



Faculté de médecine

Année 2020-2021

Thèse

Pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'État

par

Sara MAHMOUD

Née le 18 janvier 1995 à Besançon (25)

Effet in vitro d'un anticorps bispécifique ciblant les cellules dendritiques sur l'inflammation dans la polyarthrite rhumatoïde

Présentée et soutenue publiquement le 17 juin 2021 devant un jury composé de :

Président du Jury :

Professeur Philippe GOUPILLE, Rhumatologie, Faculté de Médecine –Tours

Membres du Jury :

Professeur Christophe RICHEZ, Rhumatologie, Faculté de Médecine – Bordeaux

Docteur Florence VELGE-ROUSSEL, Immunologie parasitaire, MCU-PH, Faculté de Pharmacie – Tours

Professeur Denis MULLEMAN, Rhumatologie, Faculté de Médecine – Tours

Directeurs de thèse : Professeur Denis MULLEMAN et Docteur Florence VELGE-ROUSSEL

UNIVERSITE DE TOURS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN

Pr Patrice DIOT

VICE-DOYEN

Pr Henri MARRET

ASSESEURS

Pr Denis ANGOULVANT, *Pédagogie*

Pr Mathias BUCHLER, *Relations internationales*

Pr Theodora BEJAN-ANGOULVANT, *Moyens – relations avec l'Université*

Pr Clarisse DIBAO-DINA, *Médecine générale*

Pr François MAILLOT, *Formation Médicale Continue*

Pr Patrick VOURC'H, *Recherche*

RESPONSABLE ADMINISTRATIVE

Mme Fanny BOBLETER

DOYENS HONORAIRES

Pr Emile ARON (†) – 1962-1966

Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962

Pr Georges DESBUQUOIS (†) - 1966-1972

Pr André GOUAZE (†) - 1972-1994

Pr Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004

Pr Dominique PERROTIN – 2004-2014

PROFESSEURS EMERITES

Pr Daniel ALISON

Pr Gilles BODY

Pr Jacques CHANDENIER

Pr Alain CHANTEPIE

Pr Philippe COLOMBAT

Pr Etienne DANQUECHIN-DORVAL

Pr Pascal DUMONT

Pr Dominique GOGA

Pr Gérard LORETTE

Pr Dominique PERROTIN

Pr Roland QUENTIN

PROFESSEURS HONORAIRES

P. ANTHONIOZ – P. ARBEILLE – A. AUDURIER – A. AUTRET – P. BAGROS – P. BARDOS – C. BARTHELEMY – J.L. BAULIEU – C. BERGER – JC. BESNARD – P. BEUTTER – C. BONNARD – P. BONNET – P. BOUGNOUX – P. BURDIN – L. CASTELLANI – B. CHARBONNIER – P. CHOUTET – T. CONSTANS – P. COSNAY – C. COUET – L. DE LA LANDE DE CALAN – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – J. FUSCIARDI – P. GAILLARD – G. GINIES – A. GOUDEAU – J.L. GUILMOT – N. HUTEN – M. JAN – J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE – Y. LANSON – O. LE FLOCH – Y. LEBRANCHU – E. LECA – P. LECOMTE – AM. LEHR-DRYLEWICZ – E. LEMARIE – G. LEROY – M. MARCHAND – C. MAURAGE – C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAINÉ – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – L. POURCELOT – P. RAYNAUD – D. RICHARD-LENOBLE – A. ROBIER – J.C. ROLLAND – D. ROYERE – A. SAINDELLE – E. SALIBA – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – D. SIRINELLI – J. WEILL

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

ANDRES Christian	Biochimie et biologie moléculaire
ANGOULVANT Denis	Cardiologie
AUPART Michel	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BABUTY Dominique	Cardiologie
BAKHOS David	Oto-rhino-laryngologie
BALLON Nicolas	Psychiatrie ; addictologie
BARILLOT Isabelle	Cancérologie ; radiothérapie
BARON Christophe	Immunologie
BEJAN-ANGOULVANT Théodora	Pharmacologie clinique
BERHOUEZ Julien	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BERNARD Anne	Cardiologie
BERNARD Louis	Maladies infectieuses et maladies tropicales
BLANCHARD-LAUMONNIER Emmanuelle...	Biologie cellulaire
BLASCO Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
BONNET-BRILHAULT Frédérique	Physiologie
BOURGUIGNON Thierry	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BRILHAULT Jean	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BRUNEREAU Laurent	Radiologie et imagerie médicale
BRUYERE Franck	Urologie
BUCHLER Matthias	Néphrologie
CALAIS Gilles	Cancérologie, radiothérapie
CAMUS Vincent	Psychiatrie d'adultes
CORCIA Philippe	Neurologie
COTTIER Jean-Philippe	Radiologie et imagerie médicale
DE TOFFOL Bertrand	Neurologie
DEQUIN Pierre-François.....	Thérapeutique
DESOUBEAUX Guillaume.....	Parasitologie et mycologie
DESTRIEUX Christophe	Anatomie
DIOT Patrice	Pneumologie
DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague	Anatomie & cytologie pathologiques
DUCLUZEAU Pierre-Henri	Endocrinologie, diabétologie, et nutrition
EL HAGE Wissam	Psychiatrie adultes
EHRMANN Stephan	Médecine intensive – réanimation
FAUCHIER Laurent	Cardiologie
FAVARD Luc	Chirurgie orthopédique et traumatologique
FOUGERE Bertrand	Gériatrie
FOUQUET Bernard	Médecine physique et de réadaptation
FRANCOIS Patrick	Neurochirurgie
FROMONT-HANKARD Gaëlle	Anatomie & cytologie pathologiques
GAUDY-GRAFFIN Catherine	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
GOUPILLE Philippe	Rhumatologie
GRUEL Yves	Hématologie, transfusion
GUERIF Fabrice	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
GUILLOIN Antoine	Médecine intensive – réanimation
GUYETANT Serge	Anatomie et cytologie pathologiques
GYAN Emmanuel	Hématologie, transfusion
HAILLOT Olivier	Urologie
HALIMI Jean-Michel	Thérapeutique
HANKARD Régis.....	Pédiatrie
HERAULT Olivier	Hématologie, transfusion
HERBRETEAU Denis	Radiologie et imagerie médicale
HOURIOUX Christophe	Biologie cellulaire
LABARTHE François	Pédiatrie
LAFFON Marc	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence
LARDY Hubert	Chirurgie infantile
LARIBI Saïd	Médecine d'urgence
LARTIGUE Marie-Frédérique	Bactériologie-virologie
LAURE Boris	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
LECOMTE Thierry	Gastroentérologie, hépatologie
LESCANNE Emmanuel	Oto-rhino-laryngologie
LINASSIER Claude	Cancérologie, radiothérapie
MACHET Laurent	Dermato-vénéréologie
MAILLOT François	Médecine interne

