PL: Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League Against Rheumatism Criteria. *Arthritis Rheum* 1996, 39:34-40.
- De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP: Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001, 44:1928-1942.
- Gene expression omnibus [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>]
- ImageJ: Image processing and analysis in Java [<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>]
- Haringman JJ, Vinkenog M, Gerlag DM, Smeets TJ, Zwiderman AH, Tak PP: Reliability of computerized image analysis for the evaluation of serial synovial biopsies in randomized controlled trials in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005, 7:R862-R867.
- TIGR Multiexperiment Viewer [<http://www.tm4.org/mev.html>]
- GOSTat [<http://gostat.wehi.edu.au>]
- Beissbarth T, Speed TP: Gostat: find statistically overrepresented Gene Ontologies within a group of genes. *Bioinformatics* 2004, 20:1464-1465.
- DAVID [<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>]
- Sekiguchi N, Kawauchi S, Furuya T, Inaba N, Matsuda K, Ando S, Ogasawara M, Aburatani H, Kameda H, Amano K, Abe T, Ito S, Takeuchi T: Messenger ribonucleic acid expression profile in peripheral blood cells from RA patients following treatment with an anti-TNF-alpha monoclonal antibody, infliximab. *Rheumatology (Oxford)* 2008, 47:780-788.
- Lequerré T, Gauthier-Jauneau AC, Bansard C, Derambure C, Hiron M, Vittecoq O, Daveau M, Mejjad O, Daragon A, Tron F, Le Loët X, Salier JP: Gene profiling in white blood cells predicts infliximab responsiveness in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006, 8:R105.
- Nzeusseu Toukap A, Galant C, Theate I, Maudoux AL, Lories RJ, Houssiau FA, Lauwerys BR: Identification of distinct gene expression profiles in the synovium of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2007, 56:1579-1588.
- Lindberg J, af Klint E, Catrina AI, Nilsson P, Klareskog L, Ulfgren AK, Lundberg J: Effect of infliximab on mRNA expression profiles in synovial tissue of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 2006, 8:R179.
- Pouw Kraan TC van der, Wijbrandts CA, van Baarsen LG, Rustenburg F, Baggen JM, Verweij CL, Tak PP: Responsiveness to anti-tumour necrosis factor alpha therapy is related to pre-treatment tissue inflammation levels in rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis* 2008, 67:563-566.
- Imamura F, Aono H, Hasunuma T, Sumida T, Tateishi H, Maruo S, Nishioka K: Monoclonal expansion of synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998, 41:1979-1986.
- Watanabe N, Ando K, Yoshida S, Inuzuka S, Kobayashi M, Matsui N, Okamoto T: Gene expression profile analysis of rheumatoid synovial fibroblast cultures revealing the overexpression of genes responsible for tumor-like growth of rheumatoid synovium. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, 294:1121-1129.
- Wijbrandts CA, Dijkgraaf MG, Kraan MC, Vinkenog M, Smeets TJ, Dinant H, Vos K, Lems WF, Wolbink GJ, Sijpkens D, Dijkmans BA, Tak PP: The clinical response to infliximab in rheumatoid arthritis is in part dependent on pretreatment tumour necrosis

- factor alpha expression in the synovium. *Ann Rheum Dis* 2008, 67:1139-1144.
34. Buch MH, Reece RJ, Quinn MA, English A, Cunnane G, Henshaw K, Bingham SJ, Bejarano V, Isaacs J, Emery P: The value of syn-ovial cytokine expression in predicting the clinical response to TNF antagonist therapy (infliximab). *Rheumatology (Oxford)* 2008, 47:1469-1475.

2. Deuxième publication

Dans la deuxième partie de nos travaux, nous nous sommes particulièrement intéressés à un gène, la chaîne alpha du récepteur de l'IL-7 (IL-7R α).

D'une part, ce marqueur appartient à la signature moléculaire synoviale identifiée pour être prédictive de non réponse à l'adalimumab, comme cela a été observé dans nos études synoviales transcriptomiques et protéiques.

Mais d'autre part, des travaux antérieurs de notre laboratoire avaient déjà rapporté que l'expression de l'IL-7R α était plus élevée dans les biopsies synoviales de patients atteints de PR débutante et non traitée, en comparaison à celles de patients souffrant d'autres pathologies rhumatismales (arthrose en poussée inflammatoire ou lupus) (345). Ceci suggère que l'IL-7R α est un gène spécifique de la PR.

Nous avons voulu d'abord confirmer par différentes techniques (PCR, cytométrie de flux ou par western blot) que l'IL-7R est bien exprimé par les lymphocytes T. Dans la mesure où sa stimulation peut induire préférentiellement la prolifération de lymphocytes T_H17, la sur-expression de la molécule dans le tissu synovial de patients atteints de PR, en particulier les formes les plus sévères et réfractaires au traitement, nous paraissait particulièrement pertinente.

Cependant, les analyses immunohistochimiques du tissu synovial de nos patients semblaient selon nos anathomopathologistes montrer que la présence de l'IL-7R α n'était pas limitée aux cellules lymphocytaires mais que d'autres cellules pouvaient l'exprimer comme les RAFLS. Dès lors, nous avons voulu étudier si ces cellules exprimaient l'IL-7R α . De manière inattendue, nous avons trouvé que les fibroblastes synoviaux sont capables de produire deux isoformes de l'IL-7R α , une forme membranaire, ou en tout cas 'full-length' et une forme soluble de l'IL-7R α (IL-7Rs), résultat d'un épissage alternatif du gène. Assez curieusement, alors que la forme soluble est sécrétée, la forme « full-length » n'est pas détectée à la surface des FLS, que ces cellules soient stimulées ou non.

Nous avons montré par PCR en temps réel que l'IL-7Rs est régulée dans les RAFLS par le TNF α , l'IL-1 β , et de manière additive voire synergique par le TNF α et l'IL-1 β , par le TNF α et l'IL-17 ou par l'IL-1 β et l'IL-17. De plus, la sécrétion d'IL-7Rs, mesurée par ELISA dans le surnageant de RAFLS en culture, est significativement augmentée si ces cellules sont stimulées par du TNF α , de l'IL-1 β ou par l'association de TNF α et d'IL-1 β .

Dans des expériences de co-cultures, nous avons également démontré que l'inhibition de l'IL-7 par une protéine de fusion IL-7Rs/Fc bloque la prolifération de lymphocytes T CD4 synoviaux (isolés du liquide synovial) mis en présence de fibroblastes synoviaux, ce qui indique que l'IL-7Rs joue un rôle inhibiteur sur l'activation des lymphocytes T CD4 synoviaux.

Enfin, nous nous sommes demandés si l'IL-7Rs était détectable dans le sérum de patients atteints de PR, et si des titres élevés de la molécule étaient éventuellement associés avec une mauvaise réponse aux agents bloquant le TNF α . Nos résultats indiquent que des concentrations sériques d'IL-7Rs étaient plus élevées chez les patients atteints de PR par rapport aux contrôles, de même que des taux sériques élevés prédisent une mauvaise réponse au traitement bloquant le TNF α .

Ces travaux ont fait l'objet d'une deuxième publication dans *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 211, 15 (11) : 2335-42

« Rheumatoid arthritis synovial fibroblasts produce a soluble form of the interleukin-7 receptor in response to pro-inflammatory cytokines »

Rheumatoid arthritis synovial fibroblasts produce a soluble form of the interleukin-7 receptor in response to pro-inflammatory cytokines

V. Badot ^{a, b}, P. Durez ^a, B.J. Van den Eynde ^c, A. Nzeusseu-Toukap ^a, F.A. Houssiau ^a, B.R. Lauwerys ^{a, *}

^a Rheumatology Department, Cliniques Universitaires Saint-Luc, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium

^b Rheumatology Department, CHU Brugmann, Brussels, Belgium

^c Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels, Belgium

Received: March 26, 2010; Accepted: November 19, 2010

Abstract

We previously demonstrated that baseline synovial overexpression of the interleukin-7 receptor α -chain (IL-7R) is associated with poor response to tumour necrosis factor (TNF) blockade in rheumatoid arthritis (RA). We found that IL-7R gene expression is induced in fibroblast-like synovial cells (FLS) by the addition of TNF- α , IL-1 β and combinations of TNF- α + IL-1 β or TNF- α + IL-17, thereby suggesting that these cytokines play a role in the resistance to TNF blockade in RA. Because FLS and CD4 T cells also produce a soluble form of IL-7R (sIL-7R), resulting from an alternative splicing of the full-length transcript, we wondered whether expression of sIL-7R is similarly regulated by pro-inflammatory cytokines. We also investigated whether sIL-7R is detectable in the serum of RA patients and associated with response to TNF blockade. RA FLS were cultured in the presence of pro-inflammatory cytokines and sIL-7R concentrations were measured in culture supernatants. Similarly, sIL-7R titres were measured in sera obtained from healthy individuals, early untreated RA patients with active disease and disease-modifying anti-rheumatic drug (DMARD)-resistant RA patients prior to initiation of TNF-blockade. Baseline serum sIL-7R titres were correlated with validated clinical measurements of disease activity. Exposure of RA FLS to pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and combinations of TNF- α and IL-1 β or TNF- α and IL-17) induces sIL-7R secretion. Activated CD4 T cells also produce sIL-7R. sIL-7R serum levels are higher in RA patients as compared to controls. In DMARD-resistant patients, high sIL-7R serum concentrations are strongly associated with poor response to TNF-blockade. sIL-7R is induced by pro-inflammatory cytokines in RA FLS. sIL-7R could qualify as a new biomarker of response to therapy in RA.

Keywords: rheumatoid arthritis • TNF blockade • biomarker • interleukin-7 receptor α -chain

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease of the synovium that can lead to severe joint damage if insufficiently treated. Central to the pathogenesis of RA is the proliferation of synovial fibroblasts (synovial 'pannus') in response to the production of autocrine, but also paracrine molecules produced by infiltrating mononuclear cells. Among these molecules, pro inflammatory cytokines such as tumour necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6 or IL-17 play an important role, and this observation led to the development of targeted therapies. In this context, TNF blocking agents are used routinely in RA patients who have failed first-line disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARD) therapy.

Several TNF blocking agents are presently available, which display similar effects in terms of efficacy, tolerability and side effects in RA [1–5]. Importantly, about 25% to 30% of RA patients treated with TNF antagonists do not display any significant clinical improvement after initiation of therapy. Thus far, however, there are no validated tools that can predict whether an individual RA patient will respond or not to TNF blockade. Yet the identification of poor responders prior to initiation of therapy would direct the use of other biologics, thereby preventing disease progression in these patients and saving unnecessary costs. Of note, an

additional 30–40% of the patients will display feature of secondary resistance to the delivered drug within the first 5 years of therapy. This phenomenon is, at least partially, associated with the development of human anti-chimeric or human anti-human antibodies, and is clearly distinct from primary resistance to TNF blockade.

In earlier experiments, we performed global gene expression studies on synovial biopsies obtained from RA patients prior to the initiation of TNF-blockade [6]. We found that several genes were significantly overexpressed at baseline in non-responders. Strikingly, the expression of these genes is induced *in vitro* in fibroblast-like synovial cells (FLS) by the addition of TNF- α , IL-1 β and combinations of TNF- α and IL-1 β or TNF- α and IL-17, thereby suggesting that these cytokines play a role in the mechanisms of primary resistance to TNF blockade in RA.

The interleukin-7 receptor α -chain (IL-7R) is one of the genes overexpressed in the synovial tissue of poor responders to TNF blockade in RA [6]. Fibroblasts are known to produce a soluble form of the molecule (sIL-7R), which results from an alternative splicing of the full-length transcript (excision of exon 6, containing the transmembrane domain) and is able to bind and block IL-7 [7, 8]. We therefore wondered whether sIL-7R expression was also regulated in synovial fibroblasts by the addition of pro-inflammatory cytokines and whether serum sIL-7R determination had any value in predicting primary response to TNF blockade in RA.

Material and methods

Patients

Sera were collected from healthy individuals ($n = 75$), patients with early ($n = 52$) or DMARD-resistant ($n = 75$) RA and stored at -80°C . All RA patients met the American College of Rheumatology criteria for the diagnosis of RA [9]. Patients with early RA had disease duration of less than 1 year. They were (mean $\pm$ S.D.) 45 ± 14 years old. All had active disease at the time of serum sampling (mean DAS28-CRP score: 5.87 ± 1.28) and none of them was treated, except for non-steroidal anti-inflammatory drugs.

DMARD-resistant RA patients were 55 ± 12 year old. Disease duration was 10.8 ± 6.7 years. They were treated at baseline with a median 15 mg methotrexate/week schedule (range 7.5–25 mg/week). A total of 9% were treated with other DMARDs after having failed methotrexate therapy in the past. A total of 13% were treated with another DMARD together with methotrexate. Patients had taken an average three DMARDs including methotrexate (range 1–7) before starting infliximab therapy. All of them had erosive changes imaged on conventional x-rays of the hands and/or the feet. They all had active disease at the time of serum sampling (mean DAS28-CRP score: 5.69 ± 1.12). After baseline serum collection, DMARD-resistant RA patients were treated with a standard schedule of infliximab: 3 mg/kg at weeks 0, 2, 6 and then every other month in addition to their DMARD therapy. Follow-up DAS28-CRP evaluations were performed between 4 and 6 months after baseline and patients were categorized into non-responders versus responders according to EULAR response criteria [10].

The study was approved by the ethics committee of the Université catholique de Louvain, and informed consent was obtained from all patients.

Isolation and culture of cells

FLS were purified from synovial biopsies from eight additional RA patients as previously described [11]. Briefly, minced synovial fragments were digested in 1 mg/ml hyaluronidase solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 15 min. at 37°C and 6 mg/ml collagenase type IV (Invitrogen, Paisley, UK) for 2 hrs at 37°C . Next, cells were washed, resuspended in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 1% antibiotics-antimycotics (Invitrogen), 1% minimum essential medium sodium pyruvate (Invitrogen) and 10% FCS, and seeded at 10,000 cells per square centimetre in six-well plates. When the cells reached confluence, adherent cells were detached using sterile 0.5% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Invitrogen) and used between passages 3 and 9.

Culture of cells and cytokine stimulation experiments

For the cytokine stimulation experiments, FLS were seeded in 24-well plates at 25,000 per well. Unless stated otherwise, the following cytokine concentrations were used: TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 10 ng/ml, IL-1 β (R&D Systems) 10 ng/ml and IL-17 (R&D Systems) 50 ng/ml. After overnight incubation with the indicated cytokines, supernatants were collected for sIL-7R determination and cells were harvested for total RNA extraction. Because of the limited number of cells, all the cytokine stimulation experiments were not performed on the same cells. IL-7R gene expression in response to TNF- α , IL-1 β and combinations of both cytokines was studied in FLS from five different patients; IL-7R gene expression in response to IL-17, TNF- α , IL-1 β and combinations of TNF- α and IL-17 or IL-1 β and IL-17 was studied in FLS from four different patients. sIL-7R gene expression in response to TNF- α , IL-1 β and combinations of both cytokines was studied in FLS from four different patients; sIL-7R gene expression in response to IL-17, TNF- α , IL-1 β and combinations of TNF- α and IL-17 or IL-1 β and IL-17 was studied in FLS from two different patients. For co-culture experiments, CD4 T cells were purified from the synovial fluid using magnetic beads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) according to manufacturer's instructions. FLS (5000/well) and autologous CD4 T cells (50,000/well) were seeded in flat-bottomed 96-well plates in the presence of autologous serum, IL-2 (25 U/ml) and either 100 ng/ml IL-7 (R&D Systems) or 5 $\mu\text{g/ml}$ sIL-7R-Fc fusion protein (R&D Systems), as indicated. After 3 days, proliferative responses were measured in quadruplicates after an overnight pulse with 0.5 μCi ^3H -thymidine (GE Healthcare, UK).

PBMC from healthy donors were purified by lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norway) density gradient centrifugation. In some experiments, PBMC were cultured for 24 hrs in the presence of IL-2 and PHA, and CD4 T cells were purified using magnetic beads (Miltenyi Biotec) as per manufacturer's instructions. CD8 T cells clones (obtained from Pierre van der Bruggen, Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels Branch) were stimulated with their cognate antigen presented by

irradiated autologous B-EBV cells in the presence of IL-2 (Chiron, Amsterdam, The Netherlands, 50 U/ml) and IL-7 (R&D Systems, 5 ng/ml). After 24 hrs, CD8 T cells clones were purified using magnetic beads (Miltenyi Biotec) as per manufacturer's protocol. cDNA from B-EBV cell derived from two healthy donors were obtained from Pierre Coulie (Unité de Génétique Cellulaire, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium).

Flow cytometry experiments

FLS were harvested and resuspended in a sodium phosphate (1 mM, pH = 7.4) buffer containing 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgSO₄, 0.3 mM MgCl₂, 5 mM Glucose, 4 mM NaHCO₃, 1 mM EDTA and 3% FCS in the presence of a PE-conjugated IL-7R antibody (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) or a control isotype (Becton Dickinson). Cells were washed and fixed in paraformaldehyde (0.6%) before being analysed by flow cytometry (Becton Dickinson).

Western blot experiments

FLS and PBMC were washed with ice-cold PBS, and lysed in cold lysis buffer (20 mM Hepes pH7.8, 75 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM sodium-orthovanadate, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 10% glycerol, 0.5% Triton-X 100 and one tablet of Complete Protease Inhibitor (Roche) per 20 ml). Lysates were subjected to sonication and spun at 13,000 × g to remove debris. Supernatants were resolved on a polyacrylamide gel and immunoblotted with an monoclonal mouse anti-IL-7R antibody (Sigma-Aldrich) at 1:1,000. Immunoreactive proteins were visualized using a goat antimouse-HRP antibody (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) at 1:1,000, with a femto-range-sensitive ECL detection system (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA).

RT-PCR experiments

Total RNA was extracted using the Nucleospin[®] RNA II extraction kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), including DNase treatment of the samples. cDNA was synthesized using RevertAid Moloney murine leukaemia virus RT (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) and Oligo(dT) primers. IL-7R PCR amplification was carried out using Taq DNA polymerase (Fermentas) and the following primers: Forward: tcctccctctcttactctc and Reverse: tctgcagtcaggagaaactt. PCR products were analysed by agarose gel electrophoresis. PCR fragments were gel purified and sequenced using the same primers and the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) before being analysed on a 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Quantitative RT-PCR was performed on a MyiQ single-colour RT-PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, Nazareth Eke, Belgium) using SYBR Green detection mix. For each sample, 5 ng of cDNA was loaded in triplicate with 1x SYBR Green Mix (Applied Biosystems) and the following 10 mM primers: 1-actin : Forward: ggcacgtgatggactccg and Reverse: ctggaaggtagacagcga; IL-7R: Forward: ttctctgtcgtctgttggt and Reverse: gcttgaatgtcatccacccta; sIL-7R: Forward: agccaatgactttgttggtgac and Reverse: tacgataggcttaatcctgag. The IL-7R forward primer is located in exon 6 of the gene, which is absent in the sIL-7R mRNA sequence. The sIL-7R reverse primer spans the junction between exon 5 and exon 7 of

the mRNA sequence of the IL-7R gene. PCR amplification of plasmids containing either an IL-7R or a sIL-7R cDNA confirmed the specificity of the primer pairs for each isoform of the molecule. The melting curves obtained after each QPCR amplification confirmed the specificity of the SYBR Green assays. Relative expression of the target genes in the studied samples was obtained using the difference in the comparative threshold ($\Delta\Delta C_t$) method.

sIL-7R ELISA

sIL-7R serum titres were determined by sandwich-ELISA in serum samples and culture supernatants using a goat polyclonal hIL-7R antibody (Sigma-Aldrich) as coating antibody and a mouse monoclonal hIL-7R antibody as detecting antibody (Sigma-Aldrich). Microton ELISA plates (Greiner Bio One, Wemmel, Belgium) were coated overnight at 4 °C with a 100 µl goat polyclonal hIL-7R antibody solution diluted at 0.5 µg/ml in a 50 mM sodium carbonate (stock at 1 M, pH 10) coating buffer. Plates were blocked with milk and then incubated at 37 °C with the control and patient's sera diluted in PBS supplemented with 0.5% bovine serum albumin (BSA). Sera were tested in duplicates. For the standard curve, we used serial dilutions of a commercial IL-7R-Fc fusion protein (R&D Systems) containing the extracellular portion of the receptor bound to an Fc fragment of human IgG. For this reason, the results were expressed in pmol/ml instead of µg/ml. The detection antibody was used at 1 µg/ml in PBS 0.5% BSA. The third antibody was a rat HRP-antimouse IgG monoclonal antibody (LO-MK1, Unit of Experimental Immunology, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium), diluted at 0.5 µg/ml in PBS 0.5% BSA. That antibody does not cross-react with human IgG, and is therefore unable to detect IgG rheumatoid factors bound to the coated anti-IL-7R goat antibody. Each incubation step lasted 2 hrs. Plates were washed five times with PBS Tween (Sigma-Aldrich) 1/1000 between each step. The reactions were revealed with 1-Step Ultra-TMB (Thermo Fisher Scientific) and stopped by the addition of 2M H₂SO₄. The sensitivity of the ELISA is 20 pmol/ml. Inter-assay coefficient of variation is <8%. Pre-incubation of serum samples or standard curve with increasing concentrations of IL-7 does not affect the results of the ELISA readings.

Statistical analyses

In vitro data were analysed using unpaired Student's t-tests. Serum data were analysed using Mann-Whitney U-tests. Correlations between DAS scores, CRP values, Delta DAS scores and serum sIL-7R were analysed using Spearman rank tests.

Results

Fibroblast-like synovial cells express two isoforms of the gene encoding the IL-7R α -chain

In our previous experiments, we demonstrated that RA patients have higher synovial IL-7R gene and protein expression as

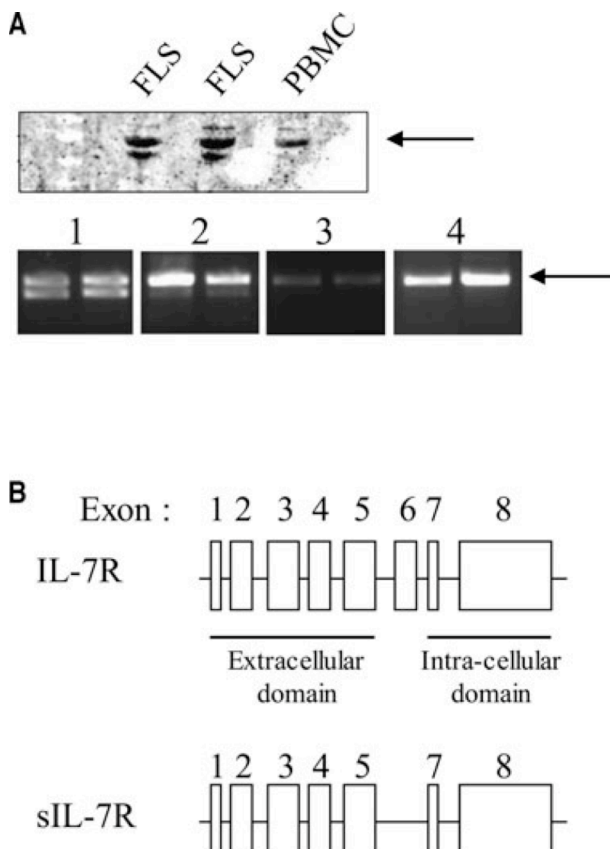


Fig. 1 FLS and activated CD4 T cells produce two IL-7R α -chain isoforms. (A) IL-7R Western blots on protein extracts from FLS and PBMC, and IL-7R PCR on cDNA from duplicate TNF- α and IL-1 β activated FLS (1), IL-2 and PHA activated CD4 T cells (2), antigen-activated CD8 T cell clones (3) and B-EBV cells (4). Arrows indicate the expected sizes of the membrane-bound IL-7R. (B) Sequencing of purified IL-7R PCR fragments indicates that FLS produce a full-length IL-7R α -chain and a truncated form of the IL-7R α -chain lacking exon 6 encoding the transmembrane domain, thereby resulting in a secreted form of the molecule.

compared to osteoarthritis or lupus patients [12]. Moreover, we found that synovial overexpression of IL-7R in DMARD-resistant RA patients is associated with poor response to TNF blockade [6]. In these earlier experiments, anti IL-7R antibodies stained not only synovial mononuclear cells, but also synovial fibroblasts. Therefore, we wanted to further study the production and regulation of IL-7R by cultured FLS obtained from the joints of RA patients. Western blot and real-time qPCR experiments indicated that FLS express two isoforms of the molecule (Fig. 1A). Sequencing of the amplicons demonstrated that these isoforms correspond to the native IL-7R, and an alternatively spliced variant lacking exon 6 (transmembrane domain), which encodes a soluble form of the IL-7R (sIL-7R) (Fig. 1B).

sIL-7R expression by FLS is induced by pro-inflammatory cytokines

Because sIL-7R transcripts result from an alternative splicing of IL-7R mRNAs, we wondered whether expression of both IL-7R isoforms is similarly regulated in FLS by the addition of pro-inflammatory cytokines known to play a role in the pathogenesis of RA. We found that mRNA levels of both the membrane-bound and soluble forms of IL-7R are up-regulated by the addition of TNF- α , IL-1 β and combinations of TNF- α and IL-1 β or TNF- α and IL-17 (Fig. 2A). Flow cytometry experiments were, however, unable to detect any cell surface expression of the membrane-bound IL-7R on FLS under any of these conditions (Fig. 2B). By contrast, ELISA experiments performed on culture supernatants indicated that sIL-7R secretion is induced in FLS by TNF- α , IL-1 β and the combination of both cytokines (Fig. 2C). Interestingly, sIL-7R gene expression is negative in activated CD8 T and B cells but slightly positive in activated CD4 T cells (Fig. 1A). Taken together, these results indicate that sIL-7R is a marker of fibroblast and, to a lesser extent, CD4 T-cell activation.

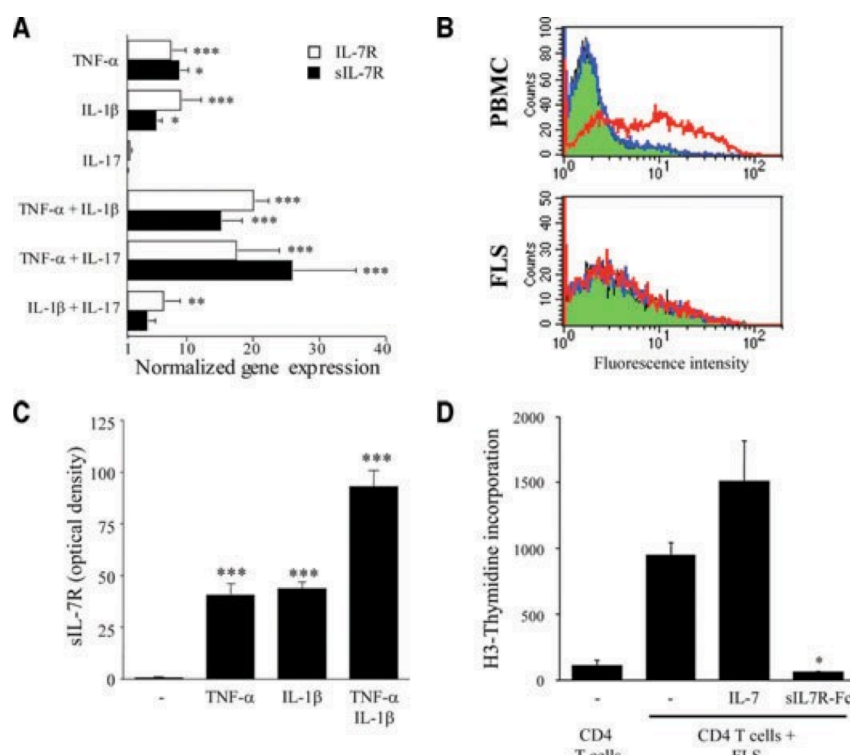
IL-7 blockade inhibits FLS-induced CD4 T-cell proliferation

Because sIL-7R is known to display IL-7 binding and blocking properties, we investigated whether it could interfere with synovial CD4 T-cell proliferation. RA FLS are known to express MHC class II molecules and stimulate the proliferation of autologous synovial CD4 T cells. We found that the addition of IL-7 stimulates the proliferation of synovial CD4 T cells cultured in the presence of autologous FLS. By contrast, addition of a sIL-7R-Fc fusion protein blocks the proliferation of these cells (Fig. 2D). These results suggest that sIL-7R production by activated synovial fibroblasts could play a role in a negative feedback loop resulting in a decreased proliferation of synovial CD4 T cells.

sIL-7Ra serum levels are higher in RA patients compared to controls

Next, we wondered whether sIL-7R could be detected in sera of healthy individuals and whether it was increased in patients with RA. sIL-7R is readily detectable in the sera of healthy individuals ($n = 75$) (median: 618 pmol/ml). In untreated early RA patients ($n = 52$) and in treated RA patients with active disease despite DMARD therapy ($n = 75$), sIL-7R serum levels are significantly higher (median: 921 and 1080 pmol/ml, respectively) as compared to controls (Fig. 3). We defined serum sIL-7R upper normal concentration as the mean serum sIL-7R concentration in the controls + 2 standard deviations. A total of 1.3% of the controls have an abnormal serum sIL-7R titre, versus 17.3% of the early RA patients and 24% of the DMARD-resistant RA patients. In both

Fig. 2 Pro-inflammatory cytokines stimulate sIL-7R production by FLS. (A) IL-7R (open bars) and sIL-7R (closed bars) real-time qPCR studies carried out on FLS stimulated with the indicated cytokines. Results are expressed as mean fold changes in IL-7R and sIL-7R gene expression ($\pm$ S.E.M.) over unstimulated FLS, obtained from two to five different experiments each. (B) Flow cytometric evaluation of IL-7R expression by PBMC and FLS. Cells were incubated with a PE-conjugated IL-7R antibody (red) or a PE-conjugated isotype control (blue). Autofluorescence of the cells is depicted in green. Graphs are representative of three different experiments. Similar results were obtained using FLS stimulated with pro-inflammatory cytokines, alone or in combination. (C) sIL-7R measurements were performed by sandwich-ELISA in supernatants of FLS cultures stimulated with the indicated cytokines. Results are expressed as mean optical density (O.D.) units $\times$ 1000 (after subtraction of the baseline O.D.) $\pm$ S.E.M. obtained from three different experiments. (D) Effect of IL-7 and sIL-7R-Fc fusion protein on proliferation of synovial CD4 T cells cultured in the presence of autologous FLS, autologous serum and IL-2. Results are expressed as mean cpm ($\pm$ S.E.M.) obtained from two different experiments. * P < 0.05; ** P < 0.005; *** P < 0.0005 versus unstimulated cells.



early and DMARD-resistant RA patients, baseline sIL-7R serum levels did not correlate with serum CRP values or with DAS28-CRP scores (data not shown).

Baseline sIL-7R serum predict response to therapy in RA

Synovial overexpression of IL-7R is associated with poor response to TNF blockade in DMARD-resistant RA patients [6]. We therefore wondered whether baseline serum sIL-7R levels would have the same informative value about response to TNF blocking therapy in RA. Strikingly, in patients displaying active disease despite DMARD therapy and subsequently treated with TNF blockade, elevated baseline sIL-7R serum levels strongly predicted poor response to anti-TNF therapy (Fig. 4A, B and C). A total of 55.5% of non-responders to infliximab therapy had an abnormal sIL-7R value at baseline, versus 15.3% of the responders. Conversely, normal baseline sIL-7R serum levels were associated with adequate response to therapy, with a sensitivity of 93% and a specificity of 56%. In case of low sIL-7R serum titres, patients have a 87% probability of being responders (predictive positive value); by contrast, in case of elevated sIL-7R serum levels, patients have a 71% probability of being non-responders (predictive negative value).

Discussion

In a first part of our work, we showed that soluble IL-7R α -chain (sIL-7R) gene expression is induced in FLS by the addition of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and combinations of TNF- α and IL-1 β or TNF- α and IL-17). Next, we investigated whether sIL-7R was detectable in the sera of healthy individuals and RA patients. We found that sIL-7R serum titres are significantly higher in early and in DMARD-resistant RA patients as compared to controls. We also found that high sIL-7R serum levels are strongly associated with poor response to TNF blockade in DMARD-resistant RA patients.

In a previous work, we performed global gene expression studies in synovial biopsies obtained from RA patients before initiation of anti-TNF therapy. We found, and confirmed by immunohistochemistry, that specific groups of genes were over-expressed in synovial tissue of non-responders at baseline. Interestingly, we demonstrated that these genes are induced in FLS by TNF- α , IL-1 β and by combinations of TNF- α , IL-1 β and IL-17. These observations indicate that the gene signatures in poor responders reflect synovial cell exposure to larger amounts and/or combinations of pro-inflammatory cytokines, potentially explaining the association with poor response to TNF-blockade alone [6].

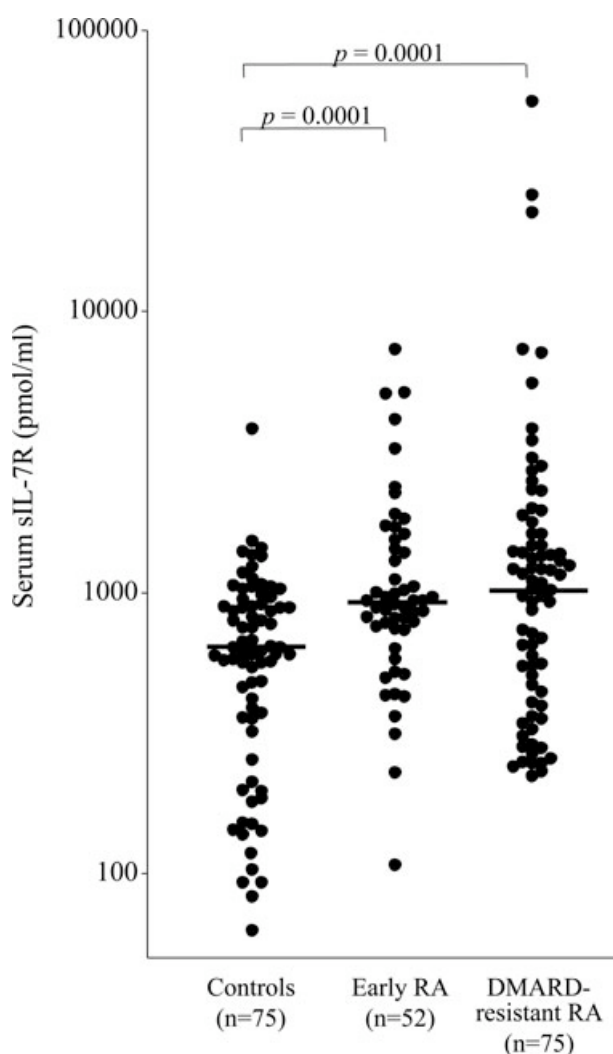


Fig. 3 Serum sIL-7R titres are significantly higher in early and DMARD-resistant RA patients. sIL-7R titres measured by sandwich ELISA in duplicate serum samples from healthy individuals, early RA and DMARD-resistant RA patients. The horizontal bar depicts the median value in each group.

Among the genes overexpressed in poor responders, the IL-7R α -chain came out as an interesting biomarker candidate. In an earlier study, we had described this gene to be the most differentially expressed in synovial biopsies from RA patients compared to patients with osteoarthritis or SLE, followed by other genes involved in T- and B-cell activation [12]. The functional IL-7 receptor is mainly expressed on Th1 and Th17 cells (by contrast to regulatory T cells) and is made of two chains: the IL-7R α -chain and the IL-2R γ -chain. Binding of IL-7 to its receptor induces T-cell proliferation and activation and this effect is more pronounced in Th17 cells. By contrast, SOCS1 induction by interferon- γ in Th1 cells has an inhibitory effect on IL-7R signalling

and IL-7 induced cell proliferation [13]. The role of the IL-7/IL-7R axis in the pathogenesis of RA was recently highlighted by the work of van Roon et al., who demonstrated that IL-7 is present in RA synovial fluid and stimulates proliferation of RA CD4 T cells and macrophages co-cultures [14]. Taken together, these data indicate that the IL-7/IL-7R axis could be a new target for therapy in RA [15, 16].

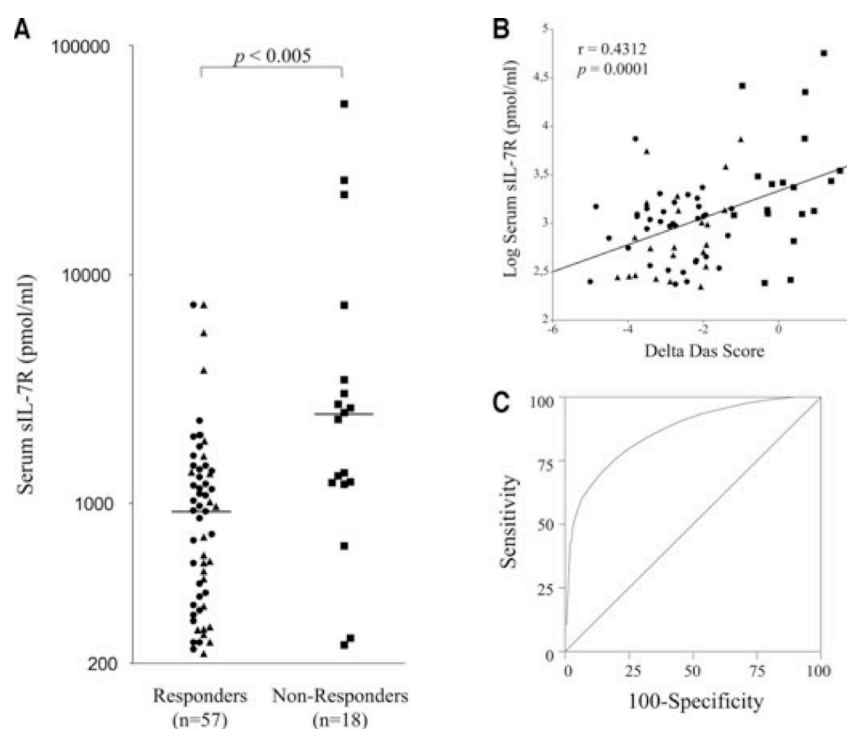
Here, we studied the expression of the IL-7R α -chain in synovial cells from RA patients, and found that cultured FLS produce the secreted form of the molecule. Although PCR and Western blot experiments indicate that FLS also display a positive signal for the full length IL-7R α -chain, we could not detect it by flow cytometry at the cell surface of resting or stimulated cells, and neither could we find any proliferative effect or induction of cytokines by FLS in response to IL-7 (data not shown). The soluble IL-7R has been described in fibroblast cell lines as the result of alternative splicing of the gene, leading to a transcript lacking exon 6, which encodes the transmembrane domain [7, 8]. We also show that addition of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-1 β , or combinations of TNF- α and IL-1 β or TNF- α and IL-17, stimulates the expression and secretion of sIL-7R by FLS. Other than FLS, we also detected expression of the sIL-7R gene in activated CD4 T cells, although to a lesser extent.

It has been demonstrated in the past that sIL-7R is able to bind and inhibit IL-7. We wondered whether such a mechanism could also be present in the context of RA and demonstrated that, while IL-7 stimulates synovial CD4 T-cell proliferation in response to FLS, IL-7 inhibition by a sIL-7R-Fc fusion protein induces the opposite effect. Taken together, these results indicate that sIL-7R is induced by pro-inflammatory cytokines in FLS and could play a role in a negative feedback loop through the inhibition of T-cell proliferation and activation. Synovial inflammation is the result of a balance between pro-inflammatory (IL-17, TNF- α , IL-1 β , IL-6, . . .) and anti-inflammatory (IL-10, IL-1ra, soluble TNF-receptors, . . .) stimuli. Our results support the hypothesis that sIL-7R is an additional natural inhibitor of synovial cell activation in RA.

Next, we studied whether sIL-7R was detectable in the serum of RA patients and controls. We also wanted to investigate whether serum titres correlate with RA disease severity and progression. We found that sIL-7R is readily detectable in the sera of healthy individuals, an observation that confirms recent findings [17, 18]. In our study, serum levels of the molecule are significantly higher in patients with early RA and in DMARD-resistant RA patients as compared to controls. It is impossible to track the origin of circulating sIL-7R molecules in the serum of RA patients; however, it is tempting to consider that at least part of it could result from synovial or CD4 T cell exposure to pro-inflammatory cytokines.

Strikingly, high baseline sIL-7R serum levels in DMARD-resistant RA patients are significantly associated with poor response to Infliximab. Conversely, lower serum levels of the molecule are strongly associated with adequate response to

Fig. 4 sIL-7R serum concentrations predict response to TNF blockade in RA. (A) sIL-7R titres measured by sandwich ELISA in duplicate baseline serum samples obtained in DMARD-resistant RA patients treated with 3 mg/kg infliximab. Patients were categorized in good-responders (circles), moderate- (triangles) and non-responders (squares) according to EULAR response criteria. The horizontal bar depicts the median value in each group. (B) Linear correlation between baseline sIL-7R serum levels and DAS-Score differences (follow-up minus baseline DAS28-CRP). (C) Receiving operating characteristic curve evaluating the value of baseline sIL-7R in predicting response to therapy. The curve was plotted by calculating sensitivity and specificity of the test at several cut-off values.



therapy. If we suggest that high serum sIL-7R titres result from fibroblast and/or CD4 T cell exposure to high levels of TNF- α and/or IL-1 β and/or IL-17, then the association with resistance to infliximab monotherapy is straightforward. In this context, however, it is possible that serum sIL-7R is also a marker of poor response to other therapeutic agents, and functions as a marker of disease severity rather than a specific marker of response to TNF blockade. Additional data are needed to clarify this issue.

In any case, with a predictive positive value of 87% and a predictive negative value of 71% for the prediction of good and moderate response to infliximab therapy in our group of patients, serum sIL-7R is a promising clinical biomarker that could aid individual therapeutic decisions in RA. Using such a biomarker in clinical practice would have an important impact in terms of patients' outcome and drug expenses. In the absence of selection, 25% of the patients described in this work did not respond to infliximab, a proportion in accordance with published data. If we had selected patients based on baseline sIL-7R serum levels, the proportion of non-responders would have dropped to 13%, while only 5% would have been switched to an alternative therapy although they would have responded to TNF blockade. Such differences are highly significant from a clinical point of view, which is why we strongly

advocate further validation of serum sIL-7R as a new clinical biomarker in RA.

Acknowledgements

The authors thank Mrs. Anne-Lise Maudoux (Department of Rheumatology, Université catholique de Louvain) for excellent technical assistance, Dr. Catherine Fillée (Department of Clinical Biology, Cliniques Universitaires Saint-Luc) for providing control serum samples and Dr. Nisha Limaye (Department of Human Genetics, Université catholique de Louvain), for critical reading of the manuscript.

This work was supported by grants from the Région Wallonne (Biowin), the Fonds de la Recherche Scientifique et Médicale (Belgium), the Fonds Spécial de Recherche (Communauté française de Belgique) and by an unrestricted grant from Abbott (Belgium).

A patent application was submitted by the Université catholique de Louvain and by BRL, VB, FAH and BVDE.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to disclose.

References

- Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, et al. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum.* 2000; 48: 35–45.
- Burmester GR, Mariette X, Montecucco C, et al. Adalimumab alone and in combination with disease-modifying antirheumatic drugs for the treatment of rheumatoid arthritis in clinical practice: the Research in Active Rheumatoid Arthritis (ReAct) trial. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66: 732–9.
- Weinblatt ME, Kremer JM, Bankhurst AD, et al. A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *N Engl J Med.* 1999; 340: 253–9.
- Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, et al. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet.* 1994; 344: 1105–10.
- Emery P, Fleischmann RM, Moreland LW, et al. Golimumab, a human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, injected subcutaneously every four weeks in methotrexate-naïve patients with active rheumatoid arthritis: twenty-four-week results of a phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study of golimumab before methotrexate as first-line therapy for early-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009; 60: 2272–83.
- Badot V, Galant C, Nzeusseu Toukap A, et al. Gene expression profiling in the synovium identifies a predictive signature of absence of response to adalimumab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2009; 11: R57.
- Goodwin RG, Friend D, Ziegler SF, et al. Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell.* 1990; 60: 941–51.
- Pleiman CM, Gimpel SD, Park LS, et al. Organization of the murine and human interleukin-7 receptor genes: two mRNAs generated by differential splicing and presence of a type I-interferon-inducible promoter. *Mol Cell Biol.* 1991; 11: 3052–9.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988; 31: 315–24.
- van Gestel AM, Prevoo ML, van 't Hof MA, et al. Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League Against Rheumatism Criteria. *Arthritis Rheum.* 1996; 39: 34–40.
- De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, et al. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 2001; 44: 1928–42.
- Nzeusseu Toukap A, Galant C, Theate I, et al. Identification of distinct gene expression profiles in the synovium of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2007; 56: 1579–88.
- Liu X, Leung S, Wang C, et al. Crucial role of interleukin-7 in T helper type 17 survival and expansion in autoimmune disease. *Nature Med.* 2010; 16: 191–7.
- van Roon JA, Verweij MC, Wijk MW, et al. Increased intraarticular interleukin-7 in rheumatoid arthritis patients stimulates cell contact-dependent activation of CD4(+) T cells and macrophages. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 1700–10.
- van Roon JA, Hartgring SA, Wenting-van Wijk M, et al. Persistence of interleukin 7 activity and levels on tumour necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66: 664–9.
- Hartgring SA, van Roon JA, Wenting-van Wijk M, et al. Elevated expression of interleukin-7 receptor in inflamed joints mediates interleukin-7-induced immune activation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009; 60: 2595–605.
- Faucher S, Crawley AM, Decker W, et al. Development of a quantitative bead capture assay for soluble IL-7 receptor alpha in human plasma. *PLoS ONE.* 2009; 4: e6690.
- Rose T, Lambotte O, Pallier C, et al. Identification and biochemical characterization of human plasma soluble IL-7R: lower concentrations in HIV-1-infected patients. *J Immunol.* 2009; 182: 7389–97.

DISCUSSION

DISCUSSION

Nous avons identifié des biomarqueurs synoviaux potentiels de non réponse à l'adalimumab dans une étude d'analyses transcriptomiques réalisées sur du tissu synovial provenant de 25 patients atteints de PR sévère réfractaire aux DMARDs, suivis prospectivement, avant et après 12 semaines de traitement. Cette signature de non réponse était enrichie en gènes impliqués principalement dans la prolifération cellulaire et dans la régulation de la réponse immunitaire.

Nous allons au cours de cette discussion dans un premier temps rappeler ce qui a déjà été observé dans la littérature sur l'identification de marqueur de réponse au traitement par agent bloquant le TNF α dans la PR et ce afin d'insister sur le caractère original et unique de notre travail.

Ensuite nous chercherons à comprendre l'information apportée par les signatures moléculaires identifiées. Ces signatures ont-elles un sens physiologique et sont-elles intéressantes pour comprendre les raisons d'un échec thérapeutique ? Sont-elles informatives d'un nouveau mécanisme physiopathologique dans la PR indépendant du TNF α ? Ou encore, ont-elles une application clinique ?

Enfin, dans la mesure où un des gènes identifiés, l'IL-7R et sa forme soluble peut être informatif à l'échelle individuelle pour dépister une non réponse aux agents bloquant le TNF α chez les patients avec une PR, nous tenterons de comprendre comment l'axe IL-7/IL-7R/IL-7Rs peut jouer un rôle dans la physiopathologie de la maladie et quelles en sont les implications futures.

1. Marqueurs de réponse aux anti-TNF α

Nombreuses sont les études réalisées sur l'identification de marqueurs de réponse au traitement dans la PR, bien qu'à ce jour, aucune ne soit très convaincante.

Identifier des marqueurs de réponse dans un groupe hétérogène de patients relève du défi. Durée de la maladie, sévérité, caractère érosif et fonctionnel, historique thérapeutique, traitement de fond associé, terrain ou prédisposition génétique « identique », type d'agents bloquant le TNF α , définition de la réponse, temps nécessaire de réponse, identification dans le sang ou dans la synoviale, identification par protéomique ou par la transcriptomique, ... sont autant de facteurs à prendre en compte dans la définition d'une population de patients atteints de PR.

On comprend rapidement que les items nécessaires pour définir l'homogénéité du groupe à étudier sont nombreux et peuvent rendre compte des résultats parfois contradictoires des études réalisées malgré un objectif commun qui est de prédire une réponse à un traitement par un agent bloquant le TNF α .

Nous allons dans les pages suivantes discuter les résultats les plus pertinents, et les mettre en perspective par rapport à nos propres résultats.

1.1. Biomarqueurs démographiques, cliniques ou radiologiques

Bien que nos patients avaient des PR dites sévères, érosives et réfractaires à au moins un DMARD (*Tableau 8*), nous n'avons parmi leurs caractéristiques démographiques, cliniques ou thérapeutiques trouvé aucune association avec un marqueur prédictif de la réponse. Ce qui rejoint les données de la littérature où de manière générale aucun paramètre démographique (durée de la maladie, âge, sexe, origine,...), clinique (activité de la maladie, compte articulaire, présence de nodules...) ou radiologique (présence d'érosion) n'est trouvé pour être un marqueur potentiel de réponse.

Les données de registres anglais (*British Society for Rheumatology Biologics Register*) ou suédois (*South Swedish Arthritis Treatment Group Register*) semblent démontrer que la prise de MTX préalable à l'initiation d'un traitement par anti-TNF α pourrait être prédictif de réponse (346, 347). Le tabac pourrait être un marqueur de non réponse à l'infliximab mais cela reste controversé pour l'etanercept (346, 348).

1.2. Biomarqueurs sanguins

1.2.1. Marqueurs inflammatoires et auto-anticorps: CRP, FR, anti-CCP

Très peu de marqueurs biologiques usuels (CRP, VS, FR et anti-CCP) décrits comme marqueurs d'activité ou de pronostic de la maladie ont été rapportés pour être des biomarqueurs de réponse (349, 350). Bien que non confirmées, certaines études observent que

la présence de FR (351), des taux élevés de FR de type IgA (352) ou des taux élevés d'anti-CCP avant le début du traitement sont associés à une réponse réduite aux anti-TNF α (353-356).