MARCHAND-ADAM Sylvain	Pneumologie
MARRET Henri	Gynécologie-obstétrique
MARUANI Annabel	Dermatologie-vénéréologie
MEREGHETTI Laurent	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MITANCHEZ Delphine	Pédiatrie
MORINIERE Sylvain	Oto-rhino-laryngologie
MOUSSATA Driffa	Gastro-entérologie
MULLEMAN Denis	Rhumatologie
ODENT Thierry	Chirurgie infantile
OUAISSI Mehdi	Chirurgie digestive
OULDAMER Lobna	Gynécologie-obstétrique
PAINTAUD Gilles	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PATAT Frédéric	Biophysique et médecine nucléaire
PERROTIN Franck	Gynécologie-obstétrique
PISELLA Pierre-Jean	Ophtalmologie
PLANTIER Laurent	Physiologie
REMERAND Francis	Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
ROINGEARD Philippe	Biologie cellulaire
ROSSET Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
RUSCH Emmanuel	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
SAINT-MARTIN Pauline	Médecine légale et droit de la santé
SALAME Ephrem	Chirurgie digestive
SAMIMI Mahtab	Dermatologie-vénéréologie
SANTIAGO-RIBEIRO Maria	Biophysique et médecine nucléaire
THOMAS-CASTELNAU Pierre	Pédiatrie
TOUTAIN Annick	Génétique
VAILLANT Loïc	Dermato-vénéréologie
VELUT Stéphane	Anatomie
VOURC'H Patrick	Biochimie et biologie moléculaire
WATIER Hervé	Immunologie
ZEMMOURA Ilyess	Neurochirurgie

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

DIBAO-DINA Clarisse
LEBEAU Jean-Pierre

PROFESSEURS ASSOCIES

MALLET Donatien Soins palliatifs
POTIER Alain Médecine Générale
ROBERT Jean Médecine Générale

PROFESSEUR CERTIFIE DU 2ND DEGRE

MC CARTHY Catherine Anglais

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AUDEMARD-VERGER Alexandra Médecine interne
BARBIER Louise..... Chirurgie digestive
BINET Aurélien Chirurgie infantile
BRUNAUT Paul Psychiatrie d'adultes, addictologie
CAILLE Agnès Biostat, informatique médical et technologies de communication
CLEMENTY Nicolas Cardiologie
DENIS Frédéric Odontologie
DOMELIER Anne-Sophie Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
DUFOUR Diane Biophysique et médecine nucléaire
ELKRIEF Laure Hépatologie – gastroentérologie
FAVRAIS Géraldine Pédiatrie
FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie Anatomie et cytologie pathologiques
GATAULT Philippe Néphrologie
GUILLEUX Valérie..... Immunologie
GUILLON-GRAMMATICO Leslie Epidémiologie, économie de la santé et prévention

HOARAU Cyrille	Immunologie
IVANES Fabrice	Physiologie
LE GUELLEC Chantal	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
LEFORT Bruno	Pédiatrie
LEGRAS Antoine.....	Chirurgie thoracique
LEMAIGNEN Adrien	Maladies infectieuses
MACHET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques
MOREL Baptiste	Radiologie pédiatrique
PIVER Éric	Biochimie et biologie moléculaire
REROLLE Camille	Médecine légale
ROUMY Jérôme	Biophysique et médecine nucléaire
SAUTENET Bénédicte	Thérapeutique
TERNANT David	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
VUILLAUME-WINTER Marie-Laure	Génétique

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

AGUILLON-HERNANDEZ Nadia	Neurosciences
NICOGLOU Antonine	Philosophie – histoire des sciences et des techniques
PATIENT Romuald.....	Biologie cellulaire
RENOUX-JACQUET Cécile	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

BARBEAU Ludivine	Médecine Générale
RUIZ Christophe	Médecine Générale
SAMKO Boris	Médecine Générale

CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRA

BOUAKAZ Ayache	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
CHALON Sylvie	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
COURTY Yves	Chargé de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
DE ROCQUIGNY Hugues	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1259
ESCOFFRE Jean-Michel	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
GILLOT Philippe	Chargé de Recherche INRA – UMR INRA 1282
GOUILLEUX Fabrice	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7001
GOMOT Marie	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
HEUZE-VOURCH Nathalie	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
KORKMAZ Brice	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
LAUMONNIER Frédéric	Chargé de Recherche INSERM - UMR INSERM 1253
MAZURIER Frédéric	Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS 7001
MEUNIER Jean-Christophe	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1259
PAGET Christophe	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
RAOUL William	Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS 7001
SI TAHAR Mustapha	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
WARDAK Claire	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'Ecole d'Orthophonie

DELORE Claire	Orthophoniste
GOUIN Jean-Marie	Praticien Hospitalier

Pour l'Ecole d'Orthoptie

MAJZOUB Samuel.....	Praticien Hospitalier
---------------------	-----------------------

Pour l'Ethique Médicale

BIRMELE Béatrice	Praticien Hospitalier
------------------------	-----------------------

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira
les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas
à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,
je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime
si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobre
et méprisé de mes confrères
si j'y manque.