Nous n'avons pas observé dans notre étude d'association entre les non répondeurs et ces marqueurs, néanmoins le petit nombre de patients étudiés ne nous permet pas d'émettre de conclusions sur ce point.

Paramètres des patients avant traitement par adalimumab

Patients (n=25)		
Age (années)	55,2	min: 18-max: 83
Sexe (homme/femme)	7/18	
Durée de la PR (années)	10	min: 1- max: 36
Patients sous MTX	23	
Patients sous LEF	2	
Patients sous stéroïdes	18	
CRP (mg/dl)	2,96	min: 0,5-max: 12,2
DAS28 (CRP)	5,55	min: 4,05-max: 8,26
Patients avec AC anti-CCP	22	

Tableau 8. Paramètres cliniques, biologiques ou démographiques des patients.

Les caractéristiques cliniques, démographiques et biologiques des 25 patients inclus dans cette étude, avant mise en route d'un traitement par adalimumab au moment de la première biopsie synoviale sont décrits dans ce tableau. *MTX: Methotrexate, LEF: leflunomide, CRP: C-réactive protéine, AC anti-CCP: anticorps anti-peptide cyclique citrulliné, min : minimum, max : maximum.*

1.2.2. Autres marqueurs biologiques

Plusieurs équipes ont regardé le caractère prédictif de divers marqueurs biologiques tels que le dosage sérique d'interleukine (TNF α , IL-1, IL-6, IL-10, IFN- γ), de chémokines (IL-8, MCP-1..), de metalloprotéases matricielles (MMP-1 et MMP-3) de marqueurs du remodelage osseux (sRANKL et OPG), de marqueurs d'activité du cartilage (COMP). Aucune n'a pu réellement identifier de biomarqueur intéressant même si la plupart de ces paramètres évoluent sous l'effet du traitement (356-361). Seuls des taux sériques bas de COMP sont associés à une bonne réponse (ACR70) à 3 mois à l'adalimumab (359), des taux sériques faibles de sRANKL ou un ratio diminué OPG/sRANKL prédisent la réponse à l'adalimumab et à l'infliximab (357) ce qui laisse probablement supposer que des arthrites moins sévères soient plus sensibles au traitement.

On s'attendait bien évidemment à ce que le dosage sérique du TNF α chez les patients puisse être informatif sur leur capacité à répondre à ses inhibiteurs, cependant la détection de cette cytokine par les techniques actuelles reste très difficile et peu informative sur son caractère prédictif (354, 362). Dans le but de détecter autrement la forme active du TNF α , certains auteurs ont proposé de mesurer des marqueurs indirects de son activité comme le CRP ou le dosage de sRANKL ou encore par la mesure de la bioactivité de la molécule circulante (358).

De manière générale néanmoins, les dosages sanguins se sont révélés peu intéressants à l'échelle individuelle pour prédire la réponse aux traitements.

A l'inverse, la combinaison de marqueurs biologiques peut être plus utile et améliorer leur pouvoir prédictif dans la réponse au traitement comme cela a été proposé dans l'étude BeSt, selon un modèle matriciel pour les critères de sévérité de la maladie (363) ou pour les critères prédictifs de progression radiologique (364).

Dés lors, d'autres approches comme les analyses pharmacogénétique, protéomique ou transcriptomique semblent plus pertinentes dans la recherche de nouveaux biomarqueurs.

1.3. Biomarqueurs identifiés par la pharmacogénétique

Nombreuses sont les études pharmacogénétiques publiées sur le rôle des polymorphismes de gènes comme marqueurs de réponses aux agents bloquant le TNF α dans la PR, dans l'idée que le terrain génétique peut influencer les réponses au traitement.

Parmi les polymorphismes de gènes candidats les plus décrits pour être associés avec la réponse aux anti-TNF α , on trouve le génotype 308GG du TNF α . Il s'agit d'un polymorphisme situé dans la région promoteur du gène du TNF α associé à une meilleure réponse aux agents bloquant le TNF α (365, 366), cependant une méta-analyse récente remet en cause son rôle (367). D'autres polymorphismes de gènes sont rapportés tel que celui du récepteur du TNF α (TNFR2), (49), du récepteur du fragment Fc (368), de PTPRC (pour *Protein tyrosine phosphatase receptor C*) (369) ou encore du gène du CMH (370).

A ce jour, il n'est pas simple de les utiliser du fait du manque d'uniformisation des cohortes et du manque de reproductibilité des résultats. De toute évidence, les études d'association (GWAS) sont plus intéressantes pour trouver des SNP (pour *single-nucleotide polymorphism*) candidats associés à des mécanismes physiopathologiques que des marqueurs individuels de réponse aux traitements (371, 372).

1.4. Biomarqueurs identifiés par la pharmacogénomique

La pharmacogénomique serait dès lors une autre manière plus pertinente pour identifier des marqueurs de réponse soit par des analyses transcriptomiques soit par les analyses protéomiques.

1.4.1. Analyses protéomiques

Quelques études protéomiques sont disponibles à ce jour pour déterminer des marqueurs de réponse aux agents bloquant le TNF α dans la PR.

Drynda et al en 2004 ont montré que les concentrations basses plasmatiques et articulaires d'hétérocomplexes S100A8-A9 de petites protéines liant le calcium étaient prédictives de la réponse à l'étanercept après 3 mois (373).

L'équipe de Fabre et al en 2008 a rapporté sur 33 patients, en utilisant une biopuce à protéine commerciale permettant d'analyser 12 cytokines, que des taux élevés sériques de MCP-1 et de facteurs épidermiques (EGF pour *epidermal growth factor*) avant traitement étaient associées à une bonne réponse à l'étanercept à 3 mois (374).

Au moyen d'une autre méthode, l'équipe française de Trocme et al en 2009 a rapporté dans le sang de 60 patients 5 protéines différemment exprimées entre les bons répondeurs et les mauvais répondeurs aux anti-TNF α (infiximab) à 30 semaines. Ils ont identifié deux de ces protéines: le facteur plaquettaire 4, qui était surexprimé chez les mauvais répondeurs et l'apolipoprotéine A-1 pour être surexprimée chez les bons répondeurs (375).

Enfin, en combinant 3 techniques différentes (biopuce à antigène contenant plus de 500 peptides et protéines potentielles pour être des autoantigènes dans la PR, dosage de 12 cytokines en multiplex et une méthode ELISA classique), Hueber et al en 2009 ont identifié une signature de 24 biomarqueurs capables de prédire la réponse au traitement par etanercept à 3 mois et ce dans 3 groupes de patients d'ethnies différentes (29 caucasiens américains, 43 caucasiens suédois et 21 japonais). Dans cette signature, on retrouve deux marqueurs de réponse déjà décrits, les anti-CCP et les MCP-1 et d'autres molécules secrétées comme le fibrinogène, la calpastatine, l'HSP60, protéoglycans, l'IL-12p40, l'IL-15, l'IL-6 ou le TNF α (376).

1.4.2. Analyses transcriptomiques

Les études transcriptomiques de haute densité sont plus encourageantes sur l'information recherchée car elles permettent d'analyser l'expression génique globale des tissus de malades à différents stades de leur maladie. Cependant il reste à savoir quel est le site le plus informatif dans la PR, le sang plus accessible ou la synoviale, site majeur de la maladie.

1.4.2.1. Analyses transcriptomiques sur sang

En utilisant des cellules mononuclées circulantes du sang périphérique (PBMC) de 33 patients (PR très active et de longue durée) traités par infliximab (+MTX), Lequerré et al en 2006, ont identifié, à l'aide d'une puce de 12.000 sondes d'ADNc humain (permettant d'analyser plus de 10.000 gènes), 41 transcrits pour être différemment exprimés entre 6 patients répondeurs et 7 non répondeurs. Ils ont ensuite sélectionné 20 produits de transcription décrits pour être associés à la réponse au traitement et les ont testés sur un autre échantillon de 20 patients avec une sensibilité de 90 % et une spécificité de 70%. Toutefois, ces transcrits identifiés n'appartiennent à aucun processus biologique ou cellulaire pertinent (377).

Kozcan et al en 2007, ont identifiés sur des PBMC de 19 patients traités par etanercept, à l'aide d'une puce commerciale permettant d'analyser plus de 14.500 gènes connus, 42 gènes pour être différemment exprimés en fonction de la réponse et ce seulement après 3 jours de traitement. Une diminution précoce d'expression de gènes impliqués dans diverses voies et processus cellulaires (comme la signalisation du TNF α via NF κ b..) est associée à une bonne réponse clinique (378).

Sekiguchi et al en 2008 en utilisant une puce personnalisée de 747 gènes et en testant la totalité des cellules du sang (provenant de 18 patients traités par infliximab), ont identifié 18 gènes pour être différemment exprimés entre les bons et les mauvais répondeurs. Parmi ces gènes, les plus 10 premiers étaient liés à l'IFN. Cependant le seuil de différence d'expression des gènes était relativement bas (1,5) indiquant une réelle faiblesse de la valeur de ces résultats (379).

Parker et al en 2007 se sont focalisés sur des gènes régulés par NFκB en utilisant des puces commerciales de haute densité et testées sur les cellules du sang *total* de 60 patients débutant un traitement par méthotrexate ou par anti-TNFα (adalimumab, infliximab, etanercept), ils ont identifié 16 gènes différemment exprimés en fonction des deux groupes (380).

Julia et al en 2009 ont décrit un modèle de prédiction de la réponse sur 8 gènes (ex : IL2RB, HLA-DRB3..) au départ d'analyse d'expression de gènes sur puce commerciale de 47.000 transcrits et testés sur les cellules monocytaires du sang périphérique de 48 patients traités par infliximab. Ce modèle avait une valeur prédictive positive de 86% si appliqué à un autre groupe de patient. Ils ont également regardé par cytométrie de flux les populations cellulaires correspondantes en insistant sur un rôle potentiel prédictif des T régulateurs et de l'IL-2R dans la réponse à l'infliximab (381).

1.4.2.2. Analyses transcriptomiques synoviales

Comme nous venons de le voir, l'approche transcriptomique sur les cellules du sang de patients est certes plus simple, mais en définitive n'apporte que peu d'information utile sur l'identification de marqueur de réponse au traitement. Le nombre de gènes identifiés étant trop faible, le seuil de différence d'expression trop bas pour être interprétable, ou le fait que la polyarthrite n'est pas principalement une maladie systémique ne plaident pas en faveur des études transcriptomiques dans le sang pour identifier des biomarqueurs.

Comme nous l'avons introduit dans ce manuscrit, les principaux phénomènes physiopathologiques de la PR ont lieu dans la synoviale ainsi que les principaux mécanismes ciblés par les anti-TNFα: la recherche de biomarqueur de réponse dans la synoviale semble dès lors plus intéressante.

Parallèlement, le développement des biopsies par mini-arthroscopie, a permis l'accès au tissu synovial plus aisé et moins traumatique pour le patient. L'évaluation des traitements, l'identification des nouvelles cibles thérapeutiques et de biomarqueurs diagnostics ou pronostics par l'approche des biopsies synoviales font actuellement l'objet de recommandation standardisée pour être utilisée dans les études cliniques (382, 383). Plusieurs auteurs ont cherché à identifier des marqueurs de réponses au traitement en se concentrant sur l'expression de molécules ou de certains gènes dans le tissu synovial. Les techniques d'immunomarquages de biopsies synoviales et de quantification digitalisée standardisée ont facilité l'analyse des populations cellulaires ou des effets moléculaires au cours du traitement ou en fonction de la réponse (384).

Gene in RA synovial tissue	GenBank accession number	Gene description	Fold change
Up-regulated genes			
IL7R	BE217880	IL-7 receptor	4.73
CCL5	M21121	Chemokine (CC motif) ligand 5	4.16
SLC38A1	BF247552	Solute carrier family 38, member 1	3.60
TCF7	NM_003202	Transcription factor 7 (T cell specific, HMG box)	3.28
ADAMDEC1	NM_014479	ADAM-like, decysin 1	3.25
RASGRP1	NM_005739	RAS guanyl-releasing protein 1	2.85
LAX	NM_017773	Hypothetical protein FLJ20340	2.84
MYBL1	AW592266	v-myb myeloblastosis (avian) viral oncogene homolog-like 1	2.72
FLJ20202	AL046017	FLJ20202 protein	2.68
TCRB	MI5564	T cell receptor precursor	2.61
CYFIP2	AL161999	Cytoplasmic FMR-1-interacting protein 2	2.60
EST	AL559122	T cell receptor β -chain BV20S1, 5 BC1 mRNA expressed sequence tag	2.59
KIAA0746	AA522514	KIAA0746 protein	2.48
ITK	D13720	IL-2-inducible T cell kinase	2.45
C22orf5	NM_012264	Chromosome 22 open reading frame 5	2.44
TCRA	M12959	Human mRNA for T cell receptor α -chain	2.39
EST	A1825068	Transcribed sequences of expressed sequence tag	2.29
ICAM3	NM_002162	Intercellular adhesion molecule 3	2.27
P2RY8	AI436587	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2129397 3'	2.26
SELL	NM_000655	Selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1)	2.21
LEF1	AF288571	Lymphocyte enhancer-binding factor 1	2.20
CD2	NM_001767	CD2 antigen (p50), sheep red blood cell receptor	2.13
STRBP	AK024285	Spermatid perinuclear RNA binding protein	2.12
SAMD3	AI129628	Sterile α -motif domain-containing 3	2.08
RUNX3	AA541630	Runt-related transcription factor 3	2.08
PRDM1	AI692659	Positive regulatory domain-containing 1, with ZNF domain	2.06
CCR2	NM_000647	Chemokine (CC motif) receptor 2	2.06
Down-regulated genes			
C6orf37	AL078599	Human DNA sequence from clone RP5-991C6 on chromosome 6q14.1-15	0.50
EML1	AI825937	Echinoderm microtubule-associated protein-like 1	0.49
MCOLN3	AI636080	Mucolipin 3	0.47
SPIRE1	BC016825	Spir-1 protein	0.46
APLP2	BC004371	β -amyloid (A4) precursor-like protein 2	0.46
TFPI	AF021834	Tissue factor pathway inhibitor	0.45
GPR64	NM_005756	G protein-coupled receptor 64	0.44
EST	AW972292	Expressed sequence tag	0.44
HIST3H2A	BC001193	Homo sapiens histone 3, H2a mRNA	0.42
FLJ90724	NM_15362	Hypothetical protein FLJ90724	0.35
GLIPR1	U16307	Glioma pathogenesis-related 1	0.35
ADAM9	AF495383	ADAM-9 (meltrin γ)	0.34
LILRA2	NM_006866	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 1	0.31

Tableau 9. Signature de gènes différemment exprimés dans la PR.

Nzeusseu et al ont trouvé une liste de gènes surexprimés et réprimés dans le tissu synovial de PR (7 patients) en comparaison aux gènes exprimés dans le tissu synovial de lupus (6 patients) ou d'arthrose (6 patients) non traitée. Comme dans notre étude, ils ont utilisé pour leurs analyses d'expression des micropuces de haute densité (*GeneChip human Genome U133 Plus 2.0*). Ils ont identifié dans le tissu synovial des PR, par analyse de variance avec corrections de Benjamini-Hochberg pour les comparaisons multiples, 27 transcrits, dont l'IL-7R, pour être surexprimés et 13 transcrits réprimés en comparaison aux deux autres groupes. Les valeurs de différence d'expression (*Fold change*) sont définies comme une moyenne d'expression différentielle dans le tissu synovial PR en comparaison à celui de l'arthrose, avec une limite définie à < 2 ou > 2 (345).

1.4.2.2.1. *Analyses des populations cellulaires synoviales*

Des équipes de chercheurs ont montré que l'expression basale du TNF α dans la synoviale pouvait être prédictive de la réponse (385-388) liée principalement à la présence plus importante de macrophages (387) ou d'autres cellules produisant le TNF α (CD168, CD63, CD3). Cependant d'autres auteurs n'ont pas confirmé ces données (389, 390).

Certains auteurs attribuent un rôle prédictif dans la réponse aux anti-TNF α à la présence d'agrégats lymphocytaires dans la synovite (391).

Dans notre travail bien que nous ayons observé une diminution significative du nombre de macrophages au cours du traitement chez l'ensemble des patients (comme cela est décrit), nous n'avons cependant pas trouvé de paramètre histologique (hyperplasie synoviale, infiltrats périvasculaires, agrégats lymphocytaires) à l'exception de la fibrose et de la nécrose fibrinoïde pour être prédictif de la réponse. Cependant, bien qu'évalués par semi-quantifications, ces caractéristiques tissulaires peuvent être le reflet d'une maladie plus sévère chez les mauvais répondeurs (mais ceci doit être pris avec précaution devant le petit nombre de patients). De même, les immunomarquages, de populations cellulaires (macrophages, les lymphocytes B, les lymphocytes T ou neutrophiles) n'ont pas montré de lien avec la prédiction de la réponse.

1.4.2.2.2. *Analyse transcriptomique synoviale*

Par contre, l'analyse du profil d'expression de gènes dans la synoviale pourrait être un outil plus utile pour identifier les marqueurs de réponse au traitement.

Notre équipe avait montré précédemment que cette méthode avait permis d'identifier dans la synoviale une signature de gène propre à la PR (en comparaison avec d'autres pathologies rhumatismales comme l'arthrose ou le lupus) objectivant la puissance de cette approche méthodologique (345).

A ce jour quelques publications sur l'utilisation des microarrays dans l'étude de marqueurs synoviaux de réponse aux anti-TNF ont été rapportées.

En 2006, Lindberg et al (392) ont réalisé des études d'expression de gènes sur des biopsies synoviales de 10 patients traités par Infliximab (+MTX) et dont la réponse EULAR était déterminée à 8 semaines (3 bons répondeurs, 5 répondeurs modérés et 2 non répondeurs). À l'aide de puce personnalisée de 46.000 ADNc humains, ils ont initialement démontré que les variations d'expression de gène mesurées dans ce type d'étude étaient bien le reflet d'une signature unique de chaque patient et non le résultat d'une hétérogénéité tissulaire, fait important dans l'interprétation de résultats de ce type d'analyse. Ils ont ensuite identifié 279 gènes différemment exprimés au cours du traitement entre les patients bons répondeurs et les non répondeurs (dont TNF α surexprimé chez les bons répondeurs) et 382 gènes entre tous les répondeurs (bons et modérés) et les non répondeurs. Ils observent cependant un plus grand nombre de gènes (685) différemment exprimés au temps 0 entre les patients non répondeurs et ceux qui expriment du TNF α dans leur tissu synovial (scoré par immunohistochimie) alors

que seulement 12 gènes étaient différemment exprimés entre les patients exprimant du TNF α dans leur synoviale avant traitement et les patients n'en exprimant pas. Peu d'information sur la signification de ces gènes n'est cependant décrite et aucune confirmation des résultats n'a été réalisée soit par méthode d'amplification d'ADNc en temps réel (qRT-PCR pour *real time polymerase chain reaction*) ou par immunohistochimie comme c'est le cas dans nos travaux.

L'équipe de van der Pouw Kraan et al en 2008 (393) a analysé le profil d'expression génique sur des biopsies synoviales de 18 patients avant traitement et traités par Infliximab dont la réponse au traitement était déterminée par le Δ DAS 28 $\geq 1,2$ à 16 semaines. En utilisant des puces personnalisées de 43.000 ADNc humains, ils ont identifié une signature de gènes impliqués dans 9 processus biologiques (en utilisant des bases de données de type PANTHER et Gene Ontology) activement exprimés chez les patients « futurs » répondeurs tels que défense et immunité, immunité médiée par les cellules T, immunité médiée par le CMH II, ou adhésion cellulaire. Ils n'ont toutefois pas validé leur résultat par d'autre technique. Mais ils signalent (sans montrer les données) avoir observé chez les répondeurs, une cellularité synoviale plus importante (par immunohistochimie : CD3 et CD163) ainsi qu'une maladie plus active (CRP et indice d'activité).

Lindberg et al 2010 (388) ont étudié la différence d'expression de gènes sur des prélèvements synoviaux de 62 patients traités par Infliximab en utilisant une biopuce personnalisée de 17972 gènes et dont la réponse EULAR était définie à 16 semaines. Aucun gène n'a été identifié entre les 3 groupes de patients (bons répondeurs, répondeurs modérés ou non répondeurs), bien qu'ils tendent à décrire des gènes différemment exprimés chez les répondeurs (bons et modérés) impliqués dans les processus inflammatoires sans pouvoir identifier de marqueur prédictif. Ils ont ensuite analysé les patients présentant des agrégats lymphoïdes (AL) avant traitement (51 patients) et ont regardé les différences d'expression de gène en fonction de la réponse. Bien qu'aucune différence statistique n'ait été observée, ils trouvent 38 produits de transcription différemment exprimés entre les bons répondeurs et non répondeurs impliqués dans les voies métaboliques. Les auteurs suggèrent ainsi qu'un métabolisme de base élevé associé à un haut degré d'inflammation synoviale (estimé par la présence des AL) peut être prédictif d'une bonne réponse aux anti-TNF α .

Dés lors nous pouvons à l'issue de ces études appuyer le caractère original de notre travail d'une part par son aspect prospectif, d'autre part par le nombre de patients pour qui l'analyse de tissu synovial au moyen de puces de haute densité (permettant l'exploration de la quasi totalité du génome humain) a pu être réalisé. Et surtout, par la confirmation de nos données de microarrays soit par des expériences de PCR en temps réel pour certains gènes (bien que limitées par le manque de matériel) ou par des études immunohistochimiques reflétant cette fois l'aspect protéique de nos signatures de gènes.

La validité de notre approche a récemment été confirmée par le groupe de Yoon et al (181) qui ont étudié le rôle d'un facteur de transcription NF-AT5 dans la synovite rhumatoïde. L'activation de NF-AT5 est induite par les cytokines proinflammatoires, tels le TNF- α ou l'IL-1 β . En réalisant des études transcriptomiques de haute densité sur des RAFLS, les auteurs ont démontré que les gènes induits par l'inhibition de NF-AT5 se superposent partiellement aux gènes que nous avons identifiés comme étant surexprimés dans la synoviale des mauvais répondeurs au traitement par agents bloquant le TNF. Les résultats de cette publication sont un argument supplémentaire pour considérer que les signatures transcriptomiques que nous avons identifiées ne sont pas du 'bruit' (comme c'est souvent le

cas dans les études transcriptomiques), mais correspondent bien à une réalité physiopathologique pertinente pour la compréhension de la PR.

Bien entendu même si très informative, ce type d'analyse est encore laborieux et doit être réalisé sur un plus grand nombre de patients. Des puces de basse densité qui cibleraient les gènes les plus discriminants, plus faciles à fabriquer et moins coûteuses pourraient être un outil très utile dans le futur pour dépister des patients qui risquent de ne pas répondre à un anti-TNF α . Le support à étudier reste encore à discuter, le sang étant en routine clinique plus facile à explorer que le tissu synovial et moins traumatique pour le patient.

2. Que signifie la signature moléculaire identifiée chez les mauvais répondeurs aux agents bloquants le TNF α ?

2.1. Effets des anti-TNF dans la synoviale

Dans ce travail, nous montrons que chez les patients traités par adalimumab, on observe dans la synoviale, une diminution significative d'expression de gènes impliqués dans la division cellulaire et la réponse immunitaire (comme Zap70, LTB, CCL5 encore appelé *RANTES* molécule chémoattractive pour les lymphocytes B ou CTLA-4). Cependant c'est la première fois que des effets synoviaux globaux de molécules bloquant le TNF α sont démontrés sur la prolifération et la réponse inflammatoire dans la PR, même s'ils confirment des effets bien connus du TNF α . Comme proposé par Kirwan et al, la synovite rhumatoïde pourrait être le siège d'au moins deux « phénomènes pathologiques » (celui de l'inflammation synoviale et celui de l'hyperplasie synoviale) participant aux symptômes cliniques (douleur, gonflement articulaire) et aux lésions radiologiques (amincissement du cartilage et des érosions ostéocartilagineuses) (394).

L'efficacité d'un traitement ou de son échec dans la PR impliquerait ces deux processus dans la synoviale. De manière générale, on connaît l'effet des anti-TNF α dans la réponse inflammatoire, le blocage du TNF α , principale molécule pro-inflammatoire, implique une réduction de cytokines inflammatoires produites et une diminution d'activation cellulaire comme les lymphocytes T ou les macrophages synoviaux.

Cependant, l'effet dans la synoviale sur la prolifération cellulaire des agents bloquant le TNF α est plus difficile à démontrer et nettement plus discuté. Toutefois, il est essentiel pour l'interprétation des données de microarrays de connaître cet effet.

Les études histologiques synoviales s'accordent à dire qu'il apparaît sous l'effet du traitement une diminution de la cellularité synoviale principalement des macrophages (Par exemple : diminution expression CD68 et MMP3 sous l'effet de l'etanercept (395)) comme nous l'avons d'ailleurs montré dans notre étude. Il n'est pas encore clair à l'heure actuelle, si cette diminution est due à un réel effet inhibiteur des agents bloquant le TNF α sur la prolifération des macrophages et des fibroblastes synoviaux, à un effet inducteur sur l'apoptose de ces populations cellulaires, à une diminution de la migration cellulaire et de la rétention des cellules inflammatoires dans la synoviale (par diminution d'expression de chémokines ou de facteurs d'adhésion cellulaire) ou à un mélange de ces trois processus.