REMERCIEMENTS

A Mesdames et Messieurs les membres du jury,

A Monsieur le Professeur Philippe Goupille, pour me faire l'honneur de présider ce jury, je vous remercie de votre soutien et de votre bienveillance ainsi que de votre confiance lors de mon arrivée en rhumatologie. Je vous témoigne ma profonde et respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Christophe Richez, merci d'avoir accepté de participer à ce jury. Vous me faites l'honneur d'apporter votre expérience à la critique de ce travail. Je vous prie de croire en l'expression de ma respectueuse considération.

A Madame le Docteur Florence Velge-Roussel, merci pour votre encadrement tout au long de ce projet. Je vous remercie de votre disponibilité et votre patience. Merci de m'avoir initiée à la recherche en immunologie. Veuillez croire en l'expression de ma sincère gratitude.

A Monsieur le Professeur Denis Mulleman, merci pour votre présence et votre confiance. Je vous remercie de votre gentillesse, vos conseils et toute l'aide que vous m'avez apportée dans la réalisation de ce projet. Je vous témoigne de ma respectueuse et sincère reconnaissance.

Au service de rhumatologie du CHRU de Tours,

Au Docteur Isabelle Griffoul, merci de m'avoir tant appris à travers tes connaissances poussées en clinique, ta rigueur et ta bienveillance envers les patients. J'ai hâte de revenir travailler avec toi.

Au Docteur Delphine Chu Miow Lin, merci pour tes conseils avisés et ton infinie gentillesse. Tu as fortement participé à mon choix pour la rhumatologie. C'est un réel plaisir de pouvoir travailler de nouveau en ta compagnie.

Au Docteur Saloua Mammou, merci pour ta bonne humeur communicative. Ton expertise en échographie a fait naître une réelle vocation. J'ai aussi grandement apprécié de faire le DU de rhumatologie pédiatrique avec toi. J'espère pouvoir pérenniser notre collaboration dans ce domaine.

A mes chefs, Elsa, Jessica, Faustine, Lucie, Marine et Chloé, merci pour votre présence, votre bonne humeur à toute épreuve et tout ce que vous m'avez appris.

A Micheline, Florence et Mouna ainsi que toute l'équipe paramédicale, merci pour votre grande amabilité et votre aide quotidienne.

Aux différents médecins des services qui m'ont accueillie lors de mon internat,

Au Docteur Marc Feller (réanimation, CH Blois), votre riche expérience m'a été d'une grande aide lors de mes premiers pas vers l'internat. Merci d'avoir cru en moi.

Au Docteur Didier Bonnet (anesthésie-obstétrique, CHR d'Orléans), tu m'as appris la rigueur et l'autonomie. Je te remercie d'avoir soutenu mon projet de changement de spécialité.

Aux Docteurs Nada Ibrahim, Carine Salliot et Piera Fuzibet (rhumatologie, CHR d'Orléans), merci de m'avoir transmis votre passion pour la rhumatologie. A Nada, merci pour ton sens de la pédagogie et ta gentillesse. J'espère que nos chemins se recroiseront.

Aux Professeurs Valérie Devauchelle-Pensec et Alain Saraux (rhumatologie, CHRU Brest), merci de m'avoir accueillie chaleureusement dans votre service et de m'avoir initiée à la rhumatologie pédiatrique. La Bretagne a été l'une des plus belles découvertes de mon internat.

Au Professeur Louis Bernard (maladies infectieuses, CHRU Tours) et à son équipe, merci pour votre amabilité et votre accueil. Cette initiation à l'infectiologie me sera d'une aide précieuse.

A mes co-internes durant l'ensemble de mes stages,

A Clarisse, Timothée, Caroline, Walid, Naomi, Annette, Léa, Johan, Heidi, Thomas, Marion, Diane, Camille, Agathe, Ines, Edo et Simon, merci pour tous les bons moments et merci à Léa, Johan et Simon de l'aide pour l'inclusion des patients.

Aux Brestois,

A Ambre, Aurore, Baptiste, Benoît, Justine, Laurie, Rémi, je n'ai qu'une chose à dire, « vous êtes super ». Merci de m'avoir adoptée. J'espère vous revoir très vite, sur terre ou sur mer.

A mes chefs, Camille, Maxime et Guillaume. A Camille, merci pour tes conseils et ta complicité. A Maxime, merci de m'avoir fait découvrir des championnats inconnus. A Guillaume, un grand merci pour ton aide et ton travail sur le projet BIC-RA, pour avoir rendu les trajets à Carhaix sympathiques, et surtout « TVB ».

A mes amis,

A Laurette, ma deuxième sœur, depuis le tramway ce 3 septembre 2012 en direction de la faculté de médecine, le début d'une grande aventure.

A Adèle, Camille et Yoann, merci pour tous les beaux souvenirs depuis l'externat et surtout pour les voyages les plus atypiques.

A Alex, la meilleure colocataire depuis le début d'internat et une amie extraordinaire.

A Naomi, merci d'être une amie en or en plus de ma co-interne.

A Marion, Anne, Ludo, Valère, Caroline, Delphine, Marion, les belles rencontres de mon internat.

A mes amies libanaises, Fatme et Nour, pour tout le bonheur que vous m'apportez malgré la distance.

A Lama, tu me surnommait toujours « Dr S ». J'aurais aimé que tu sois avec nous ce jour. J'aime à penser que tu reposes dans un endroit bien plus paisible.

A ma merveilleuse famille,

A mes parents, Ali et Mirna, merci pour tout ce que vous m'avez donné, appris, transmis. Sans vous, je ne serais pas là où je suis. Merci pour l'immense amour que vous nous procurez.

A Line et Rayan, merci d'être la meilleure sœur et le meilleur frère que l'on puisse espérer avoir. Notre complicité éternelle me rend plus qu'heureuse. Merci pour votre soutien sans faille.

A vous quatre, sachez que vous me rendez incroyablement fière. Merci d'avoir été présents dans les moments heureux comme dans les plus difficiles. Merci pour tout.

A ma grand-mère, merci d'être notre modèle, merci de ton amour et ta force.

A Tania, merci de ton soutien constant et de ton affection. Tu es l'une des femmes les plus fortes que je connaisse.

A toi,

Rayane, merci pour l'incroyable personne que tu es, pour les aventures, le cactus, pour ta complicité, ton soutien, ton amour. Merci pour tout.

RESUME

Effet in vitro d'un anticorps bispécifique ciblant les cellules dendritiques sur l'inflammation dans la polyarthrite rhumatoïde.

INTRODUCTION : Les traitements utilisés actuellement dans la polyarthrite rhumatoïde (PR) agissent en aval du processus physiopathologique en bloquant l'inflammation. Un nouvel anticorps bispécifique a été développé appelé Bispecific Immunomodulator of C-type Lectine Receptor (BIC) visant les cellules dendritiques (CDs). Notre objectif était de caractériser les sous-populations de CDs présentes dans le liquide synovial (LS) de patients atteints de PR en comparaison aux patients atteints de goutte et d'arthrose afin d'étudier l'effet des BIC sur le liquide synovial.

METHODE : Nous avons mené une étude prospective et observationnelle dans le service de rhumatologie du centre hospitalier universitaire de Tours. Nous avons inclus des patients atteints de PR, d'arthrose primitive ou de goutte se présentant avec une arthrite justifiant une ponction du LS. Les données démographiques, anamnestiques et clinico-biologiques ont été recueillies à l'inclusion. Les échantillons ont été purifiés et dilués en fonction de la viscosité du LS. Les populations cellulaires ont été caractérisées par cytométrie en flux dans chacun des trois groupes. Les cytokines IL-10, IL-6, INF- γ et TNF- α ont été mesurées par méthode ELISA. Les échantillons ont été ensuite mis en culture avec les BICs et l'IL-10 a été mesuré dans le surnageant.

RESULTATS : Nous avons analysé le LS de 9, 8 et 7 patients atteints respectivement de PR, goutte et arthrose. Nous avons observé que les CDs étaient présentes dans le LS des patients atteints de PR où les CDs conventionnels (cDC1c et cDC141) étaient majoritaires. La proportion de CDs plasmacytoïdes était plus élevée dans le LS des patients PR en comparaison aux patients atteints de goutte et d'arthrose. Nous avons mis en évidence que les cellules activées par les BICs sécrétaient de l'IL-10 chez tous les patients testés.

CONCLUSION : Le LS des patients atteints de PR contient des CDs. Selon notre étude, les CDs issus du LS des patients PR produisent de l'IL-10 en présence du BIC menant à un état de tolérance immune. Ainsi, les anticorps bispécifiques ciblant les CDs pourraient représenter une stratégie intéressante pour de nouvelles thérapeutiques dans la PR.

Mots clés : polyarthrite rhumatoïde – liquide synovial – cellules dendritiques – sous-populations de CD – anticorps bispécifiques – interleukine 10

ABSTRACT

Effect of a new antibody format towards dendritic cells on inflammation in rheumatoid arthritis.

INTRODUCTION: Treatments used in rheumatoid arthritis (RA) block inflammation nonspecifically. A new bispecific antibody was developed called Bispecific Immunomodulator of C-type Lectine Receptor (BIC) that targets dendritic cells (DCs). Our aim is to characterize DC subsets found in the synovial fluid (SF) of RA patients compared to patients with gout and osteoarthritis (OA) and to study the effects of BIC on the SF.

METHOD: We conducted a prospective and observational study in the rheumatology department of the university hospital of Tours. We included patients with RA, primitive OA or gout disease whom presented with arthritis and underwent aspiration of SF. Demographic, clinical and biological data at inclusion were collected. Samples were purified and diluted because of the SF viscosity. Cell populations were characterized using flow cytometry in the three groups. IL-10, IL-6, INF- γ and TNF- α cytokines in the SF were measured performing an ELISA. Cells purified from SF were then put in culture with BICs for 48h.

RESULTS: We analyzed the SF from 9, 8 and 7 patients diagnosed with RA, OA and gout respectively. Our results showed that DCs were more represented in RA SF where conventional DCs (cDC1c and cDC141) constituted the majority of DCs. The proportion of plasmacytoid DCs was higher in the SF from RA patients compared gout and OA SF. We found that cells activated by BICs secreted a significant higher amount of IL-10 in all patients tested.