À noter enfin que la majorité des patients inclus dans notre étude étaient traités par une combinaison de MTX et d'adalimumab, conformément au consensus thérapeutique actuel. Ils étaient résistants au MTX en monothérapie lorsqu'un agent bloquant le TNF α a été introduit, et il est dès lors tentant d'attribuer au seul agent bloquant le TNF α la responsabilité des effets cliniques et transcriptomiques observés. En toute rigueur, il faut considérer la possibilité que les effets que nous observons soient plutôt le résultat de l'addition, ou de la synergie de ces deux types de médication.

2.2. Signature moléculaire prédictive d'une non réponse

La signature moléculaire surexprimée dans la synoviale des patients associée à une future non réponse aux anti-TNF α , était enrichie en gènes impliqués d'une part dans des processus de division cellulaire et d'autre part dans des processus de régulation de la réponse immunitaire.

Nous nous sommes dès lors demandés quelle pouvait être la signification des signatures moléculaires observées dans la synoviale chez les futurs non répondeurs. La première question que l'on s'est posée était de savoir si ces gènes étaient vraiment le reflet d'une prédiction de réponse à l'adalimumab ou n'était-ce pas simplement le reflet d'une maladie plus sévère ?

D'une part, nous n'avons trouvé aucune association entre les futurs non répondeurs et les paramètres utilisés pour définir une maladie sévère (présence d'une atteinte structurale de type érosive, de facteurs rhumatoïdes, d'anticorps anti-CCP, d'inflammation biologique ou de synovites actives).

D'autre part, les récents travaux réalisés par notre équipe ont identifié, en utilisant les mêmes outils d'analyse transcriptomique que dans ce travail, des signatures moléculaires prédictives de la réponse au rituximab chez des patients atteints de PR, totalement différentes de celles que nous avons observées (396). En particulier, les travaux réalisés ont démontré que la surexpression de gènes d'immunoglobulines (probablement un marqueur d'activation lymphocytaire B) est associée à la réponse au traitement au rituximab.

Cette différence de signatures moléculaires identifiée conforte l'hypothèse qu'elles ne sont pas liées à la sévérité de la maladie (et dès lors exprimées chez tous les patients non-répondeurs, et ce, quel que soit le traitement administré) mais qu'elles reflètent bien des mécanismes d'échappement spécifiques au médicament utilisé.

Nous avons voulu savoir ensuite si les gènes surexprimés chez les non répondeurs pouvaient être le signe d'une présence excessive de TNF α , à des taux tels que le traitement n'arrive pas à le bloquer, ou s'ils pouvaient résulter d'une exposition des cellules synoviales à d'autres cytokines que le TNF α ? Pour répondre à cette question, nous avons étudié *in vitro* les effets de différentes cytokines inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-17) seules ou en combinaison sur l'expression par des RAFLS d'un panel de gènes appartenant à la signature observée.

Nous avons sélectionné certains gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Ki67, CDC2 et GTSE1) ou dans la réponse immunitaire (IL-7R, IL-6 et IDO). Nous avons trouvé que l'ensemble de ces gènes dans des RAFLS issus de patients volontaires atteints de PR, sont induits par le TNF α ou l'IL-1 β ainsi que par des combinaisons de ces cytokines entre elles (TNF α et IL-1 β) ou avec l'IL-17 (TNF α et IL-17, IL-1 β et IL-17). A l'inverse, l'IL-6 n'a montré aucun effet sur l'induction de ces gènes. On pourrait expliquer le manque d'effet de l'IL-6 par l'absence d'IL-6R sur les RAFLS (240, 241). Nous sommes d'ailleurs en train d'effectuer des expériences afin de voir si les combinaisons d'IL-6 avec les autres cytokines pro-inflammatoires ne démasquent pas des effets synergiques sur l'expression des gènes étudiés.

Ces derniers résultats indiquent donc que la signature moléculaire associée à la non-réponse aux agents bloquant le TNF α peut en effet résulter d'une exposition des cellules synoviales à

des taux élevés de $\text{TNF}\alpha$ lui-même, mais également à d'autres cytokines ($\text{IL-1}\beta$) ou des combinaisons de cytokines ($\text{TNF}\alpha$ et $\text{IL-1}\beta$; $\text{TNF}\alpha$ et IL-17), ce qui implique donc ces cytokines dans les mécanismes potentiels de résistance au traitement anti-TNF.

La question suivante est d'identifier quelle cytokine ou combinaison de cytokines est en cause chez nos patients. Certains travaux ont tenté de répondre à cette question, en mesurant les niveaux d'expression des cytokines notamment du $\text{TNF}\alpha$ dans la synoviale ou des cellules qui la produisent. Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, cette attitude est controversée et a montré des résultats discordants. Ce n'est en partie pas surprenant car l'effet biologique d'une cytokine résulte non seulement de sa présence mais également de ses inhibiteurs naturels (TNFR soluble ou IL-1Ra). C'est pourquoi, il est plus intéressant d'étudier la signature moléculaire globale que d'étudier une cytokine isolément.

Dans l'objectif de déterminer s'il existait une signature moléculaire spécifique induit par le $\text{TNF}\alpha$ ou l' $\text{IL-1}\beta$ dans le RAFLS, nous avons réalisé des analyses transcriptomiques sur des RAFLS et comparé leurs profils globaux d'expression génique en réponse à l'une ou l'autre cytokine. Cependant les effets du $\text{TNF}\alpha$ et de l' $\text{IL-1}\beta$ sur le RAFLS se sont avérés entièrement redondants et les profils d'expression des gènes étaient totalement superposables (Figure 2) ne permettant pas d'identifier une signature propre à une cytokine.

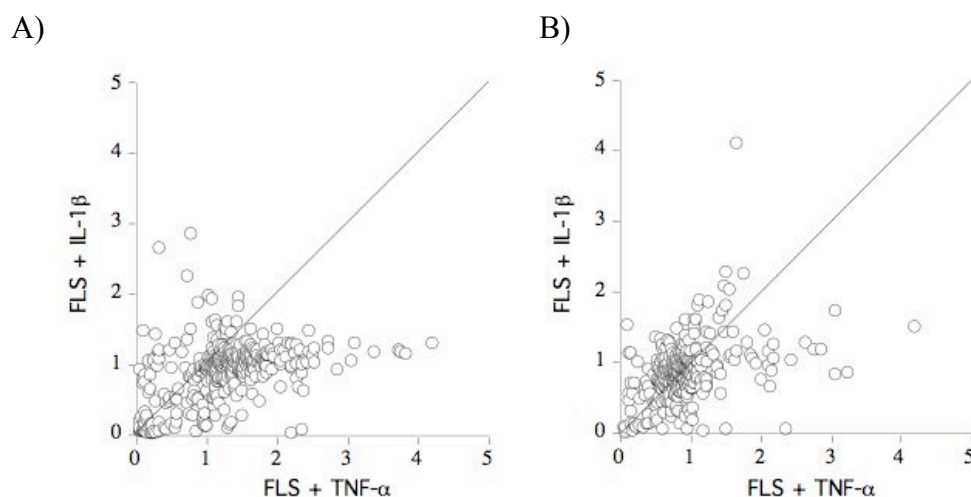


Figure 2. Profil d'expression des gènes induits par le $\text{TNF}\alpha$ et l' $\text{IL-1}\beta$ dans les RAFLS

Nous avons mesurés à l'aide de micropuces de haute densité (GeneChip Human Genome U133 plus 2.0 array *Affymetrix*), les différences d'expression de gènes induits dans des RAFLS, provenant de 2 patients différents A) et B) stimulés « overnight » par du $\text{TNF}\alpha$ (20 ng/ μl) ou de l' $\text{IL-1}\beta$ (20 ng/ μl). Nous avons ensuite comparé parmi les gènes sur-exprimés chez les non-répondeurs à l'adalimumab, quels étaient ceux qui étaient induits spécifiquement dans les RAFLS par une des deux cytokines. Aucun effet spécifique n'a été observé, les deux cytokines ayant des effets redondants sur l'expression de ces gènes dans le RAFLS. *RAFLS*: *rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte*, *TNF α* : *tumor necrosis α* , *IL-1 β* : *interleukine- β* .

2.3. Perspectives

C'est pourquoi nous aimerions prochainement réaliser d'autres expériences visant à étudier le profil de phosphorylation de kinases intracellulaires dans des RAFLS en réponse aux cytokines d'intérêt (TNF α , IL-1 β , IL-17, IL-6), et voir si des profils spécifiques de phosphorylation peuvent être identifiés. Si tel est le cas, des expériences similaires pourront être réalisées dans des biopsies synoviales de patients non-répondeurs aux agents bloquant le TNF, en vue de comparer les profils de phosphorylation des kinases dans ces tissus aux profils de réponse à des cytokines particulières.

A l'heure actuelle, il est impossible de préjuger du résultat de ces expériences. Il est probable cependant que nous rencontrerons des profils très hétérogènes chez les patients non-répondeurs, témoignant chez les uns d'un excès synovial de TNF α , chez les autres d'une imprégnation synoviale plus importantes d'autres cytokines. Dans la mesure où ces résultats pourraient avoir un impact thérapeutique direct pour nos patients, nous voulons avancer dans cette direction afin de non seulement comprendre les mécanismes de résistance, mais également identifier des marqueurs spécifiques pour les identifier dans des cas individuels.

3. Rôle de l'IL-7Rs dans la physiopathologie de la PR

Nous nous sommes finalement demandé si la signature moléculaire identifiée chez les non-répondeurs aux agents bloquant le TNF α pouvait être informative concernant d'autres mécanismes physiopathologiques impliqués dans la résistance aux anti-TNF dans la synovite rhumatoïde. Parmi les gènes surexprimés chez les non-répondeurs au traitement anti-TNF α , nous nous sommes intéressés à un gène en particulier : l'IL-7R α .

Nos travaux antérieurs ont en effet montré que ce gène pouvait être un marqueur synovial discriminant de la PR (345). Des analyses transcriptomiques réalisées sur des biopsies synoviales de patients atteints de PR débutantes sévères non traitées comparées à d'autres pathologies rhumatismales inflammatoires (arthrose en poussée ou lupus) ont identifié une signature propre à la PR dans laquelle on retrouvait l'IL-7R α comme étant le plus différentiellement exprimé dans le tissu synovial de ces patients (*Figure 3*).

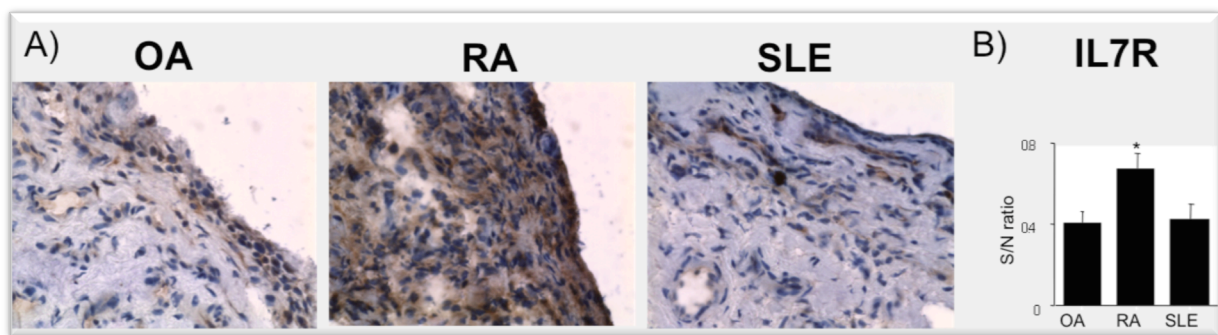


Figure 3. Expression de l'IL-7R dans la synoviale de pathologies articulaires

A) Analyses immunohistochimiques avec un anticorps dirigé contre l'IL-7R de biopsies synoviales de patients atteints d'arthrose (OA) (n=6), de PR (RA) (n=7) ou de lupus (SLE) (n=6). Un marquage important et diffus dans les couches bordante et profonde des coupes synoviales de patients atteints de PR est observé en comparaison à celui de lupus ou d'arthrose (images agrandies 400x).

B) Rapport entre la surface de marquage (S) et le marquage de noyau cellulaire (N). les coupes marquées pour l'IL-7R sont analysés par une technique validée utilisant un programme de quantification digitalisée (ImageJ) réalisées sur 6 coupes digitalisées (agrandissement 400 x) obtenues pour chaque échantillon. Les résultats sont exprimés en moyenne et en SEM. * = $p < 0.05$ et comparaison mesurée par un test de student. OA : *osteoarthritis*, RA : *rheumatoid arthritis*, SLE : *systemic lupus erythematosus*.

Nos analyses transcriptomiques synoviales nous ont par ailleurs permis d'identifier le gène de l'IL-7R α comme un gène de non réponse à l'adalimumab puisqu'il est surexprimé dans la synoviale des futurs non répondeurs et nous avons confirmé ces résultats en démontrant que son expression protéique l'est également. Nous avons ensuite constaté que son expression est induite dans le RAFLS sous l'effet de différentes cytokines proinflammatoires, seule (TNF α ou l'IL-1 β , alors que ce n'est pas le cas pour l'IL-6, IL-7 ou IL-17) ou en combinaison (IL-17 et TNF α , TNF α et IL-1 β).

Avant de poursuivre la discussion sur l'intérêt de ce marqueur dans la non réponse aux agents bloquants le $\text{TNF}\alpha$, nous allons rappeler quelques notions importantes concernant l'axe de l'IL-7 et son récepteur. Ensuite nous décrirons son intérêt potentiel dans la PR afin de comprendre pourquoi nous avons choisi de nous y intéresser dans ce travail.

3.1. IL-7/IL-7R α

3.1.1. IL-7

IL-7, autrefois appelé « lymphopoïétine 1 ou LP-1 » ou « facteur pré-B » est une cytokine découverte en 1988 comme facteur de croissance des précurseurs de lymphocytes B chez la souris, on lui décrit ensuite un rôle dans le développement des lymphocytes B et T chez les souris (397). Chez l'homme, l'IL-7 joue un rôle essentiel sur l'homéostasie des cellules T. Elle est principalement considérée comme un facteur de croissance pour le développement de ces cellules et un facteur de survie pour leur maintien en périphérie. Son action sur les lymphocytes B est moins claire chez l'homme (398).

Les mécanismes de production de l'IL-7 ne sont pas bien définis. Ce sont les cellules mésenchymateuses qui sont considérées comme les principales sources de cette cytokine essentiellement dans les tissus lymphoïdes incluant le thymus, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques, la peau, le foie et les intestins. Dans le thymus, les cellules prédominantes responsables de la production de l'IL-7 apparaissent pour être des cellules épithéliales avec un CMH de type II qui ressemblent aux cellules épithéliales corticales. D'autres cellules ont également été rapportées pour produire l'IL-7 comme les kératinocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules dendritiques folliculaires, les cellules musculaires lisses ou les macrophages (399-401)

3.1.2. IL-7R α et signalisation IL-7/IL-7R

La signalisation de l'IL-7 est assurée par son récepteur composé de deux chaînes.

La chaîne γ_c , (CD132) chaîne commune au récepteur d'autres cytokines de la famille de l'IL-2 (IL-2, IL-4, l'IL-9, l'IL-15, l'IL-21 et l'IL-33), cette chaîne est exprimée ubiquitairement sur les cellules hématopoïétiques (402).

L'IL-7 se lie principalement à un second composant de son récepteur la chaîne α du récepteur de l'IL-7 (IL-7R α ou CD127).

Les deux chaînes sont exprimées à la surface des cellules indépendamment l'une de l'autre mais sont indispensables à la signalisation de l'IL-7 ainsi qu'à son effet biologique.

Des mutations sur les chaînes IL-7R α ou γ_c sont associés à un défaut de développement ou de fonctions des lymphocytes T responsables du syndrome d'immunodéficience sévère combiné (SCID) (403, 404).

L'engagement de l'IL-7 sur son récepteur active au moins 3 cascades de signalisation: activation de la voie JAK/STAT, celle de PI3K et celle des MAPK assurant ainsi la survie, l'homéostasie et la différenciation des lymphocytes T (405) (Figure 4).

Le gène chez l'homme de l'IL-7R α est localisé sur le chromosome 5p13 (406). Il est composé de 8 exons et 7 introns. L'exon 6 code pour une partie de la portion extracellulaire et pour la portion transmembranaire de la région cytoplasmique. Des épissages alternatifs (délétion de l'exon 6) dans l'ARNm peuvent coder pour la forme sécrétée humaine de la chaîne IL-7R α (407, 408). De ce fait, la protéine du récepteur de l'IL-7R α peut exister sous deux formes, la forme membranaire et la forme soluble. L'affinité de IL-7 à ses deux récepteurs semble la même (409) .

L'IL-7R α peut également être un composant du récepteur d'une autre cytokine, la TSLP (pour *thymic stromal lymphopoietin*), homologue de l'IL-7 qui la partage avec le récepteur TSLPR (410).

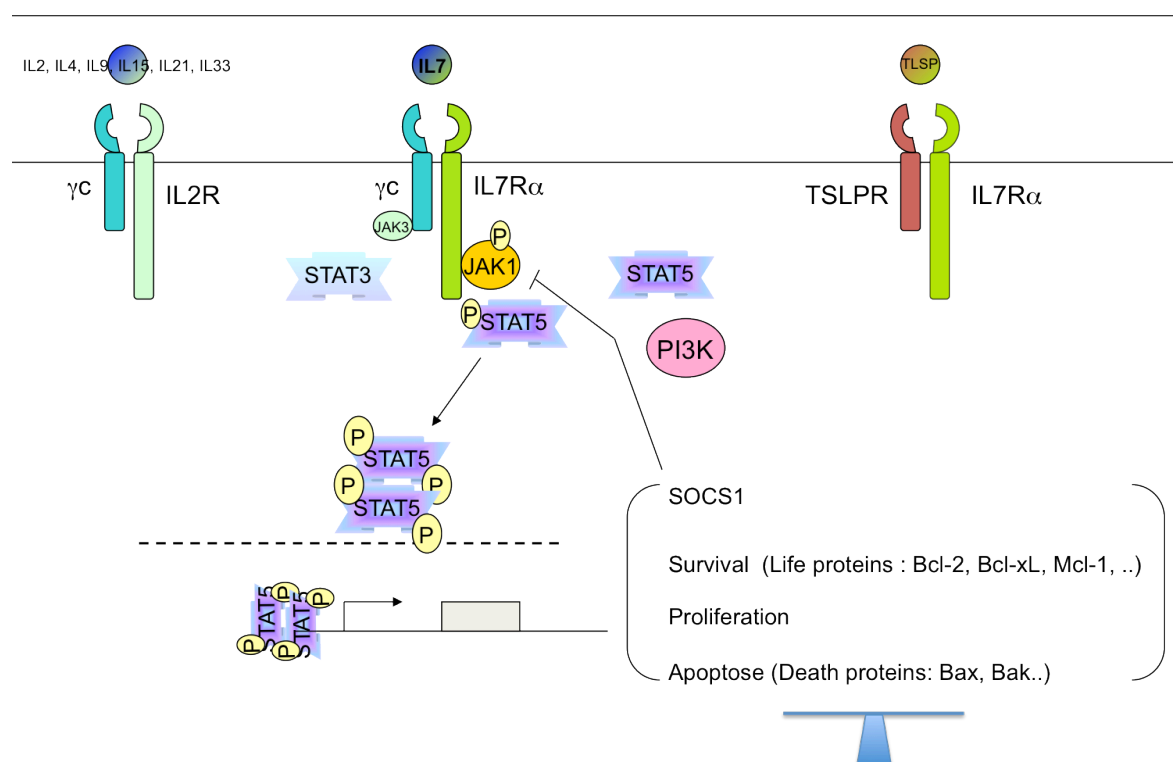


Figure 4. Signalisation IL7/IL7R α

L'IL-7 se lie à son récepteur composé de 2 chaînes : la chaîne IL-7R α et la chaîne γ C. La chaîne γ C est ubiquitaire et est commune au récepteur d'autres cytokines de la famille de l'IL-2 (comme l'IL-2, l'IL-4, l'IL-9, l'IL-15, l'IL-21 et l'IL-33). L'IL-7R α peut également être un composant du récepteur d'une autre cytokine, TSLP, avec le TSLPR. La signalisation de l'IL-7 et son récepteur active la voie de kinases comme JAK/STAT, de PI3K et celle des MAPK assurant ainsi la différenciation, le maintien et la prolifération des lymphocytes T. En se liant à son récepteur, l'IL-7 active JAK3 (associé à γ C) qui phosphoryle JAK1 (couplé à l'IL-7R α) et à la chaîne elle-même, créant ainsi un site de recrutement et d'ancrage pour les facteurs de transcription comme STAT5. Les molécules STAT5 sont elles-mêmes phosphorylées au niveau de tyrosine par les kinases JAK et peuvent dès lors après dimérisation traverser le noyau et assurer la transcription de plusieurs gènes spécifiques dépendant de l'IL-7 comme Bcl-2, des gènes de prolifération, des gènes impliqués dans l'apoptose ou de protéines de suppression induites par les cytokines comme SOCS1. SOCS1 peut ainsi bloquer l'activation de STAT5 dépendant de la signalisation par IL-7R α . Ainsi l'IL-7 peut induire un feed-back négatif sur sa propre signalisation en réprimant l'activation de JAK1. TSL: thymic stromal lymphopoietin, TSLPR: thymic stromal lymphopoietin receptor, JAK: Janus kinase, PI3K: phosphoinositide-3-kinase, STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription, SOCS: Suppressor of cytokine signaling.

3.1.3. Fonctions IL-7/IL-7R

IL-7	IL-7R α	Fonctions
Cellules stromales Sites lymphopoïétiques - Cellules épithéliales du thymus - Site médullaire - Organes lymphoïdes <i>Epithélium intestinal</i> <i>Kératinocytes</i> <i>Foie adulte et fœtal</i> <i>Cellules dendritiques</i> <i>Cellules endothéliales</i> <i>Cellules muscle lisse</i> <i>Fibroblastes</i>	Cellules hématopoïétiques Lignées lymphoïdes - Précurseurs lymphoïdes T/NK/B - Cellules T et B en développement - Cellules T matures Marqueur des lymphocytes T effecteurs activés Macrophages dérivés de la moelle osseuse <i>Cellules épithéliales intestinales</i> <i>Lignées tumorales</i> <i>Lymphomes T cutanés</i> <i>Cancer colorectal</i> <i>Cancer rénal</i> <i>Cellules endothéliales</i> <i>Cellules mésenchymateuses médullaires humaines</i>	Développement et homéostasie des cellules T périphériques - Développement des cellules T - Différentiation, survie et prolifération des cellules T naïves et mémoires - Maintien du pool de CD4 Activation des cellules de l'immunité innée Induction de cytokines par les monocytes

Tableau 10. Fonctions de l'IL-7 et son récepteur

La source principale d'IL-7 est représentée par les cellules stromales des sites lymphopoïétiques comme le thymus, la moelle osseuse ou les ganglions lymphatiques mais d'autres cellules sont capables de la sécréter comme les cellules endothéliales, épithéliales ou fibroblastiques. L'IL-7R α est principalement exprimé par les cellules hématopoïétiques des lignées lymphoïdes comme les précurseurs des lymphocytes T ou B, les cellules T naïves ou mémoires. Son expression peut être un marqueur d'activation des cellules T effecteurs. D'autres cellules sont décrites pour exprimer l'IL-7R α comme des cellules épithéliales, endothéliales, fibroblastiques ou tumorales. Les fonctions de l'IL-7 sont multiples. L'IL-7 joue essentiellement un rôle dans le développement et la différenciation des cellules T et dans leur maintien en stimulant leur prolifération, leur survie et leur expansion (398-401).

3.1.4. Régulation de l'IL-7R α et rôle dans les maladies auto-immunes

Liu et al 2010 ont démontré que l'IL-7 joue un rôle essentiel pour la survie et l'expansion des cellules T auxiliaires de type T_H17 dans un modèle murin d'encéphalite expérimentale auto-immune (EAE). Ils ont observé que cette cytokine intervient dans l'expansion de ces cellules dans ce modèle ainsi que sur des T_H17 humains provenant de patients atteints de sclérose en plaque alors qu'elle ne semble pas jouer de rôle dans leur différenciation. Des inhibiteurs de l'IL-7R pourraient rendre les cellules T_H17 différenciées sensibles à l'apoptose par la voie JAK-STAT5 en altérant l'expression de molécules pro-apoptotiques améliorant ainsi la maladie chez ces souris. Sur les populations T_H1, Liu observe que la signalisation de l'IL-7 est moins sensible du fait d'une surexpression de protéines SOCS1 (pour *suppressor of cytokine signaling 1*) dans ces cellules inhibant la transduction du signal de l'IL-7 (411).

3.2. IL-7/IL-7R dans la PR

3.2.1. IL-7 et IL-7R α dans le sang et l'articulation

Les taux d'IL-7 mesurés dans le sérum de patients PR sont plus élevés que chez des sujets contrôles bien que les résultats sont contradictoires (412-415).