CONCLUSION: SF from patients with RA contains DCs. According to our study, DCs from RA SF can produce Il-10 in the presence of BIC leading to immune tolerance. Thus, bispecific antibodies that are directed against DCs could represent a potential target of interest for new therapeutics in RA.

Keywords: rheumatoid arthritis – synovial fluid – dendritic cells – DC subsets – bispecific antibodies – interleukin 10

LISTE DES ABREVIATIONS

ACPA : Anti-Citrullinated Protein Antibody

ACR : American College of Rheumatology

BIC : Bispecific Immunomodulator of C-type Lectine Receptor

BMI : Body mass index

CDs (ou DCs) : Cellules Dendritiques (Dendritic Cells)

cDCs : conventional DCs

CPA (ou APC) : Cellule Présentatrice de l'Antigène (Antigen-Presenting Cells)

CRP : C-reactive protein

DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

DMARD : Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs

EULAR : EUropean League Against Rheumatism

Fab : Antigen-binding fragment

FSC : Forward SCatter

HLA : Human Leucocyte Antigen

IFN : InterFéroN

IL : InterLeukine

LS (ou SF) : Liquide Synovial (Synovial Fluid)

MHC : Major Histocompatibility Class

NK : Natural Killer

OA : OsteoArthritis

pDCs : plasmacytoid DCs

PR (ou RA) : Polyarthrite Rhumatoïde (Rheumatoid Arthritis)

PRR : Pathogen Recognition Receptor

RF : Rheumatoid Factor

ScFv : Single chain variable Fragment

SSC : Side SCatter

TLR : Toll-Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

SOMMAIRE

Résumé du travail de thèse	15
Polyarthrite rhumatoïde	15
Généralités.....	15
Physiopathologie	15
Thérapeutiques et limites.....	15
Projet BIC-RA.....	17
Effect of a new antibody format towards dendritic cells on inflammation in rheumatoid arthritis.....	19
Introduction	20
Methods	21
Study design	21
Population.....	21
Sample preparation and purification	22
Flow cytometry analysis.....	22
Cell cultures.....	22
Cytokine dosages.....	23
Results	23
Baseline characteristics	23
Cell numeration, volume, number of cells/ml of SF samples	25
Population analyses	25
Identification of DC subsets	28
Analyses of receptors of interest in the SF.....	28
Measurements of cytokine levels in the SF.....	29
IL-10 production in the presence of BIC03.....	30
Discussion	31
Conclusion.....	33
References	34

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Structure of BIC.....	23
Figure 2: Flow chart of the study.	24
Figure 3: Representation of the volume and cellularity of synovial fluid according to the pathology. 26	
Figure 4: Size (FCS-A) and granularity (SSC-A) patterns of SF from 3 patients representing the 3 pathologies using flow cytometry.	27
Figure 5: Analyses of cell populations CD3 ⁺ , CD19 ⁺ , CD14 ⁺ , CD56 ⁺ and CD66b ⁺ contained in the SF using flow cytometry.....	27
Figure 6: Identification of DC subsets contained in the SF using flow cytometry	28
Figure 7: Analyses of the expression of cellular receptors of interest in the SF using flow cytometry.. ..	29
Figure 8: Cytokine concentrations in the SF of patients with Gout, RA and OA.. ..	30
Figure 9: Effects of BIC03 on SF cells.. ..	31

Résumé du travail de thèse

Polyarthrite rhumatoïde

Généralités

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une pathologie auto-immune entraînant une inflammation du tissu synovial articulaire. Cette synovite est à l'origine d'une douleur et d'un gonflement articulaire pouvant causer des érosions et résulter en une destruction articulaire(1). Il s'agit du rhumatisme inflammatoire chronique le plus fréquent pouvant survenir à tout âge mais plus fréquemment entre 40 et 60 ans. La prévalence générale de la PR varie entre 0,3 et 0,8% de la population adulte avec une prévalence en France estimée à 0,31%(2). Des critères permettant de diagnostiquer les patients atteints de PR ont été élaborés en 2010 par l'ACR et l'EULAR et comprennent des critères cliniques, biologiques et immunologiques(3).

Physiopathologie

Les connaissances concernant la physiopathologie de la PR ont évolué ces dernières années mais certains aspects et notamment ceux en lien avec le déclenchement de cette pathologie restent inconnus. Certains facteurs génétiques, environnementaux (tabac, infection) et hormonaux pourraient déclencher la phase d'inflammation(4–6). Lors de cette phase, l'antigène reconnu par l'organisme va être présenté aux lymphocytes T par les cellules dendritiques (CD) qui sont des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) puissantes(7). Les lymphocytes T activés vont migrer vers la synoviale où elles produiront des cytokines activant les cellules résidentes telles que les lymphocytes B, les cellules endothéliales et les synoviocytes qui constituent les principales constituants de la couche bordante de la membrane synoviale et qui sont composés des macrophages et fibroblastes(8). Le recrutement des cellules circulantes dans la synoviale va entraîner la libération de nombreux médiateurs de l'inflammation responsable de la synovite. Les cytokines TNF- α , IL-6 et IL-1 sont de puissants inducteurs des voies de signalisation impliquées dans la synthèse d'agents pro-inflammatoires menant à terme à une destruction articulaire par activation des ostéoclastes(9).

Thérapeutiques et limites

La prise en charge thérapeutique de la PR a grandement évolué ces dernières années avec l'apparition des biomédicaments. Il existe des recommandations nationales et internationales qui visent à codifier la stratégie thérapeutique(10). Celle-ci vise à obtenir un contrôle précoce

de l'inflammation permettant la rémission de la maladie qui est le meilleur moyen de lutter contre les complications principales de la PR telles que les lésions structurales à l'origine d'un handicap fonctionnel et les complications systémiques notamment cardiovasculaires liées à l'inflammation chronique.

Les moyens thérapeutiques comportent les traitements médicamenteux, la rééducation, l'éducation thérapeutique et la chirurgie. Le traitement médical associe d'une part les thérapeutiques à visée symptomatique pour traiter les poussées de PR (antalgiques, anti-inflammatoires non stéroïdiens, corticothérapie, infiltrations locales) et d'autre part les traitements de fond ayant pour but de freiner l'évolution de la maladie afin d'obtenir un état de rémission. Ces traitements peuvent être associés afin de contrôler le plus rapidement l'inflammation(11). Les traitements de fonds incluent les csDMARD (conventional synthetic Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs : méthotrexate, leflunomide, salazopyrine) et les biologiques bDMARD (biological DMARD). Parmi ces derniers, les anti-TNF α ont été les premiers biologiques développés et utilisés dans la PR(12). Les autres biothérapies utilisées dans la PR comprennent : un antagoniste du récepteur de l'IL-1 (Anakinra), un inhibiteur des voies de costimulation CD80/CD86-CD28 entre les cellules présentatrices de l'antigène et les lymphocytes T (Abatacept), un anticorps monoclonal inhibant spécifiquement le récepteur CD20 des lymphocytes B (Rituximab) et les anticorps monoclonaux anti IL-6 récepteur (Tocilizumab et Sarilumab).

Cependant, ces traitements permettent d'obtenir un état de rémission en inhibant une cible unique et doivent donc être poursuivis sur le long terme à intervalles réguliers en fonction de leurs demi-vies. L'arrêt brutal d'une biothérapie entraîne souvent une rechute clinique et une progression structurale de la PR(10,13). Il n'existe à ce jour pas de traitement ciblant les CD qui apparaissent comme une cible de choix dans la PR étant donné leur rôle important dans les mécanismes immunopathologiques. En effet, ils sont capables d'induire une tolérance immune, correspondant à l'absence de réponse effectrice (humorale ou cellulaire). Il a été montré qu'ils sont présents dans le liquide synovial des patients atteints de PR de façon plus importante que dans le sang et agissent en tant que CPA dans le liquide synovial en activant les lymphocytes T(7,14). Ainsi, une stratégie de modulation des fonctions tolérogènes des DC (ToIDC) pourrait induire un état de tolérance immune notamment par la coopération de récepteurs reconnaissant les pathogènes (PRR : pathogen recognition receptor) entraînant une augmentation de la production l'IL-10, une cytokine avec fort potentiel anti-inflammatoire, et

ainsi bloquer les mécanismes inflammatoires à l'origine de la synovite et donc des lésions structurales.

Projet BIC-RA

Les anticorps bispécifiques sont développés dans les domaines de l'oncologie principalement et des pathologies inflammatoires mais sont peu utilisés. Ils sont dirigés simultanément contre plusieurs cibles impliquées dans les phénomènes physiopathologiques et permettraient ainsi d'obtenir des thérapeutiques plus efficaces(15). Les Dr F. Velge-Roussel et N. Aubrey ont développé, dans le cadre du projet TolDC, des anticorps bispécifiques appelés BIC (Bispecific Immunomodulator of C-type Lectine Receptor) qui ont pour objectif de ponter des récepteurs présents sur la surface des DC pour induire des DC tolérogènes. Les BICs sont construits avec 2 scFv en tandem. Ils ciblent deux PRR : le Toll-like receptor 2 (TLR2) et une lectine type telles que CD209 ou DC-SIGN. Les premiers résultats ont montré que la liaison des BICs sur ses cibles sur les cellules issues de sang périphérique induit des modifications des DC qui ont un profil tolérogène et favorisent la production d'IL-10. Ces résultats sont en cours de publication.

Le projet BIC-RA a été initié par le Dr. Guillaume Le Mélédo, ancien interne de rhumatologie à Tours, dans le cadre lors de son année de Master 2^{ème} année en 2017-2018 afin d'étudier les effets *in vitro* de ces nouveaux anticorps bispécifiques ciblant les cellules dendritiques recrutées au cours de la PR. Les objectifs étaient, après purification du liquide synovial des patients atteint de PR de caractériser le profil des populations cellulaires, notamment les cellules dendritiques, présentes dans ce liquide. Des patients atteints de goutte et d'arthrose ont été inclus afin de pouvoir comparer les liquides synoviaux des patients atteints de PR avec ceux d'une autre pathologie inflammatoire et d'une pathologie mécanique respectivement. Les cellules issues du liquide synovial étaient ensuite mises en culture avec un BIC et leurs effets étaient comparés en mesurant la synthèse notamment d'IL-10. Il avait pu inclure 14 patients mais 11 ont pu être analysés après exclusion de 3 patients. Il y avait 3, 5 et 3 patients atteints respectivement de PR, de goutte et d'arthrose. Les premiers résultats ont confirmé que les BICs induisent en présence de cellules issues du liquide synovial une sécrétion d'IL-10. Les inclusions ont donc été poursuivies afin d'obtenir des résultats pour un plus grand nombre de patients.

J'ai donc pris la suite du projet BIC-RA dans le cadre de ma thèse de médecine en janvier 2020. Mon objectif était d'inclure 15 patients par pathologie soit un objectif de 45 patients au total afin d'obtenir des résultats plus puissants. Malheureusement, nous avons pris du retard avec les inclusions en raison de la crise sanitaire liée au Sars-Cov-2 principalement. Nous avons finalement pu obtenir des résultats sur un plus grand nombre de patients puisque 32 patients ont été inclus au total. Les objectifs étaient les mêmes que ceux de Guillaume Le Mélédo. Enfin, dans notre étude nous avons étudié l'effet d'un seul BIC (BIC03) qui cible TLR2 et CD209, également connu sous le nom de DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin).