Les taux d'IL-7 dans le liquide articulaire et la synoviale sont en moyenne plus élevés dans la PR en comparaison aux patients arthrosiques (85, 416, 417). Son expression synoviale est également augmentée dans la synovite rhumatoïde et associée à une maladie plus active en comparaison aux patients PR en rémission clinique. Comme nous l'avons observé dans nos travaux antérieurs, l'expression de l'IL-7R α dans la synoviale des PR est rapportée pour être plus élevée que dans d'autres conditions articulaires et la régulation de son expression pourrait contribuer à maintenir ou amplifier l'inflammation en activant les cellules de la synoviale. (418).

3.2.2. Rôle de l'IL-7 dans la synovite

Les taux d'IL-7 semblent étroitement liés dans la PR aux taux de TNF α (mesurés dans le tissu synovial par IHC ou dans le liquide articulaire par ELISA), et des études ont montré que le TNF α et l'IL-1 β induisent la production d'IL-7 par les cellules macrophagiques, endothéliales ou fibroblastiques (85, 196, 417). L'IL-7 en retour (« feed back loop ») peut stimuler la production de TNF α , uniquement sous la dépendance de contact cellulaire entre macrophages activés et lymphocytes T CD4 $^{+}$, alors que l'IL-7 n'induit pas la production de TNF α sur ces cellules isolément (85).

Autre fait intéressant, l'équipe de van Roon et al a montré que les patients en échec de traitement par agent bloquant le TNF α (adalimumab) ont des taux sériques persistants d'IL-7 laissant supposer que la production d'IL-7 pouvait être en partie indépendante du TNF α (419). Dans leurs expériences, cette équipe observe que la prolifération de cellules mononucléaires du liquide synovial induite par l'IL-7 n'est pas influencée par le blocage du TNF α . Ceci confirme un rôle important de l'IL-7 dans la physiopathologie de la PR qui potentiellement pourrait être indépendant du TNF α .

Dans la PR, de nombreux effets de l'IL-7 sont décrits dans les processus inflammatoires, la prolifération cellulaire et la destruction tissulaire.

Outre son effet sur la production de TNF α par les macrophages au contact de cellules CD4 $^{+}$, l'IL-7 est capable de stimuler, la production d'autres cytokines inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17 et MIP-1 β), ainsi que des chémokines ou des molécules impliquées dans la migration, l'adhésion ou la co-stimulation (420).

L'IL-7 est capable d'induire la production de cytokines de type T_H1 (TNF α et IFN γ) par des cellules T CD4 $^{+}$ synoviales et cette production peut être inhibée par l'ajout d'anticorps anti-IL-12 suggérant que l'IL-7 joue un rôle dans la différenciation et le maintien de ces cellules dans la synoviale (412). Elle peut également intervenir dans le maintien des lymphocytes T activés dépendant du contact cellulaire avec les monocytes/macrophages dans la synoviale ou

encore dans la perte de l'activité suppressive des Treg (421). Enfin, l'IL-7 pourrait jouer un rôle dans le maintien et l'expansion des cellules T_H17 dans la synovite (411). Son rôle dans la néoformation de tissus lymphoïdes ectopiques dans la synoviale a déjà été évoqué précédemment (100).

L'IL-7 participe également à la destruction ostéoarticulaire. Elle induit la perte osseuse en stimulant l'ostéoclastogénèse dépendante de RANKL, comme on peut l'observer chez les souris transgéniques pour IL-7 qui ont une activité ostéoclastique importante sans altération de la fonction ostéoblastique (422). L'IL-7 peut stimuler les chondrocytes à produire des protéases (MMP-13) et des protéoglycans participant à la dégradation matricielle du cartilage (423).

3.3. L'IL-7Rs: un nouvel acteur de la PR

Nos travaux ont montré que l'IL-7Rs est une molécule potentiellement pertinente dans la physiopathologie de la PR, d'une part parce qu'elle peut être un marqueur d'exposition des RAFLS aux cytokines pro-inflammatoires et d'autre part comme potentiel agent thérapeutique, via une inhibition de l'IL-7.

3.3.1. L'IL-7Rs: un marqueur d'activation des RAFLS

Comme la forme membranaire, la forme sécrétée de l'IL-7R α dans la synovite peut être le résultat d'exposition des RAFLS (ou de CD4 activés) à des cytokines proinflammatoires environnantes. En effet nos expériences ont montré que le TNF α , l'IL-1 β et les combinaisons de ces cytokines (TNF α +IL-1 β , IL-1 β et IL-17 ou TNF α +IL-17) induisent à la fois son expression dans le RAFLS et sa production dans le surnageant de ces cellules en culture. Ainsi, l'IL-7Rs pourrait être un marqueur d'activation de ces cellules dans la PR reflétant leur exposition à un environnement inflammatoire.

Ces éléments rejoignent nos observations cliniques dans lesquelles les taux sériques d'IL-7Rs mesurés par ELISA sont plus élevés chez des patients avec une PR débutante et non traitée en comparaison aux contrôles sains suggérant que la molécule pouvait être un reflet d'activité de la maladie ou même de sévérité puisque les taux sériques sont encore plus importants dans des PR actives, malgré un traitement de fond par MTX, que dans les PR débutantes.

Enfin, plus les taux sériques d'IL-7Rs des patients avec une PR sont élevés, moins ces patients répondent aux agents bloquant le TNF α , suggérant que ce marqueur d'activité inflammatoire peut également être un marqueur prédictif de réponse à ces traitements.

Nous aimerions dans des expériences futures améliorer ces données en dosant l'IL-7Rs dans le sérum de patients atteints d'autres pathologies inflammatoires (sclérodermie, lupus, maladie de Sjögren) afin de vérifier le rôle de cette molécule comme reflet d'activation cellulaire au niveau des tissus cibles, et d'autre part dans le sérum de patients avec une PR, afin de tester son association à la réponse à d'autres traitements, comme le MTX par exemple.

3.3.2. L'IL-7Rs: un inhibiteur de l'IL-7 ?

Goodwin en 1990 découvre que l'IL-7Rs lie l'IL-7 et bloque son activité (407). Hartgring et al le confirmeront plus tard dans leurs travaux, puisque l'ajout d'une forme soluble humaine d'IL-7R inhibe d'une manière dose dépendante la prolifération induite par l'IL-7 des cellules mononuclées du sang périphérique ou du liquide articulaire. De plus, cette molécule est capable d'inhiber la production d'INF γ par les cellules mononuclées du sang périphérique et du liquide synoviale de PR (418). Plus récemment Crawley et al confirment cet effet inhibiteur de l'IL-7Rs (de source plasmatique ou de forme recombinante) sur l'activité de l'IL-7 (424).

Nous avons démontré ce rôle de l'IL-7Rs sur les cellules synoviales dans nos expériences.

Partant du principe que les RAFLS peuvent se comporter comme des CPA exprimant des molécules CMH de classe II et activer des cellules T CD4 de la synoviale. Nous avons dans des expériences de coculture de cellules CD4+T provenant du liquide synovial en présence de RAFLS isolés de biopsie synoviale du même patient observé que l'effet de l'IL-7 stimulait la prolifération cellulaire. Alors que l'ajout d'IL-7R soluble inhibait cette prolifération. Ceci suggère que la prolifération des CD4 synoviaux activés au contact des RAFLS et de l'IL-7 pouvait être inhibée par l'IL-7Rs. Autrement dit, la production de l'IL-7Rs par les RAFLS pourrait jouer un rôle de rétrocontrôle négatif sur la prolifération de CD4 synoviaux activés.

3.3.3. Blocage de l'IL-7R : un intérêt thérapeutique dans la PR ?

D'après ces différents résultats, le blocage de l'IL-7R peut être intéressant dans la PR comme cible thérapeutique. Hartgring et al en 2010 ont montré que l'utilisation d'un anticorps anti-IL-7R α dans le modèle CIA diminue la sévérité de l'arthrite en réduisant l'inflammation et les destructions articulaires lié à une réduction du nombre de cellules T, de cytokines induites par les cellules T et de médiateurs impliqués dans l'inflammation et les destruction ostéocartilagineuses (425).

Nous aimerions dans des expériences futures étudier l'effet du blocage de l'IL-7 et de son récepteur dans des souris SCID-HuRAg afin de comprendre l'effet de blocage de la cytokine et de son récepteur dans la synoviale greffée ainsi que sur les populations cellulaires synoviales.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Silman A, Pearson J. 2002. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 4: S265 - S72
2. Alamanos Y, Drosos AA. 2005. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews* 4: 130-6
3. Tobon GJ, Youinou P, Saraux A. 2010. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity* 35: 10-4
4. Carmona L, Cross M, Williams B, Lassere M, March L. 2010. Rheumatoid arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 24: 733-45
5. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31: 315-24
6. Banal F, Dougados M, Combescur C, Gossec L. 2009. Sensitivity and specificity of the American College of Rheumatology 1987 criteria for the diagnosis of rheumatoid arthritis according to disease duration: a systematic literature review and meta-analysis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 68: 1184-91
7. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G. 2010. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Annals of the Rheumatic Diseases* 69: 1580-8
8. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JMW, Hobbs K, Huizinga TWJ, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovský J, Wolfe F, Hawker G. 2010. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis & Rheumatism* 62: 2569-81
9. Neogi T, Aletaha D, Silman AJ, Naden RL, Felson DT, Aggarwal R, Bingham CO, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JMW, Hobbs K, Huizinga TWJ, Kavanaugh A, Kay J, Khanna D, Kvien TK, Laing T, Liao K, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Nair R, Pincus T, Ringold S, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovský J, Wolfe F, Hawker G. 2010. The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: Phase 2 methodological report. *Arthritis & Rheumatism* 62: 2582-91
10. Duskin A, Eisenberg RA. 2010. The role of antibodies in inflammatory arthritis. *Immunological Reviews* 233: 112-25
11. Corrigall VM, Panayi GS. 2002. Autoantigens and immune pathways in rheumatoid arthritis. *Crit Rev Immunol* 22: 281-93

12. Song YW, Kang EH. 2010. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. *QJM* 103: 139-46
13. Edwards CJ, Goswami R, Goswami P, Syddall H, Dennison EM, Arden NK, Cooper C. 2006. Growth and infectious exposure during infancy and the risk of rheumatoid factor in adult life. *Annals of the Rheumatic Diseases* 65: 401-4
14. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. 2010. Rheumatoid arthritis. *The Lancet* 376: 1094-108
15. Nienhuis RL, Mandema E. 1964. A New Serum Factor in Patients with Rheumatoid Arthritis; the Antiperinuclear Factor. *Ann Rheum Dis* 23: 302-5
16. Young BJ, Mallya RK, Leslie RD, Clark CJ, Hamblin TJ. 1979. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J* 2: 97-9
17. Simon M, Girbal E, Sebbag M, Gomes-Daudrix V, Vincent C, Salama G, Serre G. 1993. The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called "antikeratin antibodies," autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 92: 1387-93
18. Girbal E, Sebbag M, Gomes-Daudrix V, Simon M, Vincent C, Serre G. 1993. Characterisation of the rat oesophagus epithelium antigens defined by the so-called 'antikeratin antibodies', specific for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 52: 749-57
19. Despres N, Boire G, Lopez-Longo FJ, Menard HA. 1994. The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 21: 1027-33
20. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. 1998. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 101: 273-81
21. Foulquier C, Sebbag M, Clavel C, Chapuy-Regaud S, Al Badine R, Méchin M-C, Vincent C, Nachat R, Yamada M, Takahara H, Simon M, Guerrin M, Serre G. 2007. Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. *Arthritis & Rheumatism* 56: 3541-53
22. Wegner N, Lundberg K, Kinloch A, Fisher B, Malmström V, Feldmann M, Venables PJ. 2010. Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews* 233: 34-54
23. Hill JA, Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E. 2003. Cutting Edge: The Conversion of Arginine to Citrulline Allows for a High-Affinity Peptide Interaction with the Rheumatoid Arthritis-Associated HLA-DRB1*0401 MHC Class II Molecule. *The Journal of Immunology* 171: 538-41
24. Liao F, Li Z, Wang Y, Shi B, Gong Z, Cheng X. 2009. Porphyromonas gingivalis may play an important role in the pathogenesis of periodontitis-associated rheumatoid arthritis. *Medical Hypotheses* 72: 732-5
25. Klareskog L, Malmstrom V, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. 2011. Smoking, citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Semin Immunol* 23: 92-8
26. van Venrooij WJ, van Beers JJBC, Pruijn GJM. 2011. Anti-CCP antibodies: the past, the present and the future. *Nat Rev Rheumatol* 7: 391-8
27. De Rycke L, Peene I, Hoffman IEA, Kruithof E, Union A, Meheus L, Lebeer K, Wyns B, Vincent C, Mielants H, Boullart L, Serre G, Veys EM, De Keyser F. 2004. Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. *Annals of the Rheumatic Diseases* 63: 1587-93
28. Aho K, Koskenvuo M, Tuominen J, Kaprio J. 1986. Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins. *J Rheumatol* 13: 899-902

29. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, Silman AJ. 2000. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis & Rheumatism* 43: 30-7
30. Silman AJ, Mac Gregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, Ollier W. 1993. Twin concordance rates for Rheumatoid Arthritis: Results from a nationwide Study. *Rheumatology* 32: 903-7
31. Pratt AG, Isaacs JD, Matthey DL. 2009. Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 23: 37-48
32. Gregersen PK. 2010. Susceptibility genes for rheumatoid arthritis - a rapidly expanding harvest. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 68: 179-82
33. Auger I, Roudier J. 1997. HLA-DR and the development of rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 26: 123-8
34. Auger I, Roudier J. 1997. Influence of the QKRAA/QRRAA/RRRAA motifs of the third hypervariable region of HLA-DRB1 in the development of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 24: 227-8
35. Auger I, Toussirot E, Roudier J. 1997. Molecular mechanisms involved in the association of HLA-DR4 and rheumatoid arthritis. *Immunol Res* 16: 121-6
36. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. 1987. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 30: 1205-13
37. Holoshitz J. 2010. The rheumatoid arthritis HLA-DRB1 shared epitope. *Current Opinion in Rheumatology* 22: 293-8 10.1097/BOR.0b013e328336ba63
38. Clarke A, Vyse T. 2009. Genetics of rheumatic disease. *Arthritis Research & Therapy* 11: 248
39. Lee HS, Korman BD, Le JM, Kastner DL, Remmers EF, Gregersen PK, Bae SC. 2009. Genetic risk factors for rheumatoid arthritis differ in Caucasian and Korean populations. *Arthritis Rheum* 60: 364-71
40. Morgan A, Robinson J, Conaghan P, Martin S, Hensor E, Morgan M, Steiner L, Erlich H, Gooi H-C, Barton A, Worthington J, Emery P, Consortium U, Consortium tY. 2010. Evaluation of the rheumatoid arthritis susceptibility loci HLA-DRB1, PTPN22, OLIG3/TNFAIP3, STAT4 and TRAF1/C5 in an inception cohort. *Arthritis Research & Therapy* 12: R57
41. Michou Lt, Lasbleiz S, Rat A-C, Migliorini P, Balsa A, Westhovens R, Barrera P, Alves H, Pierlot Cl, Glikmans E, Garnier S, Dausset J, Vaz C, Fernandes M, Petit-Teixeira E, Lemaire I, Pascual-Salcedo D, Bombardieri S, Dequeker J, Radstake TR, Van Riel P, van de Putte L, Lopes-Vaz A, Prum B, Bardin T, Dieudé P, Cornélis Fo, Families ECoRA. 2007. Linkage proof for PTPN22, a rheumatoid arthritis susceptibility gene and a human autoimmunity gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 1649-54
42. Plant D, Flynn E, Mbarek H, Dieudé P, Cornelis Fo, Arlestig L, Dahlqvist SR, Goulielmos G, Boumpas DT, Sidiropoulos P, Johansen JS, Ornbjerg LM, Hetland ML, Klareskog L, Filer A, Buckley CD, Raza K, Witte T, Schmidt RE, Worthington J. 2010. Investigation of potential non-HLA rheumatoid arthritis susceptibility loci in a European cohort increases the evidence for nine markers. *Annals of the Rheumatic Diseases* 69: 1548-53
43. Iwamoto T, Ikari K, Nakamura T, Kuwahara M, Toyama Y, Tomatsu T, Momohara S, Kamatani N. 2006. Association between PADI4 and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)* 45: 804-7
44. Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM, Spoerke JM, Conn MT, Chang M, Chang SY,

- Saiki RK, Catanese JJ, Leong DU, Garcia VE, McAllister LB, Jeffery DA, Lee AT, Batliwalla F, Remmers E, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Amos CI, Sninsky JJ, Gregersen PK. 2004. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 75: 330-7
45. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, de Bakker PIW, Le JM, Lee H-S, Batliwalla F, Li W, Masters SL, Booty MG, Carulli JP, Padyukov L, Alfredsson L, Klareskog L, Chen WV, Amos CI, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Gregersen PK. 2007. STAT4 and the Risk of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. *New England Journal of Medicine* 357: 977-86
 46. Freudenberg J, Lee HS, Han BG, Shin HD, Kang YM, Sung YK, Shim SC, Choi CB, Lee AT, Gregersen PK, Bae SC. 2011. Genome-wide association study of rheumatoid arthritis in Korea: Population-specific loci as well as overlap with European susceptibility loci. *Arthritis & Rheumatism* 68: 884-893
 47. Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, Liew A, Khalili H, Chandrasekaran A, Davies LRL, Li W, Tan AKS, Bonnard C, Ong RTH, Thalamuthu A, Pettersson S, Liu C, Tian C, Chen WV, Carulli JP, Beckman EM, Altshuler D, Alfredsson L, Criswell LA, Amos CI, Seldin MF, Kastner DL, Klareskog L, Gregersen PK. 2007. TRAF1-C5 as a Risk Locus for Rheumatoid Arthritis: A Genomewide Study. *New England Journal of Medicine* 357: 1199-209
 48. Kim YO, Kim HJ, Kim SK, Chung J-H, Hong S-J. 2010. Association of the CD28/CTLA4/ICOS polymorphisms with susceptibility to rheumatoid arthritis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 48: 345-53
 49. Hussein YM, Mohamed RH, Pasha HF, El-Shahawy EE, Alzahrani SS. 2011. Association of tumor necrosis factor alpha and its receptor polymorphisms with rheumatoid arthritis in female patients. *Cellular Immunology* In Press, Corrected Proof
 50. Pedersen M, Jacobsen S, Klarlund M, Pedersen B, Wiik A, Wohlfahrt J, Frisch M. 2006. Environmental risk factors differ between rheumatoid arthritis with and without auto-antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Research & Therapy* 8: R133
 51. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Källberg H, Bengtsson C, Grunewald J, Rönnelid J, Erlandsson Harris H, Ulfgren A-K, Rantapää-Dahlqvist S, Eklund A, Padyukov L, Alfredsson L. 2006. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: Smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis & Rheumatism* 54: 38-46
 52. Liao KP, Alfredsson L, Karlson EW. 2009. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology* 21: 279-83
10.1097/BOR.0b013e32832a2e16
 53. Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen K-A, Lundberg K, Kinloch A, Culshaw S, Potempa J, Venables PJ. 2010. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and α -enolase: Implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 62: 2662-72
 54. Berthelot J-M, Le Goff B. 2010. Rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Joint Bone Spine* 77: 537-41
 55. Lee Y, Bae S-C, Choi S, Ji J, Song G. 2011. The association between the PTPN22 C1858T polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis update. *Molecular Biology Reports*: 1-8
 56. Lee Y, Rho Y, Choi S, Ji J, Song G. 2007. PADI4 polymorphisms and rheumatoid arthritis susceptibility: a meta-analysis. *Rheumatology International* 27: 827-33

57. Thomson W, Barton A, Ke X, Eyre S, Hinks A, Bowes J, Donn R, Symmons D, Hider S, Bruce IN, Wilson AG, Marinou I, Morgan A, Emery P, Carter A, Steer S, Hocking L, Reid DM, Wordsworth P, Harrison P, Strachan D, Worthington J. 2007. Rheumatoid arthritis association at 6q23. *Nat Genet* 39: 1431-3
58. Dawidowicz K, Allanore Y, Guedj Ml, Pierlot Cl, Bombardieri S, Balsa A, Westhovens R, Barrera P, Alves H, Teixeira VH, Petit-Teixeira E, van de Putte L, van Riel P, Prum B, Bardin T, Meyer O, Cornélis Fo, Dieudé P, ECRAF f. 2011. The interferon regulatory factor 5 gene confers susceptibility to rheumatoid arthritis and influences its erosive phenotype. *Annals of the Rheumatic Diseases* 70: 117-21
59. Wang C, Kokkonen H, Sandling JK, Johansson M, Seddighzadeh M, Padyukov L, Rantapää-Dahlqvist S, Syvänen A-C. 2011. Preferential Association of Interferon Regulatory Factor 5 Gene Variants with Seronegative Rheumatoid Arthritis in 2 Swedish Case-Control Studies. *The Journal of Rheumatology*
60. Bartok B, Firestein GS. 2010. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 233: 233-55
61. Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K. 2000. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch Histol Cytol* 63: 17-31
62. Noss EH, Brenner MB. 2008. The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 223: 252-70
63. Henderson B, Pettipher ER. 1985. The synovial lining cell: Biology and pathobiology. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 15: 1-32
64. Morgan ME, Flierman R, van Duivenvoorde LM, Witteveen HJ, van Ewijk W, van Laar JM, de vries RRP, Toes REM. 2005. Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells. *Arthritis & Rheumatism* 52: 2212-21
65. Edwards JC, Wilkinson LS, Jones HM, Soothill P, Henderson KJ, Worrall JG, Pitsillides AA. 1994. The formation of human synovial joint cavities: a possible role for hyaluronan and CD44 in altered interzone cohesion. *J Anat* 185 (Pt 2): 355-67
66. Rosengren S, Boyle DL, Firestein GS. 2007. Acquisition, culture, and phenotyping of synovial fibroblasts. *Methods Mol Med* 135: 365-75
67. Henderson KJ, Edwards JC, Worrall JG. 1994. Expression of CD44 in normal and rheumatoid synovium and cultured synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis* 53: 729-34
68. Lee DM, Kiener HP, Agarwal SK, Noss EH, Watts GFM, Chisaka O, Takeichi M, Brenner MB. 2007. Cadherin-11 in Synovial Lining Formation and Pathology in Arthritis. *Science* 315: 1006-10
69. Athanasou NA. 1995. Synovial macrophages. *Ann Rheum Dis* 54: 392-4
70. Kinne RW, Brauer R, Stuhlmüller B, Palombo-Kinne E, Burmester G-R. 2000. Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2: 189 - 202
71. Kinne R, Stuhlmüller B, Burmester G-R. 2007. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages. *Arthritis Research & Therapy* 9: 224
72. Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B. 1996. Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39: 115-24
73. Seitz M. 1999. Molecular and cellular effects of methotrexate. *Current Opinion in Rheumatology* 11: 226
74. Gerlag DM, Haringman JJ, Smeets TJM, Zwinderman AH, Kraan MC, Laud PJ, Morgan S, Nash AFP, Tak PP. 2004. Effects of oral prednisolone on biomarkers in synovial tissue and clinical improvement in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 50: 3783-91

75. Haringman JJ, Gerlag DM, Zwinderman AH, Smeets TJ, Kraan MC, Baeten D, McInnes IB, Bresnihan B, Tak PP. 2005. Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 64: 834-8
76. Bresnihan B, Gerlag DM, Rooney T, Smeets TJM, Wijbrandts CA, Boyle D, Fitzgerald O, Kirkham BW, McInnes IB, Smith M, Ulfgren A-K, Veale DJ, Tak PP. 2007. Synovial macrophages as a biomarker of response to therapeutic intervention in rheumatoid arthritis: standardization and consistency across centers. *The Journal of Rheumatology* 34: 620-2
77. Szekanecz Zn, Koch AE. 2007. Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology* 19: 289-95
10.1097/BOR.0b013e32805e87ae
78. Radstake TRDJ, Roelofs MF, Jenniskens YM, Oppers-Walgreen B, van Riel PLCM, Barrera P, Joosten LAB, van den Berg WB. 2004. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 in rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 via interferon- γ . *Arthritis & Rheumatism* 50: 3856-65
79. Huang Q, Ma Y, Adebayo A, Pope RM. 2007. Increased macrophage activation mediated through toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 56: 2192-201
80. Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LAB, Koenders MI, Devesa I, Roelofs MF, Radstake TRDJ, Heuvelmans-Jacobs M, Akira S, Nicklin MJH, Ribeiro-Dias Ft, van den Berg WB. 2008. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *The Journal of Clinical Investigation* 118: 205-16
81. Roelofs MF, Wenink MH, Brentano F, Abdollahi-Roodsaz S, Oppers-Walgreen B, Barrera P, van Riel PLCM, Joosten LAB, Kyburz D, van den Berg WB, Radstake TRDJ. 2009. Type I interferons might form the link between Toll-like receptor (TLR) 3/7 and TLR4-mediated synovial inflammation in rheumatoid arthritis (RA). *Annals of the Rheumatic Diseases* 68: 1486-93
82. Clanchy FI, Sacre SM. 2010. Modulation of toll-like receptor function has therapeutic potential in autoimmune disease. *Expert Opinion on Biological Therapy* 10: 1703-16
83. McInnes IB, Leung BP, Liew FY. 2000. Cell-cell interactions in synovitis: Interactions between T lymphocytes and synovial cells. *Arthritis Res* 2: 374 - 8
84. Parry S, Sebbag M, Feldmann M, Brennan F. 1997. Contact with T cells modulates monocyte IL-10 production: role of T cell membrane TNF-alpha. *The Journal of Immunology* 158: 3673-81
85. van Roon JAG, Verweij MC, Wijk MW-v, Jacobs KMG, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG. 2005. Increased intraarticular interleukin-7 in rheumatoid arthritis patients stimulates cell contact-dependent activation of CD4⁺ T cells and macrophages. *Arthritis & Rheumatism* 52: 1700-10
86. Smeets TJM, Barg EC, Kraan MC, Smith MD, Breedveld FC, Tak PP. 2003. Analysis of the cell infiltrate and expression of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in arthroscopic synovial biopsies: comparison with synovial samples from patients with end stage, destructive rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 62: 635-8
87. Kaneko M, Tomita T, Nakase T, Ohsawa Y, Seki H, Takeuchi E, Takano H, Shi K, Takahi K, Kominami E, Uchiyama Y, Yoshikawa H, Ochi T. 2001. Expression of proteinases and inflammatory cytokines in subchondral bone regions in the destructive joint of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 40: 247-55

88. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14: 233-58
89. Collins M, Ling V, Carreno BM. 2005. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol* 6: 223
90. Moreland LW, Alten R, Van Den Bosch F, Appelboom T, Leon M, Emery P, Cohen S, Luggen M, Shergy W, Nuamah I, Becker J-C. 2002. Costimulatory blockade in patients with rheumatoid arthritis: A pilot, dose-finding, double-blind, placebo-controlled clinical trial evaluating CTLA-4Ig and LEA29Y eighty-five days after the first infusion. *Arthritis & Rheumatism* 46: 1470-9
91. Kremer JM, Westhovens R, Leon M, Di Giorgio E, Alten R, Steinfeld S, Russell A, Dougados M, Emery P, Nuamah IF, Williams GR, Becker J-C, Hagerty DT, Moreland LW. 2003. Treatment of Rheumatoid Arthritis by Selective Inhibition of T-Cell Activation with Fusion Protein CTLA4Ig. *New England Journal of Medicine* 349: 1907-15
92. Cutolo M, Soldano S, Montagna P, Sulli A, Serio B, Villaggio B, Triolo P, Clerico P, Felli L, Brizzolara R. 2009. CTLA4-Ig interacts with cultured synovial macrophages from rheumatoid arthritis patients and downregulates cytokine production. *Arthritis Research & Therapy* 11: R176
93. Azuma T, Zhu G, Xu H, Rietz AC, Drake CG, Matteson EL, Chen L. 2009. Potential role of decoy B7-H4 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: a mouse model informed by clinical data. *PLoS Med* 6: e1000166
94. Firestein GS, Zvaifler NJ. 1990. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? *Arthritis Rheum* 33: 768-73
95. Firestein GS, Zvaifler NJ. 2002. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?: II. T cell-independent mechanisms from beginning to end. *Arthritis Rheum* 46: 298-308
96. Fournier C. 2005. Where do T cells stand in rheumatoid arthritis? *Joint Bone Spine* 72: 527-32
97. Duke O, Panayi GS, Janossy G, Poulter LW. 1982. An immunohistological analysis of lymphocyte subpopulations and their microenvironment in the synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis using monoclonal antibodies. *Clin Exp Immunol* 49: 22-30
98. Weyand CM, Kurtin PJ, Goronzy JJ. 2001. Ectopic lymphoid organogenesis: a fast track for autoimmunity. *Am J Pathol* 159: 787-93
99. Thurlings RM, Wijbrandts CA, Mebius RE, Cantaert T, Dinant HJ, van der Pouw-Kraan TCTM, Verweij CL, Baeten D, Tak PP. 2008. Synovial lymphoid neogenesis does not define a specific clinical rheumatoid arthritis phenotype. *Arthritis & Rheumatism* 58: 1582-9
100. Timmer TCG, Baltus B, Vondenhoff M, Huizinga TWJ, Tak PP, Verweij CL, Mebius RE, van der Pouw Kraan TCTM. 2007. Inflammation and ectopic lymphoid structures in rheumatoid arthritis synovial tissues dissected by genomics technology: Identification of the interleukin-7 signaling pathway in tissues with lymphoid neogenesis. *Arthritis & Rheumatism* 56: 2492-502
101. Cope AP. 2008. T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 10 Suppl 1: S1
102. Goronzy JJ, Zettl A, Weyand CM. 1998. T cell receptor repertoire in rheumatoid arthritis. *Int Rev Immunol* 17: 339-63
103. Yang H, Rittner H, Weyand CM, Goronzy JJ. 1999. Aberrations in the primary T-cell receptor repertoire as a predisposition for synovial inflammation in rheumatoid arthritis. *J Invest Med* 47: 236-45

104. Melchers I, Jooss-Rudiger J, Peter HH. 1997. Reactivity patterns of synovial T-cell lines derived from a patient with rheumatoid arthritis. I. Reactions with defined antigens and auto-antigens suggest the existence of multireactive T-cell clones. *Scand J Immunol* 46: 187-94
105. Rittner HL, Zettl A, Jendro MC, Bartz-Bazzanella P, Goronzy JJ, Weyand CM. 1997. Multiple mechanisms support oligoclonal T cell expansion in rheumatoid synovitis. *Mol Med* 3: 452-65
106. Schirmer M, Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ. 1998. Resistance to apoptosis and elevated expression of Bcl-2 in clonally expanded CD4+CD28- T cells from rheumatoid arthritis patients. *J Immunol* 161: 1018-25
107. Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, Sakihama T, Matsutani T, Negishi I, Nakatsuru S, Sakaguchi S. 2003. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* 426: 454-60
108. Wang H, Kadlecsek TA, Au-Yeung BB, Goodfellow HE, Hsu LY, Freedman TS, Weiss A. 2010. ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a002279
109. Verheijden GF, Rijnders AW, Bos E, Coenen-de Roo CJ, van Staveren CJ, Miltenburg AM, Meijerink JH, Elewaut D, de Keyser F, Veys E, Boots AM. 1997. Human cartilage glycoprotein-39 as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 40: 1115-25
110. Bluestone JA, Mackay CR, O'Shea JJ, Stockinger B. 2009. The functional plasticity of T cell subsets. *Nat Rev Immunol* 9: 811-6
111. Bevaart L, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. 2010. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* 62: 2192-205
112. Kollias G, Papadaki P, Apparailly F, Vervoordeldonk MJ, Holmdahl R, Baumans V, Desaintes C, Di Santo J, Distler J, Garside P, Hegen M, Huizinga TW, Jungel A, Klareskog L, McInnes I, Ragoussis I, Schett G, Hart B, Tak PP, Toes R, van den Berg W, Wurst W, Gay S. 2011. Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment. *Ann Rheum Dis* 70: 1357-62
113. Vermeire K, Heremans H, Vandeputte M, Huang S, Billiau A, Matthys P. 1997. Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *The Journal of Immunology* 158: 5507-13
114. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6: 1123-32
115. Miossec P. 2007. Interleukin-17 in fashion, at last: Ten years after its description, its cellular source has been identified. *Arthritis & Rheumatism* 56: 2111-5
116. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6: 1133-41
117. Steinman L. 2007. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 13: 139-45
118. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. 2009. Interleukin-17 and Type 17 Helper T Cells. *New England Journal of Medicine* 361: 888-98
119. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. 2007. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. *Nature* 448: 484-7

120. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. 2006. Transforming growth factor-[beta] induces development of the TH17 lineage. *Nature* 441: 231-4
121. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. 2006. TGF[beta] in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells. *Immunity* 24: 179-89
122. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235-8
123. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. 2007. Interleukins 1[beta] and 6 but not transforming growth factor-[beta] are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8: 942-9
124. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron J-C, Kastelein RA, Cua DJ, McClanahan TK, Bowman EP, de Waal Malefyt R. 2007. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8: 950-7
125. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK, Hafler DA. 2008. IL-21 and TGF-[bgr] are required for differentiation of human TH17 cells. *Nature* 454: 350-2
126. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. 2006. The Orphan Nuclear Receptor ROR[gamma]t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell* 126: 1121-33
127. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M-r, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y-J, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA. 2000. Novel p19 Protein Engages IL-12p40 to Form a Cytokine, IL-23, with Biological Activities Similar as Well as Distinct from IL-12. *Immunity* 13: 715-25
128. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ. 2003. Divergent Pro- and Antiinflammatory Roles for IL-23 and IL-12 in Joint Autoimmune Inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* 198: 1951-7
129. Cua D, Sherlock J, Chen Y, Murphy C, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T. 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 42: 744 - 8
130. McGeachy MJ, Cua DJ. 2008. Th17 Cell Differentiation: The Long and Winding Road. *Immunity* 28: 445-53
131. Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, Maeda S, Teradaira S, Sugimoto N, Yamaguchi T, Nomura T, Ito H, Nakamura T, Sakaguchi N, Sakaguchi S. 2007. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *The Journal of Experimental Medicine* 204: 2803-12
132. Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Peired A, Frosali F, Crome SQ, Querci V, Fambrini M, Liotta F, Levings MK, Maggi E, Cosmi L, Romagnani S, Annunziato F. 2010. CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC. *European Journal of Immunology* 40: 2174-81

133. Milner JD, Sandler NG, Douek DC. 2010. Th17 cells, Job's syndrome and HIV: opportunities for bacterial and fungal infections. *Current Opinion in HIV and AIDS* 5: 179-83 10.1097/COH.0b013e328335ed3e
134. van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Kullberg BJ, van der Meer JW, Joosten LA, Netea MG. 2009. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB Rep* 42: 776-87
135. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155: 1151-64
136. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. 2008. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* 133: 775-87
137. Rudensky AY. 2011. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunological Reviews* 241: 260-8
138. Roncarolo MG, Gregori S. 2008. Is FOXP3 a bona fide marker for human regulatory T cells? *European Journal of Immunology* 38: 925-7
139. Flores-Borja F, Jury EC, Mauri C, Ehrenstein MR. 2008. Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19396-401
140. Möttönen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomäki P, Luukkainen R, Lassila O. 2005. CD4⁺ CD25⁺ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clinical & Experimental Immunology* 140: 360-7
141. Stockis J, Colau D, Coulie PG, Lucas S. 2009. Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg. *Eur J Immunol* 39: 3315-22
142. Probst-Keppler M, Buer J. 2010. FOXP3 and GARP (LRRC32): the master and its minion. *Biol Direct* 5: 8
143. Liu W, Putnam AL, Xu-yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, de St. Groth BF, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. 2006. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *The Journal of Experimental Medicine* 203: 1701-11
144. Simonetta F, Chiali A, Cordier C, Urrutia A, Girault I, Bloquet S, Tanchot C, Bourgeois C. 2010. Increased CD127 expression on activated FOXP3⁺CD4⁺ regulatory T cells. *European Journal of Immunology* 40: 2528-38
145. van Amelsfort JMR, Jacobs KMG, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG, Taams LS. 2004. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in rheumatoid arthritis: Differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis & Rheumatism* 50: 2775-85
146. Cao D, Vollenhoven Rv, Klareskog L, Trollmo C, Malmstrom V. 2004. CD25^{bright}CD4⁺ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res Ther* 6: R335 - R46
147. Liu MF, Wang CR, Fung LL, Lin LH, Tsai CN. 2005. The Presence of Cytokine-Suppressive CD4⁺CD25⁺ T Cells in the Peripheral Blood and Synovial Fluid of Patients with Rheumatoid Arthritis. *Scandinavian Journal of Immunology* 62: 312-7
148. Oh S, Rankin AL, Caton AJ. 2010. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in autoimmune arthritis. *Immunol Rev* 233: 97-111
149. Housley WJ, Adams CO, Nichols FC, Puddington L, Lingenheld EG, Zhu L, Rajan TV, Clark RB. 2011. Natural but Not Inducible Regulatory T Cells Require TNF- α Signaling for In Vivo Function. *The Journal of Immunology* 186: 6779-87

150. Protheroe A, Edwards JC, Simmons A, Maclellan K, Selby P. 1999. Remission of inflammatory arthropathy in association with anti-CD20 therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *Rheumatology (Oxford)* 38: 1150-2
151. Stewart M, Malkovska V, Krishnan J, Lessin L, Barth W. 2001. Lymphoma in a patient with rheumatoid arthritis receiving methotrexate treatment: successful treatment with rituximab. *Annals of the Rheumatic Diseases* 60: 892-3
152. Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JrJ, Weyand CM. 2001. T Cell Activation in Rheumatoid Synovium Is B Cell Dependent. *The Journal of Immunology* 167: 4710-8
153. Tanaka-Watanabe Y, Matsumoto I, Iwanami K, Inoue A, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. 2009. B cells play a crucial role as antigen-presenting cells and collaborate with inflammatory cytokines in glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis. *Clinical & Experimental Immunology* 155: 285-94
154. van de Veerdonk FL, Lauwerys B, Marijnissen RJ, Timmermans K, Di Padova F, Koenders MI, Gutierrez-Roelens I, Durez P, Netea MG, van der Meer JWM, van den Berg WB, Joosten LAB. 2011. The anti-CD20 antibody rituximab reduces the T helper 17 response. *Arthritis & Rheumatism* 63:1507-1516
155. Gutierrez-Roelens I, Galant C, Theate I, Lories R, Durez P, Nzeusseu-Toukap A, Van den Eynde B, Houssiau F, Lauwerys B. 2011. Rituximab treatment induces the expression of genes involved in healing processes in the rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum* 63: 1246-54
156. Roosnek E, Lanzavecchia A. 1991. Efficient and selective presentation of antigen-antibody complexes by rheumatoid factor B cells. *J Exp Med* 173: 487-9
157. Martinez-Gamboa L, Brezinschek H-P, Burmester GR, Dörner T. 2006. Immunopathologic role of B lymphocytes in rheumatoid arthritis: Rationale of B cell-directed therapy. *Autoimmunity Reviews* 5: 437-42
158. Takemura S, Braun A, Crowson C, Kurtin PJ, Cofield RH, O'Fallon WM, Goronzy JrJ, Weyand CM. 2001. Lymphoid Neogenesis in Rheumatoid Synovitis. *The Journal of Immunology* 167: 1072-80
159. Shi K, Hayashida K, Kaneko M, Hashimoto J, Tomita T, Lipsky PE, Yoshikawa H, Ochi T. 2001. Lymphoid Chemokine B Cell-Attracting Chemokine-1 (CXCL13) Is Expressed in Germinal Center of Ectopic Lymphoid Follicles Within the Synovium of Chronic Arthritis Patients. *The Journal of Immunology* 166: 650-5
160. Rosengren S, Wei N, Kalunian KC, Kavanaugh A, Boyle DL. 2011. CXCL13: a novel biomarker of B-cell return following rituximab treatment and synovitis in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 50: 603-10
161. Cantaert T, Kolln J, Timmer T, van der Pouw Kraan TC, Vandooren B, Thurlings RM, Canete JD, Catrina AI, Out T, Verweij CL, Zhang Y, Tak PP, Baeten D. 2008. B Lymphocyte Autoimmunity in Rheumatoid Synovitis Is Independent of Ectopic Lymphoid Neogenesis. *The Journal of Immunology* 181: 785-94
162. Stashenko P, Nadler L, Hardy R, Schlossman S. 1980. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *The Journal of Immunology* 125: 1678-85
163. Paiva Mr, Marques H, Martins n, Ferreira P, Catarino R, Medeiros R. 2008. Fc[gamma]RIIa polymorphism and clinical response to rituximab in non-Hodgkin lymphoma patients. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 183: 35-40
164. Edwards JCW, Cambridge G. 2001. Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes. *Rheumatology* 40: 205-11
165. Edwards JCW, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, Stevens RM, Shaw T. 2004. Efficacy of B-Cell-Targeted Therapy with

- Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine* 350: 2572-81
166. Mor A, Abramson SB, Pillinger MH. 2005. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clinical Immunology* 115: 118-28
 167. Huber LC, Distler O, Tarner I, Gay RE, Gay S, Pap T. 2006. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 45: 669-75
 168. Müller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O, Pap T. 2007. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis Research & Therapy* 9: 1-10
 169. Roelofs MF, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, van Lieshout AW, Sprong T, van den Hoogen FH, van den Berg WB, Radstake TR. 2005. The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis Rheum* 52: 2313-22
 170. Kim KW, Cho ML, Lee SH, Oh HJ, Kang CM, Ju JH, Min SY, Cho YG, Park SH, Kim HY. 2007. Human rheumatoid synovial fibroblasts promote osteoclastogenic activity by activating RANKL via TLR-2 and TLR-4 activation. *Immunol Lett* 110: 54-64
 171. Huang Q, Pope RM. 2010. Toll-like receptor signaling: a potential link among rheumatoid arthritis, systemic lupus, and atherosclerosis. *J Leukoc Biol* 88: 253-62
 172. Neumann E, Lefevre S, Zimmermann B, Gay S, Muller-Ladner U. 2010. Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts. *Trends Mol Med* 16: 458-68
 173. Neidhart M, Gay RE, Gay S. 2000. Anti-interleukin-1 and anti-CD44 interventions producing significant inhibition of cartilage destruction in an in vitro model of cartilage invasion by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism* 43: 1719-28
 174. Karouzakis E, Gay RE, Michel BA, Gay S, Neidhart M. 2009. DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism* 60: 3613-22
 175. Pap T, Franz JK, Hummel KM, Jeisy E, Gay R, Gay S. 2000. Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: lack of expression of the tumour suppressor PTEN at sites of invasive growth and destruction. *Arthritis Res* 2: 59 - 64
 176. Firestein GS. 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423: 356-61
 177. Korb A, Pavenstädt H, Pap T. 2009. Cell death in rheumatoid arthritis. *Apoptosis* 14: 447-54
 178. Niedermeier M, Pap T, Korb A. 2010. Therapeutic opportunities in fibroblasts in inflammatory arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24: 527-40
 179. Jang J, Lim D-S, Choi Y-E, Jeong Y, Yoo S-A, Kim W-U, Bae Y-S. 2006. MLN51 and GM-CSF involvement in the proliferation of fibroblast-like synoviocytes in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 8: R170
 180. Lim DS, Bae YS. 2011. Metastatic lymph node 51 and fibroblast-like synoviocyte hyperproliferation in rheumatoid arthritis pathogenesis. *Rheumatol Int*
 181. Yoon HJ, You S, Yoo SA, Kim NH, Kwon HM, Yoon CH, Cho CS, Hwang D, Kim WU. 2011. NFAT5 is a critical regulator of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*
 182. Kiener HP, Niederreiter B, Lee DM, Jimenez-Boj E, Smolen JS, Brenner MB. 2009. Cadherin 11 promotes invasive behavior of fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheum* 60: 1305-10

183. Pap T, Van Der Laan WH, Aupperle KR, Gay RE, Verheijen JH, Firestein GS, Gay S, Neidhart M. 2000. Modulation of fibroblast-mediated cartilage degradation by articular chondrocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 43: 2531-6
184. Schett G, Hayer S, Zwerina J, Redlich K, Smolen JS. 2005. Mechanisms of Disease: the link between RANKL and arthritic bone disease. *Nat Clin Pract Rheum* 1: 47-54
185. Bosma MJ, Carroll AM. 1991. The Scid Mouse Mutant: Definition, Characterization, and Potential Uses. *Annual Review of Immunology* 9: 323-50
186. Muller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE, Gay S. 1996. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol* 149: 1607-15
187. Pierer M, Müller-Ladner U, Pap T, Neidhart M, Gay RE, Gay S. 2003. The SCID mouse model: novel therapeutic targets – lessons from gene transfer. *Springer Seminars in Immunopathology* 25: 65-78
188. Geiler T, Kriegsmann J, Keyszer GM, Gay RE, Gay S. 1994. A new model for rheumatoid arthritis generated by engraftment of rheumatoid synovial tissue and normal human cartilage into SCID mice. *Arthritis Rheum* 37: 1664-71
189. Sack U, Kuhn H, Kämpfer I, Genest M, Arnold S, Pfeiffer Gn, Emmrich F. 1996. Orthotopic Implantation of Inflamed Synovial Tissue from RA Patients Induces a Characteristic Arthritis in Immunodeficient (SCID) Mice. *Journal of Autoimmunity* 9: 51-8
190. Lefevre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, Korb A, Schnaker E-M, Tarner IH, Robbins PD, Evans CH, Sturz H, Steinmeyer J, Gay S, Scholmerich J, Pap T, Muller-Ladner U, Neumann E. 2009. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med* 15: 1414-20
191. Bucala R, Ritchlin C, Winchester R, Cerami A. 1991. Constitutive Production of Inflammatory and Mitogenic Cytokines by Rheumatoid Synovial Fibroblasts. *Journal of Experimental Medicine* 173: 569-74
192. Baumann H, Kushner I. 1998. Production of interleukin-6 by synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 152: 641-4
193. Hirth A, Skapenko A, Kinne R, Emmrich F, Schulze-Koops H, Sack U. 2002. Cytokine mRNA and protein expression in primary-culture and repeated-passage synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 4: 117 - 25
194. Firestein GS, Alvaro-Gracia JM, Maki R. 1990. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 144: 3347-53
195. Gracie JA, Forsey RJ, Chan WL, Gilmour A, Leung BP, Greer MR, Kennedy K, Carter R, Wei X-Q, Xu D, Field M, Foulis A, Liew FY, McInnes IB. 1999. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *The Journal of Clinical Investigation* 104: 1393-401
196. Harada S, Yamamura M, Okamoto H, Morita Y, Kawashima M, Aita T, Makino H. 1999. Production of interleukin-7 and interleukin-15 by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 42: 1508-16
197. Zimmermann T, Kunisch E, Pfeiffer R, Hirth A, Stahl H-D, Sack U, Laube A, Liesaus E, Roth A, Palombo-Kinne E, Emmrich F, Kinne RW. 2001. Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture -- primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells. *Arthritis Res* 3: 72 - 6
198. Tran CN, Davis MJ, Tesmer LA, Endres JL, Motyl CD, Smuda C, Somers EC, Chung KC, Urquhart AG, Lundy SK, Kovats S, Fox DA. 2007. Presentation of arthritogenic peptide to antigen-specific T cells by fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis & Rheumatism* 56: 1497-506

199. Baeten D, Van den Bosch F, Elewaut D, Stuer A, Veys EM, De Keyser F. 1999. Needle Arthroscopy of the Knee with Synovial Biopsy Sampling: Technical Experience in 150 Patients. *Clinical Rheumatology* 18: 434-41
200. Vordenbaumen S, Joosten LA, Friemann J, Schneider M, Ostendorf B. 2009. Utility of synovial biopsy. *Arthritis Res Ther* 11: 256
201. Old LJ. 1985. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 230: 630-2
202. Tang P HM-C, Klostergaard J. 1996 Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry*. 35: 8216-25
203. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-[alpha] from cells. *Nature* 385: 729-33
204. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S-i, Tsukamoto H, Shimoda T. 2010. Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* 49: 1215-28
205. Alexopoulou L, Pasparakis M, Kollias G. 1997. A murine transmembrane tumor necrosis factor (TNF) transgene induces arthritis by cooperative p55/p75 TNF receptor signaling. *European Journal of Immunology* 27: 2588-92
206. Müller S, Rihs S, Dayer Schneider JM, Paredes BE, Seibold I, Brunner T, Mueller C. 2009. Soluble TNF- α but not transmembrane TNF- α sensitizes T cells for enhanced activation-induced cell death. *European Journal of Immunology* 39: 3171-80
207. Fuchs P, Strehl S, Dworzak M, Himmler A, Ambros PF. 1992. Structure of the human TNF receptor 1 (p60) gene (TNFR1) and localization to chromosome 12p13 [corrected]. *Genomics* 13: 219-24
208. Beltinger CP, White PS, Maris JM, Sulman EP, Jensen SJ, LePaslier D, Stallard BJ, Goeddel DV, de Sauvage FJ, Brodeur GM. 1996. Physical Mapping and Genomic Structure of the HumanTNFR2Gene. *Genomics* 35: 94-100
209. Hussein YM, Mohamed RH, Pasha HF, El-Shahawy EE, Alzahrani SS. Association of tumor necrosis factor alpha and its receptor polymorphisms with rheumatoid arthritis in female patients. *Cellular Immunology* In Press, Corrected Proof
210. Lainez B, Fernandez-Real JM, Romero X, Esplugues E, Canete JD, Ricart W, Engel P. 2004. Identification and characterization of a novel spliced variant that encodes human soluble tumor necrosis factor receptor 2. *Int. Immunol.* 16: 169-77
211. Bradley JR. 2008. TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology* 214: 149-60
212. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10: 45-65
213. Yocum DE, Esparza L, Dubry S, Benjamin JB, Volz R, Scuderi P. 1989. Characteristics of tumor necrosis factor production in rheumatoid arthritis. *Cell Immunol* 122: 131-45
214. Chu CQ, Field M, Feldmann M, Maini RN. 1991. Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 34: 1125-32
215. Steiner G, Tohidast-Akrad M, Witzmann G, Vesely M, Studnicka-Benke A, Gal A, Kunaver M, Zenz P, Smolen J. 1999. Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 38: 202-13
216. Saxne T, Palladino MA, Jr., Heinegard D, Talal N, Wollheim FA. 1988. Detection of tumor necrosis factor alpha but not tumor necrosis factor beta in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. *Arthritis Rheum* 31: 1041-5