Effect of a new antibody format towards dendritic cells on inflammation in rheumatoid arthritis.

ABSTRACT

Introduction: Treatments used in rheumatoid arthritis (RA) block inflammation nonspecifically. A new bispecific antibody was developed called Bispecific Immunomodulator of C-type Lectine Receptor (BIC) that targets dendritic cells (DCs). Our aim is to characterize DC subsets found in the synovial fluid (SF) of RA patients compared to patients with gout and osteoarthritis (OA) and to study the effects of BIC on the SF.

Method: We conducted a prospective and observational study in the rheumatology department of the university hospital of Tours. We included patients with RA, primitive OA or gout disease whom presented with arthritis and underwent aspiration of SF. Demographic, clinical and biological data at inclusion were collected. Samples were purified and diluted because of the SF viscosity. Cell populations were characterized using flow cytometry in the three groups. IL-10, IL-6, INF- γ and TNF- α cytokines in the SF were measured performing an ELISA. Cells purified from SF were then put in culture with BICs for 48h.

Results: We analyzed the SF from 9, 8 and 7 patients diagnosed with RA, OA and gout respectively. Our results showed that DCs were more represented in RA SF where conventional DCs (cDC1c and cDC141) constituted the majority of DCs. The proportion of plasmacytoid DCs was higher in the SF from RA patients compared gout and OA SF. We found that cells activated by BICs secreted a significant higher amount of IL-10 in all patients tested.

Conclusion: SF from patients with RA contains DCs. According to our study, DCs from RA SF can produce Il-10 in the presence of BIC leading to immune tolerance. Thus, bispecific antibodies that are directed against DCs could represent a potential target of interest for new therapeutics in RA.

Keywords: rheumatoid arthritis – synovial fluid – dendritic cells – DC subsets – bispecific antibodies – interleukin 10

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease characterized by joint pain and swelling along with bone erosion and destruction caused by synovial tissue inflammation(1). The exact cause of this disease remains unknown but, according to the literature, autoimmune diseases such as RA appear to be mainly induced by a break in self-tolerance. Both the adaptive immune system, with CD4⁺ T cells producing T-helper type (Th)-1 and Th17 cytokines as well as B cells, and the innate immune system, with macrophages and dendritic cells (DCs), all contribute to the RA immunopathology(14).

B and T lymphocytes are the mediators of immunity, but their function is under the control of several DC subsets. DCs are antigen-presenting cells (APC) that migrate to lymphoid organs and activate lymphocytes(16). They are divided in four major DC subsets including: conventional DCs (cDCs), plasmacytoid DCs (pDCs), inflammatory DCs (MoDCs) and Langerhans cells that have distinct phenotypic and functional characteristics(17).

In RA, DCs are increased in the synovial fluid (SF) as compared with the circulation(18,19). RA synovium contains many cell types including T lymphocytes, macrophage-like synoviocytes, fibroblastic synoviocytes, B lymphocytes, plasma cells, mast cells, osteoclasts and dendritic cells. Interactions among this cell population offer targets for new therapeutic interventions(17).

Gout is a common arthritis caused by deposition of monosodium urate crystals within joints after chronic hyperuricemia(20). It results from an interaction between urate crystals and synoviocytes that leads to an autoimmune response implicating the innate system. More precisely, the Toll like receptors (TLRs) 2 and 4 and CD14 participate to the production of cytokines in response to the crystals(21).

Osteoarthritis (OA) is a common degenerative joint disease, affecting millions of people, that causes a deterioration of the joint cartilage. The exact etiology is still unknown. Bone formation but also erosions, alteration of subchondral bone and inflammation of the synovium can be observed(22). The immune reaction resulting in synovitis implies different cell types such as macrophages, B cells, T cells infiltrates in the synovium, with lower levels compared to the ones observed in RA, but also DCs and natural killer (NK) cells. The innate immune system seems to contribute to this reaction as high levels of CD14 have been found in the SF at both early and late stages of OA(23).

The treatments used in RA have the ability to control symptoms and signs of the disease, thus retarding the effects of rheumatoid inflammation on articular cartilage and bone, but a certain proportion fails to respond adequately(24,25). Current disease-modifying anti-rheumatic drugs and biologic inhibitors of TNF- α , IL-6, T cells and B cells block inflammation nonspecifically. No therapeutic has yet achieved antigen specificity for controlling symptoms in RA(26). A major challenge in therapeutics is to develop strategies that re-establish immune tolerance to lead to long-term disease suppression. In this context, DCs appear as major targets of interest to reach a state of self tolerance defined as the absence of an immune response to antigens that are normal constituents of the organism and have the ability to elicit an immune response.

Bispecific antibodies combine two antibody specificities that are able to target different antigens or epitopes(15,27). A new bispecific antibody was developed called Bispecific Immunomodulator of C-type Lectine Receptor (BIC) that activates DCs by bridging their surface receptors(28).

The aim of our study was to characterize DC subsets found in the synovial fluid of RA patients compared to patients with gout and osteoarthritis. Secondary outcomes were to study the effects of BIC on the synovial fluid by measuring the production of anti-inflammatory cytokines.

Methods

Study design

This was a prospective and observational study that was carried in the university hospital of Tours in the rheumatology department between December 2017 and February 2021.