217. Tetta C, Camussi G, Modena V, Di Vittorio C, Baglioni C. 1990. Tumour necrosis factor in serum and synovial fluid of patients with active and severe rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 49: 665-7
218. Firestein G, Alvaro-Gracia J, Maki R, JM\$ A-G. 1990. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis [published erratum appears in J Immunol 1990 Aug 1;145(3):1037]. *The Journal of Immunology* 144: 3347-53
219. Di Giovine FS, Nuki G, Duff GW. 1988. Tumour necrosis factor in synovial exudates. *Ann Rheum Dis* 47: 768-72
220. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslari E, Kioussis D, Kollias G. 1991. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 10: 4025-31
221. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. 1996. Role of cytokines in Rheumatoid Arthritis. *Annual Review of Immunology* 14: 397-440
222. Brennan FM, McInnes IB. 2008. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *The Journal of Clinical Investigation* 118: 3537-45
223. Marrelli A, Cipriani P, Liakouli V, Carubbi F, Perricone C, Perricone R, Giacomelli R. 2011. Angiogenesis in rheumatoid arthritis: A disease specific process or a common response to chronic inflammation? *Autoimmunity Reviews* 10: 595-8
224. Gao B, Calhoun K, Fang D. 2006. The proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α induce the expression of Synoviolin, an E3 ubiquitin ligase, in mouse synovial fibroblasts via the Erk1/2-ETS1 pathway. *Arthritis Research & Therapy* 8: R172
225. Dayer JM, Beutler B, Cerami A. 1985. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 162: 2163-8
226. Piguet PF, Grau GE, Vesin C, Loetscher H, Gentz R, Lesslauer W. 1992. Evolution of collagen arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumour necrosis factor (TNF) antibody or a recombinant soluble TNF receptor. *Immunology* 77: 510-4
227. Williams RO, Plater-Zyberk C, Williams DG, Maini RN. 1992. Successful transfer of collagen-induced arthritis to severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Clin Exp Immunol* 88: 455-60
228. Feldmann M, Maini RN. 2003. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Med* 9: 1245-50
229. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis P, Brennan FM, Walker J, Bijl H, Ghayeb J, et al. 1993. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor α . *Arthritis Rheum* 36: 1681-90
230. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Kalden JR, Antoni C, Smolen JS, Leeb B, Breedveld FC, Macfarlane JD, Bijl H, et al. 1994. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor α (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* 344: 1105-10
231. Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, Moreland LW, Weisman MH, Birbara CA, Teoh LA, Fischkoff SA, Chartash EK. 2003. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor α monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: The ARMADA trial. *Arthritis & Rheumatism* 48: 35-45
232. Mease PJ. 2011. Certolizumab pegol in the treatment of rheumatoid arthritis: a comprehensive review of its clinical efficacy and safety. *Rheumatology* 50: 261-70
233. Boyce EG, Halilovic J, Stan-Ugbene O. 2010. Golimumab: Review of the efficacy and tolerability of a recently approved tumor necrosis factor-[α] inhibitor. *Clinical Therapeutics* 32: 1681-703

234. Garrison L, McDonnell ND. 1999. Etanercept: therapeutic use in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 58 Suppl 1: I65-9
235. Smolen JS, Emery P. 2011. Infliximab: 12 years of experience. *Arthritis Res Ther* 13 Suppl 1: S2
236. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S-i, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, Tsunasawa S, Sakiyama F, Matsui H, Takahara Y, Taniguchi T, Kishimoto T. 1986. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324: 73-6
237. Assier E, Boissier M-C, Dayer J-M. 2010. Interleukin-6: From identification of the cytokine to development of targeted treatments. *Joint Bone Spine* 77: 532-6
238. Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, Taniguchi T, Hirano T, Kishimoto T. 1988. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science* 241: 825-8
239. Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. 1990. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 63: 1149-57
240. Wong PK, Campbell IK, Egan PJ, Ernst M, Wicks IP. 2003. The role of the interleukin-6 family of cytokines in inflammatory arthritis and bone turnover. *Arthritis Rheum* 48: 1177-89
241. Rose-John S, Scheller Jr, Elson G, Jones SA. 2006. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *Journal of Leukocyte Biology* 80: 227-36
242. Jones SA, Horiuchi S, Topley N, Yamamoto N, Fuller GM. 2001. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *The FASEB Journal* 15: 43-58
243. McLoughlin RM, Jenkins BJ, Grail D, Williams AS, Fielding CA, Parker CR, Ernst M, Topley N, Jones SA. 2005. IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell infiltration in acute inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9589-94
244. Hirano T. 2010. Interleukin 6 in autoimmune and inflammatory diseases: a personal memoir. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86: 717-30
245. Fantuzzi G. 2005. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 115: 911-9; quiz 20
246. Houssiau FA, Devogelaer JP, Van Damme J, de Deuxchaisnes CN, Van Snick J. 1988. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum* 31: 784-8
247. Guerne PA, Zuraw BL, Vaughan JH, Carson DA, Lotz M. 1989. Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis. *J Clin Invest* 83: 585-92
248. Madhok R, Crilly A, Watson J, Capell HA. 1993. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. *Ann Rheum Dis* 52: 232-4
249. Dasgupta B, Corkill M, Kirkham B, Gibson T, Panayi G. 1992. Serial estimation of interleukin 6 as a measure of systemic disease in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 19: 22-5
250. Rodríguez-Rodríguez L, Lamas J, Varadé J, López-Romero P, Tornero-Esteban P, Abasolo L, de la Concha E, Jover J, Urcelay E, Fernández-Gutiérrez B. 2011. Plasma soluble IL-6 receptor concentration in rheumatoid arthritis: associations with the rs8192284 IL6R polymorphism and with disease activity. *Rheumatology International* 31: 409-413

251. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. 2003. Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 101: 2461-3
252. Dayer JM, Choy E. 2010. Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor. *Rheumatology (Oxford)* 49: 15-24
253. Hashizume M, Hayakawa N, Mihara M. 2008. IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF- α and IL-17. *Rheumatology* 47: 1635-40
254. Hashizume M, Hayakawa N, Suzuki M, Mihara M. 2009. IL-6/sIL-6R trans-signalling, but not TNF- α induced angiogenesis in a HUVEC and synovial cell co-culture system. *Rheumatology International* 29: 1449-54
255. Kotake S, Sato K, Kim KJ, Takahashi N, Udagawa N, Nakamura I, Yamaguchi A, Kishimoto T, Suda T, Kashiwazaki S. 1996. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *Journal of Bone and Mineral Research* 11: 88-95
256. Wong PKK, Quinn JMW, Sims NA, van Nieuwenhuijze A, Campbell IK, Wicks IP. 2006. Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis & Rheumatism* 54: 158-68
257. Wendling J. 1993. [Normobaric oxygenation as a first-aid measure in decompression sickness]. *Schweiz Z Sportmed* 41: 167-72
258. Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Hashimoto J, Azuma J, Kishimoto T. 2004. Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: A multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis & Rheumatism* 50: 1761-9
259. Venkiteshwaran A. 2009. Tocilizumab. *MAbs* 1: 432-8
260. 1991. Nomenclature for secreted regulatory proteins of the immune system (interleukins). WHO-IUIS Nomenclature Subcommittee on Interleukin Designation. *Bull World Health Organ* 69: 483-6
261. Dinarello CA. 2011. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 117: 3720-32
262. Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolff SM, Dinarello CA. 1984. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 7907-11
263. Kay J, Calabrese L. 2004. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 43 Suppl 3: iii2-iii9
264. Dinarello CA. 1987. The biology of interleukin 1 and comparison to tumor necrosis factor. *Immunol Lett* 16: 227-31
265. Dinarello CA. 1988. Biology of interleukin 1. *FASEB J* 2: 108-15
266. Martinon F, Burns K, Tschopp Jr. 2002. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- β . *Molecular Cell* 10: 417-26
267. Liao Z, Haimovitz A, Chen Y, Chan J, Rosenstreich D. 1985. Characterization of a human interleukin 1 inhibitor. *The Journal of Immunology* 134: 3882-6
268. Arend WP, Guthridge CJ. 2000. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. *Annals of the Rheumatic Diseases* 59: i60-i4
269. Cullinan EB, Kwee L, Nunes P, Shuster DJ, Ju G, McIntyre KW, Chizzonite RA, Labow MA. 1998. IL-1 Receptor Accessory Protein Is an Essential Component of the IL-1 Receptor. *The Journal of Immunology* 161: 5614-20

270. Bessis N, Guéry L, Mantovani A, Vecchi A, Sims JE, Fradelizi D, Boissier M-C. 2000. The type II decoy receptor of IL-1 inhibits murine collagen-induced arthritis. *European Journal of Immunology* 30: 867-75
271. Lachmann HJ, Quartier P, So A, Hawkins PN. 2011. The emerging role of interleukin-1 β in autoinflammatory diseases. *Arthritis & Rheumatism* 63: 314-24
272. Dinarello CA. 2011. Blocking interleukin-1 β in acute and chronic autoinflammatory diseases. *Journal of Internal Medicine* 269: 16-28
273. Dinarello CA, Cannon JG, Mier JW, Bernheim HA, LoPreste G, Lynn DL, Love RN, Webb AC, Auron PE, Reuben RC, et al. 1986. Multiple biological activities of human recombinant interleukin 1. *J Clin Invest* 77: 1734-9
274. Eastgate JA, Symonns JA, Wood NC, Capper SJ, Duff GW. 1991. Plasma levels of interleukin-1 alpha in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 30: 295-7
275. Kahle P, Saal JG, Schaudt K, Zacher J, Fritz P, Pawelec G. 1992. Determination of cytokines in synovial fluids: correlation with diagnosis and histomorphological characteristics of synovial tissue. *Ann Rheum Dis* 51: 731-4
276. Firestein GS, Boyle DL, Yu C, Paine MM, Whisenand TD, Zvaifler NJ, Arend WP. 1994. Synovial interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 balance in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 37: 644-52
277. Fujikawa Y, Shingu M, Torisu T, Masumi S. 1995. Interleukin-1 receptor antagonist production in cultured synovial cells from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 54: 318-20
278. Lacey D, Sampey A, Mitchell R, Bucala R, Santos L, Leech M, Morand E. 2003. Control of fibroblast-like synoviocyte proliferation by macrophage migration inhibitory factor. *Arthritis & Rheumatism* 48: 103-9
279. Dayer JM, de Rochemonteix B, Burrus B, Demczuk S, Dinarello CA. 1986. Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. *The Journal of Clinical Investigation* 77: 645-8
280. van de Loo AA, van den Berg WB. 1990. Effects of murine recombinant interleukin 1 on synovial joints in mice: measurement of patellar cartilage metabolism and joint inflammation. *Ann Rheum Dis* 49: 238-45
281. D OG, Ireland D, Bord S, Compston JE. 2004. Joint erosion in rheumatoid arthritis: interactions between tumour necrosis factor alpha, interleukin 1, and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclasts. *Ann Rheum Dis* 63: 354-9
282. Ghivizzani S, Kang R, Georgescu H, Lechman E, Jaffurs D, Engle J, Watkins S, Tindal M, Suchanek M, McKenzie L, Evans C, Robbins P. 1997. Constitutive intra-articular expression of human IL-1 beta following gene transfer to rabbit synovium produces all major pathologies of human rheumatoid arthritis. *The Journal of Immunology* 159: 3604-12
283. van den Berg WB, Joosten LA, van de Loo FA. 1999. TNF alpha and IL-1 beta are separate targets in chronic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 17: S105-14
284. Horai R, Saijo S, Tanioka H, Nakae S, Sudo K, Okahara A, Ikuse T, Asano M, Iwakura Y. 2000. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med* 191: 313-20
285. Koenders MI, Devesa I, Marijnissen RJ, Abdollahi-Roodsaz S, Boots AMH, Walgreen B, di Padova FE, Nicklin MJH, Joosten LAB, van den Berg WB. 2008. Interleukin-1 drives pathogenic Th17 cells during spontaneous arthritis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Arthritis & Rheumatism* 58: 3461-70

286. Drevlow BE, Lovis R, Haag MA, Sinacore JM, Jacobs C, Blösche C, Landay A, Moreland LW, Pope RM. 1996. Recombinant human interleukin-1 receptor type I in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39: 257-65
287. Bresnihan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M, Doherty M, Domljan Z, Emery P, Nuki G, Pavelka K, Rau R, Rozman B, Watt I, Williams B, Aitchison R, McCabe D, Musikic P. 1998. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis & Rheumatism* 41: 2196-204
288. Jiang Y, Genant HK, Watt I, Cobby M, Bresnihan B, Aitchison R, McCabe D. 2000. A multicenter, double-blind, dose-ranging, randomized, placebo-controlled study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis: Radiologic progression and correlation of genant and larsen scores. *Arthritis & Rheumatism* 43: 1001-9
289. Cohen SB, Moreland LW, Cush JJ, Greenwald MW, Block S, Shergy WJ, Hanrahan PS, Kraishi MM, Patel A, Sun G, Bear MB. 2004. A multicentre, double blind, randomised, placebo controlled trial of anakinra (Kineret), a recombinant interleukin 1 receptor antagonist, in patients with rheumatoid arthritis treated with background methotrexate. *Ann Rheum Dis* 63: 1062-8
290. Nixon R, Bansback N, Brennan A. 2007. The efficacy of inhibiting tumour necrosis factor α and interleukin 1 in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis and adjusted indirect comparisons. *Rheumatology* 46: 1140-7
291. Genovese MC, Cohen S, Moreland L, Lium D, Robbins S, Newmark R, Bekker P. 2004. Combination therapy with etanercept and anakinra in the treatment of patients with rheumatoid arthritis who have been treated unsuccessfully with methotrexate. *Arthritis & Rheumatism* 50: 1412-9
292. Geyer M, Muller-Ladner U. 2010. Actual status of antiinterleukin-1 therapies in rheumatic diseases. *Current Opinion in Rheumatology* 22: 246-51
10.1097/BOR.0b013e3283373fa0
293. Alten R, Gomez-Reino J, Durez P, Beaulieu A, Sebba A, Krammer G, Preiss R, Arulmani U, Widmer A, Gitton X, Kellner H. 2011. Efficacy and safety of the human anti-IL-1 β monoclonal antibody canakinumab in rheumatoid arthritis: results of a 12-week, phase II, dose-finding study. *BMC Musculoskeletal Disorders* 12: 153
294. Cardiel M, Tak P, Bensen W, Burch F, Forejtova S, Badurski J, Kakkar T, Bevirt T, Ni L, McCroskery E, Jahreis A, Zack D. 2010. A phase 2 randomized, double-blind study of AMG 108, a fully human monoclonal antibody to IL-1R, in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 12: R192
295. Rouvier E, Luciani M, Mattei M, Denizot F, Golstein P. 1993. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol* 150: 5445-56
296. Yao Z, Painter S, Fanslow W, Ulrich D, Macduff B, Spriggs M, Armitage R. 1995. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol* 155: 5483 - 6
297. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin J-J, Garrone P, Garcia E, Saeland S. 1996. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 183: 2593 - 603
298. Moseley T, Haudenschild D, Rose L, Reddi A. 2003. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14: 155 - 74
299. Gaffen SL. 2009. The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 11: 365-70
300. Hot A, Miossec P. 2011. Effects of interleukin (IL)-17A and IL-17F in human rheumatoid arthritis synoviocytes. *Annals of the Rheumatic Diseases* 70: 727-32

301. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. 2011. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* 34: 149-62
302. Haudenschild D, Moseley T, Rose L, Reddi AH. 2002. Soluble and transmembrane isoforms of novel interleukin-17 receptor-like protein by RNA splicing and expression in prostate cancer. *J Biol Chem* 277: 4309-16
303. Schwandner R, Yamaguchi K, Cao Z. 2000. Requirement of Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor (Traf)6 in Interleukin 17 Signal Transduction. *The Journal of Experimental Medicine* 191: 1233-40
304. Chang SH, Park H, Dong C. 2006. Act1 adaptor protein is an immediate and essential signaling component of interleukin-17 receptor. *J Biol Chem* 281: 35603-7
305. Chabaud M, Durand J, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, Miossec P. 1999. Human interleukin-17: a T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 42: 963 - 70
306. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. 1999. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 103: 1345-52
307. Zrioual S, Ecochard R, Tournadre A, Lenief V, Cazalis M-AI, Miossec P. 2009. Genome-Wide Comparison between IL-17A- and IL-17F-Induced Effects in Human Rheumatoid Arthritis Synoviocytes. *The Journal of Immunology* 182: 3112-20
308. Chen D-Y, Chen Y-M, Chen H-H, Hsieh C-W, Lin C-C, Lan J-L. 2011. Increasing levels of circulating Th17 cells and interleukin-17 in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to anti-TNF-alpha therapy. *Arthritis Research & Therapy* 13: R126
309. Kirkham BW, Lassere MN, Edmonds JP, Juhasz KM, Bird PA, Lee CS, Shnier R, Portek IJ. 2006. Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). *Arthritis Rheum* 54: 1122-31
310. Kehlen A, Thiele K, Riemann D, Langner J. 2002. Expression, modulation and signalling of IL-17 receptor in fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Clinical & Experimental Immunology* 127: 539-46
311. Chabaud M, Miossec P. 2001. The combination of tumor necrosis factor α blockade with interleukin-1 and interleukin-17 blockade is more effective for controlling synovial inflammation and bone resorption in an ex vivo model. *Arthritis & Rheumatism* 44: 1293-303
312. Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. 2003. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 171: 6173 - 7
313. Bush K, Farmer K, Walker J, Kirkham B. 2002. Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein. *Arthritis Rheum* 46: 802 - 5
314. Lubberts E, Koenders M, Oppers-Walgreen B, Van den Bersselaar L, Coenen-de Roo C, Joosten L, Van den Berg W. 2004. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum* 50: 650 - 9
315. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP. 1998. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol* 160: 3513-21
316. Kawashiri SY, Kawakami A, Iwamoto N, Fujikawa K, Aramaki T, Tamai M, Arima K, Kamachi M, Yamasaki S, Nakamura H, Tsurumoto T, Kono M, Shindo H, Ida H,

- Origuchi T, Eguchi K. 2009. Proinflammatory cytokines synergistically enhance the production of chemokine ligand 20 (CCL20) from rheumatoid fibroblast-like synovial cells in vitro and serum CCL20 is reduced in vivo by biologic disease-modifying antirheumatic drugs. *J Rheumatol* 36: 2397-402
317. Toh ML, Gonzales G, Koenders MI, Tournadre A, Boyle D, Lubberts E, Zhou Y, Firestein GS, van den Berg WB, Miossec P. 2010. Role of interleukin 17 in arthritis chronicity through survival of synoviocytes via regulation of synoviolin expression. *PLoS One* 5: e13416
 318. Zhang Q, Wu J, Cao Q, Xiao L, Wang L, He D, Ouyang G, Lin J, Shen B, Shi Y, Zhang Y, Li D, Li N. 2009. A critical role of Cyr61 in interleukin-17-dependent proliferation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 60: 3602-12
 319. Lubberts E, Koenders M, van den Berg W. 2005. The role of T cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther* 7: 29 - 37
 320. Hueber W, Patel DD, Dryja T, Wright AM, Koroleva I, Bruin G, Antoni C, Draelos Z, Gold MH, Durez P, Tak PP, Gomez-Reino JJ, Foster CS, Kim RY, Samson CM, Falk NS, Chu DS, Callanan D, Nguyen QD, Rose K, Haider A, Di Padova F. 2010. Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. *Sci Transl Med* 2: 52ra72
 321. Genovese MC, Van den Bosch F, Roberson SA, Bojin S, Biagini IM, Ryan P, Sloan-Lancaster J. 2010. LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: A phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. *Arthritis & Rheumatism* 62: 929-39
 322. Felson DT, Anderson JJ, Boers M, Bombardier C, Chernoff M, Fried B, Furst D, Goldsmith C, Kieszak S, Lightfoot R, et al. 1993. The American College of Rheumatology preliminary core set of disease activity measures for rheumatoid arthritis clinical trials. The Committee on Outcome Measures in Rheumatoid Arthritis Clinical Trials. *Arthritis Rheum* 36: 729-40
 323. Felson DT, Anderson JJ, Boers M, Bombardier C, Furst D, Goldsmith C, Katz LM, Lightfoot R, Jr., Paulus H, Strand V, et al. 1995. American College of Rheumatology. Preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38: 727-35
 324. van Gestel AM, Prevoo ML, van 't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB, van Riel PL. 1996. Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League Against Rheumatism Criteria. *Arthritis Rheum* 39: 34-40
 325. Aletaha D, Landewe R, Karonitsch T, Bathon J, Boers M, Bombardier C, Bombardieri S, Choi H, Combe B, Dougados M, Emery P, Gomez-Reino J, Keystone E, Koch G, Kvien TK, Martin-Mola E, Matucci-Cerinic M, Michaud K, O'Dell J, Paulus H, Pincus T, Richards P, Simon L, Siegel J, Smolen JS, Sokka T, Strand V, Tugwell P, van der Heijde D, van Riel P, Vlad S, van Vollenhoven R, Ward M, Weinblatt M, Wells G, White B, Wolfe F, Zhang B, Zink A, Felson D. 2008. Reporting disease activity in clinical trials of patients with rheumatoid arthritis: EULAR/ACR collaborative recommendations. *Arthritis Care & Research* 59: 1371-7
 326. Ramey DR, Raynauld JP, Fries JF. 1992. The health assessment questionnaire 1992: status and review. *Arthritis Care Res* 5: 119-29

327. Ruta D, Garratt A, Abdalla M, Buckingham K, Russell I. 1993. The SF 36 health survey questionnaire. A valid measure of health status. *BMJ* 307: 448-9
328. Grigor C, Capell H, Stirling A, McMahon AD, Lock P, Vallance R, Kincaid W, Porter D. 2004. Effect of a treatment strategy of tight control for rheumatoid arthritis (the TICORA study): a single-blind randomised controlled trial. *The Lancet* 364: 263-9
329. van der Heijde DM, van 't Hof M, van Riel PL, van de Putte LB. 1993. Development of a disease activity score based on judgment in clinical practice by rheumatologists. *J Rheumatol* 20: 579-81
330. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. 1995. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38: 44-8
331. Makinen H, Kautiainen H, Hannonen P, Sokka T. 2005. Is DAS28 an appropriate tool to assess remission in rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis* 64: 1410-3
332. Aletaha D, Ward MM, Machold KP, Nell VP, Stamm T, Smolen JS. 2005. Remission and active disease in rheumatoid arthritis: defining criteria for disease activity states. *Arthritis Rheum* 52: 2625-36
333. Vander Cruyssen B, Van Looy S, Wyns B, Westhovens R, Durez P, Van den Bosch F, Veys EM, Mielants H, De Clerck L, Peretz A, Malaise M, Verbruggen L, Vastesaegeer N, Geldhof A, Boullart L, De Keyser F. 2005. DAS28 best reflects the physician's clinical judgment of response to infliximab therapy in rheumatoid arthritis patients: validation of the DAS28 score in patients under infliximab treatment. *Arthritis Res Ther* 7: R1063-71
334. Ranganath VK, Khanna D, Paulus HE. 2006. ACR remission criteria and response criteria. *Clin Exp Rheumatol* 24: S-14-21
335. Pinals RS, Masi AT, Larsen RA. 1981. Preliminary criteria for clinical remission in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 24: 1308-15
336. Saag KG, Teng GG, Patkar NM, Anuntiyo J, Finney C, Curtis JR, Paulus HE, Mudano A, Pisu M, Elkins-Melton M, Outman R, Allison JJ, Almazor MS, Bridges SL, Chatham WW, Hochberg M, Maclean C, Mikuls T, Moreland LW, O'Dell J, Turkiewicz AM, Furst DE. 2008. American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care & Research* 59: 762-84
337. Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, Dougados M, Emery P, Gaujoux-Viala C, Gorter S, Knevel R, Nam J, Schoels M, Aletaha D, Buch M, Gossec L, Huizinga T, Bijlsma JWW, Burmester G, Combe B, Cutolo M, Gabay C, Gomez-Reino J, Kouloumas M, Kvien TK, Martin-Mola E, McInnes I, Pavelka K, van Riel P, Scholte M, Scott DL, Sokka T, Valesini G, van Vollenhoven R, Winthrop KL, Wong J, Zink A, van der Heijde Dse. 2010. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Annals of the Rheumatic Diseases* 69: 964-75
338. St Clair EW. 2002. Infliximab treatment for rheumatic disease: clinical and radiological efficacy. *Ann Rheum Dis* 61 Suppl 2: ii67-9
339. Wolbink GJ, Vis M, Lems W, Voskuyl AE, De Groot E, Nurmohamed MT, Stapel S, Tak PP, Aarden L, Dijkmans B. 2006. Development of antiinfliximab antibodies and relationship to clinical response in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 54: 711-5
340. van Vollenhoven R, Brannemark S, Klareskog L. 2004. Dose escalation of infliximab in clinical practice: improvements seen may be explained by a regression-like effect. *Ann Rheum Dis* 63: 426 - 30

341. Radstake TRDJ, Svenson M, Eijsbouts AM, van den Hoogen FHJ, Enevold C, van Riel PLCM, Bendtzen K. 2009. Formation of antibodies against infliximab and adalimumab strongly correlates with functional drug levels and clinical responses in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 68: 1739-45
342. Bartelds GM, Wolbink GJ, Stapel S, Aarden L, Lems WF, Dijkmans BAC, Nurmohamed MT. 2006. High levels of human anti-human antibodies to adalimumab in a patient not responding to adalimumab treatment. *Annals of the Rheumatic Diseases* 65: 1249-50
343. Bartelds GM, Krieckaert CLM, Nurmohamed MT, van Schouwenburg PA, Lems WF, Twisk JWR, Dijkmans BAC, Aarden L, Wolbink GJ. 2011. Development of Antidrug Antibodies Against Adalimumab and Association With Disease Activity and Treatment Failure During Long-term Follow-up. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 305: 1460-8
344. Jamnitski A, Bartelds GM, Nurmohamed MT, van Schouwenburg PA, van Schaardenburg D, Stapel SO, Dijkmans BA, Aarden L, Wolbink GJ. 2011. The presence or absence of antibodies to infliximab or adalimumab determines the outcome of switching to etanercept. *Ann Rheum Dis* 70: 284-8
345. Toukap AN, Galant C, Theate I, Maudoux AL, Lories RJU, Houssiau FA, Lauwerys BR. 2007. Identification of distinct gene expression profiles in the synovium of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 56: 1579-88
346. Hyrich KL, Watson KD, Silman AJ, Symmons DPM, Register TBB. 2006. Predictors of response to anti-TNF- α therapy among patients with rheumatoid arthritis: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Rheumatology* 45: 1558-65
347. Kristensen LE, Kapetanovic MC, Gulfe A, Soderlin M, Saxne T, Geborek P. 2008. Predictors of response to anti-TNF therapy according to ACR and EULAR criteria in patients with established RA: results from the South Swedish Arthritis Treatment Group Register. *Rheumatology* 47: 495-9
348. Abhishek A, Butt S, Gadsby K, Zhang W, Deighton CM. 2010. Anti-TNF-[alpha] Agents Are Less Effective for the Treatment of Rheumatoid Arthritis in Current Smokers. *JCR: Journal of Clinical Rheumatology* 16: 15-8
0.1097/RHU.0b013e3181ca4a2a
349. Buch MH, Seto Y, Bingham SJ, Bejarano V, Bryer D, White J, Emery P. 2005. C-reactive protein as a predictor of infliximab treatment outcome in patients with rheumatoid arthritis: Defining subtypes of nonresponse and subsequent response to etanercept. *Arthritis & Rheumatism* 52: 42-8
350. Wolbink GJ, Voskuyl AE, Lems WF, de Groot E, Nurmohamed MT, Tak PP, Dijkmans BAC, Aarden L. 2005. Relationship between serum trough infliximab levels, pretreatment C reactive protein levels, and clinical response to infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 64: 704-7
351. Mancarella L, Bobbio-Pallavicini F, Ceccarelli F, Falappone PC, Ferrante A, Malesci D, Massara A, Nacci F, Secchi ME, Manganelli S, Salaffi F, Bambara ML, Bombardieri S, Cutolo M, Ferri C, Galeazzi M, Gerli R, Giacomelli R, Grassi W, Lapadula G, Cerinic MM, Montecucco C, Trotta F, Triolo G, Valentini G, Valesini G, Ferraccioli GF, group G. 2007. Good clinical response, remission, and predictors of remission in rheumatoid arthritis patients treated with tumor necrosis factor-alpha blockers: the GISEA study. *The Journal of Rheumatology* 34: 1670-3
352. Bobbio-Pallavicini F, Caporali R, Alpini C, Moratti R, Montecucco C. 2007. Predictive Value of Antibodies to Citrullinated Peptides and Rheumatoid Factors in

- Anti-TNF- α Treated Patients. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1109: 287-95
353. Braun-Moscovici Y, Markovits D, Zinder O, Schapira D, Rozin A, Ehrenburg M, Dain L, Hoffer E, Nahir AM, Balbir-Gurman A. 2006. Anti-cyclic citrullinated protein antibodies as a predictor of response to anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology* 33: 497-500
 354. Cuchacovich M, Catalan D, Wainstein E, Gatica H, Soto L, Aravena O, Pesce B, Sabugo F, Aguillon JC. 2008. Basal anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibody levels and a decrease in anti-CCP titres are associated with clinical response to adalimumab in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 26: 1067-73
 355. Potter C, Hyrich KL, Tracey A, Lunt M, Plant D, Symmons DPM, Thomson W, Worthington J, Emery P, Morgan AW, Wilson AG, Isaacs J, Barton A, BRAGGSS. 2009. Association of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide positivity, but not carriage of shared epitope or PTPN22 susceptibility variants, with anti-tumour necrosis factor response in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 68: 69-74
 356. Lequerré T, Jouen F, Brazier M, Clayssens S, Klemmer N, Ménard J-F, Mejjad O, Daragon A, Tron F, Le Loet X, Vittecoq O. 2007. Autoantibodies, metalloproteinases and bone markers in rheumatoid arthritis patients are unable to predict their responses to infliximab. *Rheumatology* 46: 446-53
 357. Gonzalez-Alvaro I, Ortiz AM, Tomero EG, Balsa A, Orte J, Laffon A, Garcia-Vicuna R. 2007. Baseline serum RANKL levels may serve to predict remission in rheumatoid arthritis patients treated with TNF antagonists. *Annals of the Rheumatic Diseases* 66: 1675-8
 358. Marotte H, Maslinski W, Miossec P. 2005. Circulating tumour necrosis factor-alpha bioactivity in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab: link to clinical response. *Arthritis Res Ther* 7: R149 - R55
 359. Morozzi G, Fabbroni M, Bellisai F, Pucci G, Galeazzi M. 2007. Cartilage Oligomeric Matrix Protein Level in Rheumatic Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1108: 398-407
 360. Chopin F, Garnerio P, le Henanff A, Debiais F, Daragon A, Roux C, Sany J, Wendling D, Zarnitsky C, Ravaud P, Thomas T. 2008. Long-term effects of infliximab on bone and cartilage turnover markers in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 67: 353-7
 361. Marotte H, Gineyts E, Miossec P, Delmas PD. 2009. Effects of infliximab therapy on biological markers of synovium activity and cartilage breakdown in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 68: 1197-200
 362. Marotte H, Arnaud B, Diasparra J, Zrioual S, Miossec P. 2008. Association between the level of circulating bioactive tumor necrosis factor α and the tumor necrosis factor α gene polymorphism at -308 in patients with rheumatoid arthritis treated with a tumor necrosis factor α inhibitor. *Arthritis & Rheumatism* 58: 1258-63
 363. Visser K, Goekoop-Ruiterman YPM, de Vries-Bouwstra JK, Roday HK, Seys PEH, Kerstens PJSM, Huizinga TWJ, Dijkmans BAC, Allaart CF. 2010. A matrix risk model for the prediction of rapid radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis receiving different dynamic treatment strategies: post hoc analyses from the BeSt study. *Annals of the Rheumatic Diseases* 69: 1333-7
 364. Vastesaeger N, Xu S, Aletaha D, St Clair EW, Smolen JS. 2009. A pilot risk model for the prediction of rapid radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 48: 1114-21

365. Cuchacovich M, Soto L, Edwardes M, Gutierrez M, Llanos C, Pacheco D, Sabugo F, Alamo M, Fuentealba C, Villanueva L, Gatica H, Schiattino I, Salazar L, Catalan D, Valenzuela O, Salazar-Onfray F, Aguillon JC. 2006. Tumour necrosis factor (TNF)alpha -308 G/G promoter polymorphism and TNFalpha levels correlate with a better response to adalimumab in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 35: 435-40
366. Seitz M, Wirthmüller U, Møller B, Villiger PM. 2007. The -308 tumour necrosis factor-gene polymorphism predicts therapeutic response to TNF α -blockers in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis patients. *Rheumatology* 46: 93-6
367. Pavy S, Toonen EJM, Miceli-Richard C, Barrera P, van Riel PLCM, Criswell LA, Mariette X, Coenen MJH. 2010. Tumour necrosis factor -308G-A polymorphism is not associated with response to TNF α blockers in Caucasian patients with rheumatoid arthritis: systematic review and meta-analysis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 69: 1022-8
368. Canete JD, Suarez B, Hernandez MV, R S, Rego I, Celis R, Moll C, Pinto JA, Blanco FJ, Lozano F. 2009. Influence of variants of FcGamma receptors IIA and IIIA on the American College of Rheumatology and European League Against Rheumatism responses to anti-tumour necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 68: 1547-52
369. Cui J, Saevarsdottir S, Thomson B, Padyukov L, van der Helm-Van Mil AHM, Nititham J, Hughes LB, de Vries N, Raychaudhuri S, Alfredsson L, Askling J, Wedrén S, Ding B, Guiducci C, Wolbink GJ, Crusius JBA, van der Horst-Bruinsma IE, Herenius M, Weinblatt ME, Shadick NA, Worthington J, Batliwalla F, Kern M, Morgan AW, Wilson AG, Isaacs JD, Hyrich K, Seldin MF, Moreland LW, Behrens TW, Allaart CF, Criswell LA, Huizinga TWJ, Tak PP, Bridges SL, Toes REM, Barton A, Klareskog L, Gregersen PK, Karlson EW, Plenge RM. 2010. Rheumatoid arthritis risk allele PTPRC is also associated with response to anti-tumor necrosis factor α therapy. *Arthritis & Rheumatism* 62: 1849-61
370. Criswell LA, Lum RF, Turner KN, Woehl B, Zhu Y, Wang J, Tiwari HK, Edberg JC, Kimberly RP, Moreland LW, Seldin MF, Bridges SL. 2004. The influence of genetic variation in the HLA-DRB1 and LTA-TNF regions on the response to treatment of early rheumatoid arthritis with methotrexate or etanercept. *Arthritis & Rheumatism* 50: 2750-6
371. Plant D, Bowes J, Potter C, Hyrich KL, Morgan AW, Wilson AG, Isaacs JD, Wellcome Trust Case Control C, British Society for Rheumatology Biologics R, Barton A. 2011. Genome-wide association study of genetic predictors of anti-tumor necrosis factor treatment efficacy in rheumatoid arthritis identifies associations with polymorphisms at seven loci. *Arthritis & Rheumatism* 63: 645-53
372. Plenge RM, Louis Bridges S, Huizinga TWJ, Criswell LA, Gregersen PK. 2011. Recommendations for publication of genetic association studies in arthritis & rheumatism. *Arthritis & Rheumatism* 63: 2839-47
373. Drynda S, Ringel B, Kekow M, Kuhne C, Drynda A, Glocker MO, Thiesen HJ, Kekow J. 2004. Proteome analysis reveals disease-associated marker proteins to differentiate RA patients from other inflammatory joint diseases with the potential to monitor anti-TNFalpha therapy. *Pathol Res Pract* 200: 165-71
374. Fabre S, Dupuy AM, Dossat N, Guisset C, Cohen JD, Cristol JP, Daures JP, Jorgensen C. 2008. Protein biochip array technology for cytokine profiling predicts etanercept responsiveness in rheumatoid arthritis. *Clinical & Experimental Immunology* 153: 188-95

375. Trocmé C, Marotte H, Baillet A, Pallot-Prades B, Garin J, Grange L, Miossec P, Tebib J, Berger F, Nissen MJ, Juvin R, Morel F, Gaudin P. 2009. Apolipoprotein A-I and platelet factor 4 are biomarkers for infliximab response in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 68: 1328-33
376. Hueber W, Tomooka B, Batliwalla F, Li W, Monach P, Tibshirani R, Van Vollenhoven R, Lampa J, Saito K, Tanaka Y, Genovese M, Klareskog L, Gregersen P, Robinson W. 2009. Blood autoantibody and cytokine profiles predict response to anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 11: R76
377. Lequerre T, Gauthier-Jauneau AC, Bansard C, Derambure C, Hiron M, Vittecoq O, Daveau M, Mejjad O, Daragon A, Tron F, Le Loet X, Salier JP. 2006. Gene profiling in white blood cells predicts infliximab responsiveness in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 8: R105
378. Koczan D, Drynda S, Hecker M, Drynda A, Guthke R, Kekow J, Thiesen H-J. 2008. Molecular discrimination of responders and nonresponders to anti-TNF α therapy in rheumatoid arthritis by etanercept. *Arthritis Research & Therapy* 10: R50
379. Sekiguchi N, Kawauchi S, Furuya T, Inaba N, Matsuda K, Ando S, Ogasawara M, Aburatani H, Kameda H, Amano K, Abe T, Ito S, Takeuchi T. 2008. Messenger ribonucleic acid expression profile in peripheral blood cells from RA patients following treatment with an anti-TNF- α monoclonal antibody, infliximab. *Rheumatology* 47: 780-8
380. Parker A, Izmailova ES, Narang J, Badola S, Le T, Roubenoff R, Ginsburg GS, Maier A, Coblyn JS, Shadick NA, Weinblatt ME. 2007. Peripheral blood expression of nuclear factor-kappaB-regulated genes is associated with rheumatoid arthritis disease activity and responds differentially to anti-tumor necrosis factor-alpha versus methotrexate. *J Rheumatol* 34: 1817-22
381. Julia A, Erra A, Palacio C, Tomas C, Sans X, Barcelo P, Marsal S. 2009. An Eight-Gene Blood Expression Profile Predicts the Response to Infliximab in Rheumatoid Arthritis. *PLoS ONE* 4: e7556
382. Bresnihan B, Baeten D, Firestein GS, Fitzgerald OM, Gerlag DM, Haringman JJ, McInnes IB, Reece RJ, Smith MD, Ulfgren A-K, Veale DJ, Tak PP, Group OSI. 2005. Synovial tissue analysis in clinical trials. *The Journal of Rheumatology* 32: 2481-4
383. van de Sande MGH, Gerlag DM, Lodde BM, van Baarsen LGM, Alivernini S, Codullo V, Felea I, Vieira-Sousa E, Fearon U, Reece R, Montecucco C, Veale DJ, Pitzalis C, Emery P, Klareskog L, McInnes IB, Tak PP. 2010. Evaluating antirheumatic treatments using synovial biopsy: a recommendation for standardisation to be used in clinical trials. *Annals of the Rheumatic Diseases*
384. Haringman J, Vinkenoog M, Gerlag D, Smeets T, Zwinderman A, Tak P. 2005. Reliability of computerized image analysis for the evaluation of serial synovial biopsies in randomized controlled trials in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 7: R862 - R7
385. Ulfgren AK, Andersson U, Engstrom M, Klareskog L, Maini RN, Taylor PC. 2000. Systemic anti-tumor necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis down-regulates synovial tumor necrosis factor alpha synthesis. *Arthritis Rheum* 43: 2391-6
386. Ernestam S, af Klint E, Catrina A, Sundberg E, Engstrom M, Klareskog L, Ulfgren A-K. 2006. Synovial expression of IL-15 in rheumatoid arthritis is not influenced by blockade of tumour necrosis factor. *Arthritis Research & Therapy* 8: R18
387. Wijbrandts CA, Dijkgraaf MGW, Kraan MC, Vinkenoog M, Smeets TJ, Dinant H, Vos K, Lems WF, Wolbink GJ, Sijpkens D, Dijkmans BAC, Tak PP. 2008. The clinical response to infliximab in rheumatoid arthritis is in part dependent on

- pretreatment tumour necrosis factor α expression in the synovium. *Annals of the Rheumatic Diseases* 67: 1139-44
388. Lindberg J, Wijbrandts CA, van Baarsen LG, Nader G, Klareskog L, Catrina A, Thurlings R, Vervordeldonk M, Lundeberg J, Tak PP. 2010. The Gene Expression Profile in the Synovium as a Predictor of the Clinical Response to Infliximab Treatment in Rheumatoid Arthritis. *PLoS ONE* 5: e11310
 389. Buch MH, Reece RJ, Quinn MA, English A, Cunnane G, Henshaw K, Bingham SJ, Bejarano V, Isaacs J, Emery P. 2008. The value of synovial cytokine expression in predicting the clinical response to TNF antagonist therapy (infliximab). *Rheumatology* 47: 1469-75
 390. Barrera P, Joosten LAB, den Broeder AA, van de Putte LBA, van Riel PLCM, van den Berg WB. 2001. Effects of treatment with a fully human anti-tumour necrosis factor α monoclonal antibody on the local and systemic homeostasis of interleukin 1 and TNF α in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 60: 660-9
 391. Klaasen R, Thurlings RM, Wijbrandts CA, van Kuijk AW, Baeten D, Gerlag DM, Tak PP. 2009. The relationship between synovial lymphocyte aggregates and the clinical response to infliximab in rheumatoid arthritis: A prospective study. *Arthritis & Rheumatism* 60: 3217-24
 392. Lindberg J, af Klint E, Catrina A, Nilsson P, Klareskog L, Ulfgren A-K, Lundeberg J. 2006. Effect of infliximab on mRNA expression profiles in synovial tissue of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Research & Therapy* 8: R179
 393. van der Pouw Kraan TC, Wijbrandts CA, van Baarsen LG, Rustenburg F, Baggen JM, Verweij CL, Tak PP. 2008. Responsiveness to anti-tumour necrosis factor α therapy is related to pre-treatment tissue inflammation levels in rheumatoid arthritis patients. *Annals of the Rheumatic Diseases* 67: 563-6
 394. Kirwan JR. 2004. The synovium in rheumatoid arthritis: Evidence for (at least) two pathologies. *Arthritis & Rheumatism* 50: 1-4
 395. Suzuki Y, Inoue K, Chiba J, Inoue Y, Kanbe K. 2009. Histological analysis of synovium by treatment of etanercept for rheumatoid arthritis. *International Journal of Rheumatic Diseases* 12: 7-13
 396. Gutierrez-Roelens I, Galant C, Theate I, Lories RJ, Durez P, Nzeusseu-Toukap A, Van den Eynde B, Houssiau FA, Lauwerys BR. 2011. Rituximab treatment induces the expression of genes involved in healing processes in the rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis & Rheumatism* 63: 1507-16
 397. Namen AE, Schmierer AE, March CJ, Overell RW, Park LS, Urdal DL, Mochizuki DY. 1988. B cell precursor growth-promoting activity. Purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors. *J Exp Med* 167: 988-1002
 398. Fry TJ, Mackall CL. 2002. Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood* 99: 3892-904
 399. Jiang Q, Li WQ, Aiello FB, Mazzucchelli R, Asefa B, Khaled AR, Durum SK. 2005. Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16: 513-33
 400. Capitini CM, Chisti AA, Mackall CL. 2009. Modulating T-cell homeostasis with IL-7: preclinical and clinical studies. *Journal of Internal Medicine* 266: 141-53
 401. Ponchel F, Cuthbert RJ, GoÛb V. 2011. IL-7 and lymphopenia. *Clinica Chimica Acta* 412: 7-16
 402. Noguchi M, Nakamura Y, Russell SM, Ziegler SF, Tsang M, Cao X, Leonard WJ. 1993. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* 262: 1877-80

403. Lai SY, Molden J, Goldsmith MA. 1997. Shared gamma(c) subunit within the human interleukin-7 receptor complex. A molecular basis for the pathogenesis of X-linked severe combined immunodeficiency. *J Clin Invest* 99: 169-77
404. Giliani S, Mori L, De Saint Basile G, Le Deist F, Rodriguez-Perez C, Forino C, Mazzolari E, Dupuis S, Elhasid R, Kessel A, Galambrun C, Gil J, Fischer A, Etzioni A, Notarangelo LD. 2005. Interleukin-7 receptor α (IL-7R α) deficiency: cellular and molecular bases. Analysis of clinical, immunological, and molecular features in 16 novel patients. *Immunological Reviews* 203: 110-26
405. Palmer MJ, Mahajan VS, Trajman LC, Irvine DJ, Lauffenburger DA. 2008. Interleukin-7 Receptor Signaling Network: An Integrated Systems Perspective. *Cell Mol Immunol* 5: 79-89
406. Lynch M, Baker E, Park LS, Sutherland GR, Goodwin RG. 1992. The interleukin-7 receptor gene is at 5p13. *Hum Genet* 89: 566-8
407. Goodwin RG, Friend D, Ziegler SF, Jerzy R, Falk BA, Gimpel S, Cosman D, Dower SK, March CJ, Namen AE, Park LS. 1990. Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: Demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell* 60: 941-51
408. Pleiman CM, Gimpel SD, Park LS, Harada H, Taniguchi T, Ziegler SF. 1991. Organization of the murine and human interleukin-7 receptor genes: two mRNAs generated by differential splicing and presence of a type I-interferon-inducible promoter. *Mol Cell Biol* 11: 3052-9
409. Rose T, Lambotte O, Pallier C, Delfraissy J-Fo, Colle J-H. 2009. Identification and Biochemical Characterization of Human Plasma Soluble IL-7R: Lower Concentrations in HIV-1-Infected Patients. *The Journal of Immunology* 182: 7389-97
410. He R, Geha RS. 2010. Thymic stromal lymphopoietin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1183: 13-24
411. Liu X, Leung S, Wang C, Tan Z, Wang J, Guo TB, Fang L, Zhao Y, Wan B, Qin X, Lu L, Li R, Pan H, Song M, Liu A, Hong J, Lu H, Zhang JZ. 2010. Crucial role of interleukin-7 in T helper type 17 survival and expansion in autoimmune disease. *Nat Med* 16: 191-7
412. van Roon JAG, Glaudemans KAFM, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG. 2003. Interleukin 7 stimulates tumour necrosis factor α and Th1 cytokine production in joints of patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 62: 113-9
413. Stabler T, Piette J-C, Chevalier X, Marini-Portugal A, Kraus VB. 2004. Serum cytokine profiles in relapsing polychondritis suggest monocyte/macrophage activation. *Arthritis & Rheumatism* 50: 3663-7
414. Hitchon CA, Alex P, Erdile LB, Frank MB, Dozmorov I, Tang Y, Wong K, Centola M, El-Gabalawy HS. 2004. A distinct multicytokine profile is associated with anti-cyclical citrullinated peptide antibodies in patients with early untreated inflammatory arthritis. *The Journal of Rheumatology* 31: 2336-46
415. Ponchel F, Verburg R, Bingham S, Brown A, Moore J, Protheroe A, Short K, Lawson C, Morgan A, Quinn M, Buch M, Field S, Maltby S, Masurel A, Douglas S, Straszynski L, Fearon U, Veale D, Patel P, McGonagle D, Snowden J, Markham A, Ma D, van Laar J, Papadaki H, Emery P, Isaacs J. 2005. Interleukin-7 deficiency in rheumatoid arthritis: consequences for therapy-induced lymphopenia. *Arthritis Res Ther* 7: R80 - R92
416. Churchman SM, Ponchel F. 2008. Interleukin-7 in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 47: 753-9

417. Pickens SR, Chamberlain ND, Volin MV, Pope RM, Talarico NE, Mandelin AM, Shahrara S. 2011. Characterization of IL-7 and IL-7R in the pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 63: 2884-93
418. Hartgring SAY, van Roon JAG, Wijk MW-v, Jacobs KMG, Jahangier ZN, Willis CR, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG. 2009. Elevated expression of interleukin-7 receptor in inflamed joints mediates interleukin-7-induced immune activation in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 60: 2595-605
419. van Roon JAG, Hartgring SAY, Wenting-van Wijk M, Jacobs KMG, Tak P-P, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG. 2007. Persistence of interleukin 7 activity and levels on tumour necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 66: 664-9
420. Hartgring SAY, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG, van Roon JAG. 2006. Interleukin-7 induced immunopathology in arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 65: iii69-iii74
421. van Amelsfort JMR, van Roon JAG, Noordegraaf M, Jacobs KMG, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG, Taams LS. 2007. Proinflammatory mediator-induced reversal of CD4+,CD25+ regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 56: 732-42
422. Salopek D, Grcevic D, Katavic V, Kovacic N, Lukic IK, Marusic A. 2008. Increased bone resorption and osteopenia are a part of the lymphoproliferative phenotype of mice with systemic over-expression of interleukin-7 gene driven by MHC class II promoter. *Immunology Letters* 121: 134-9
423. Long D, Blake S, Song X-Y, Lark M, Loeser R. 2008. Human articular chondrocytes produce IL-7 and respond to IL-7 with increased production of matrix metalloproteinase-13. *Arthritis Research & Therapy* 10: R23
424. Crawley AM, Faucher S, Angel JB. 2010. Soluble IL-7Ralpha (sCD127) Inhibits IL-7 Activity and Is Increased in HIV Infection. *The Journal of Immunology* 184: 4679-87
425. Hartgring SAY, Willis CR, Alcorn D, Nelson LJ, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG, van Roon JAG. 2010. Blockade of the interleukin-7 receptor inhibits collagen-induced arthritis and is associated with reduction of T cell activity and proinflammatory mediators. *Arthritis & Rheumatism* 62: 2716-25