Population

Eighteen year-old or older patients with known or newly diagnosed RA, primitive OA or gout disease whom presented with mono, oligo or polyarthritis and underwent aspiration of synovial fluid were included. Patients with microcrystalline arthritis other than gout, spondyloarthritis, septic arthritis or receiving therapeutic antibodies were excluded. Patient's consent forms were collected before each inclusion after they were given loyal and complete information. Diagnosis of RA was established using the ACR/EULAR criteria 2010(3). Gout disease was diagnosed in the presence of multiple criteria such as tophus, monosodium urate

crystals found in the SF and hyperuricaemia(20). We chose to include patients with primitive OA because it's a non-inflammatory disease. Thus we could compare them to inflammatory SF found in patients with RA. Diagnosis of primitive OA was based on the association of clinical and radiographic outcomes(29).

Sample preparation and purification

Aspiration of SF was performed in each patient after strict aseptic techniques. Samples were stored at 4°C until they were analyzed at the laboratory. One milliliter of each SF sample was stored at -20°C and corresponded to “population 0”. Because of the viscosity of SF, the rest of the sample must be diluted. SF dilutions were performed in RPMI 1640 (*Dominique Dutsher, Brumath, France*) and centrifuged at 700g for 10 minutes. Trypan blue was then used to count the cells. Cells that were going to be marked and put in culture were diluted using RPMI and centrifuged at 460g for 5 minutes. The following stage was to use these cells corresponding to “population 1” contained in the now purified SF for marking and culture.

Flow cytometry analysis

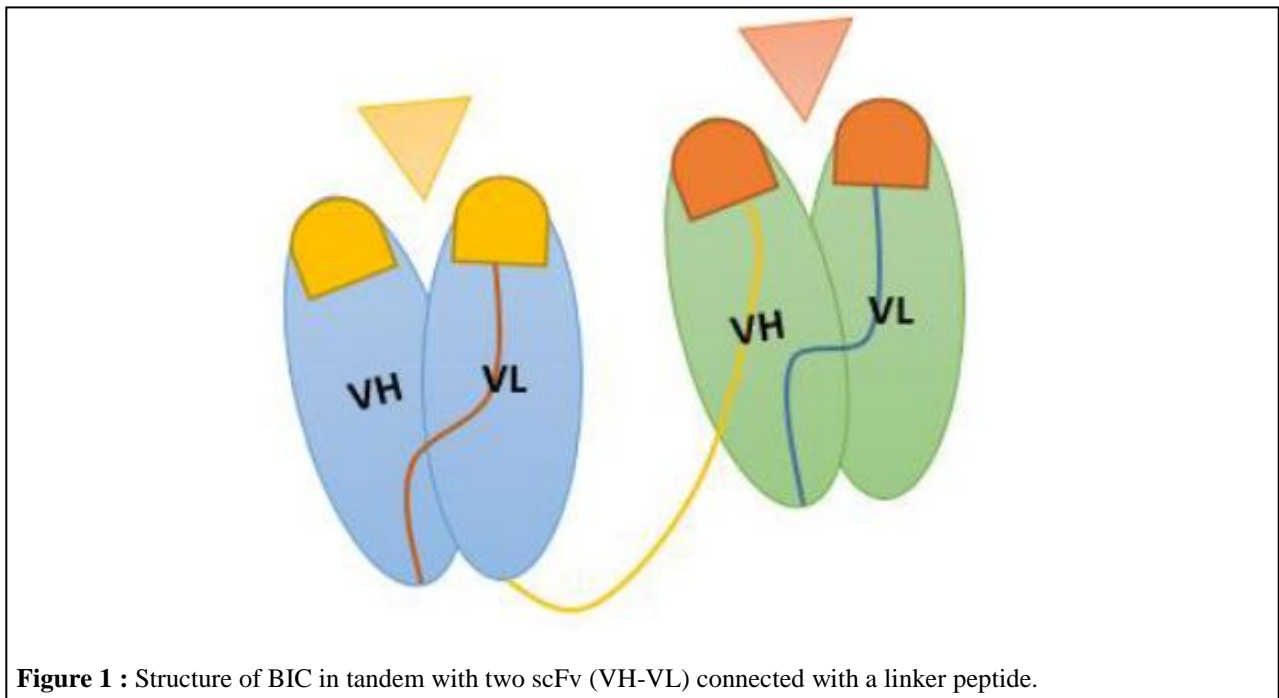
Flow cytometry is a cell-biology technique that rapidly analyzes cells contained in a heterogenous fluid as they flow past single or multiple lasers while suspended in a buffered salt-based solution. It utilizes light scatter and fluorescence emission. Each cell passes through a channel and is analyzed for visible light scatter that is measured in two directions: the forward direction (Forward Scatter or FSC) that indicates the size of the cell and at 90° (Side Scatter or SSC) that indicates the granularity of the cell(30). Fluorescent light is emitted by fluorescent molecules that may come from naturally fluorescing materials in the cell or from fluorescent dyes or tagged antibodies.

In our study, cells ($1.10^5/100 \mu\text{L}$) were stained for 30 min at 4°C with the following anti-human antibodies at the appropriate concentration or with the relevant isotypes: CD45-PerCP, CD14-PE, CD3PE, C19FITC, CD56-FITC, CD66b-PE (*Miltenyi*). For the DC subset identification, the following panel was used: HLA-DR-FITC, CD123-PE, CD303-PEVio700, CD11c-PE, CD1c- CD141-XX. All cells were labeled by TLR2-APC and CD209-PE-Vio700. The cells were then washed once using cold Phosphate Buffered Saline (GG) and viable cells were then analyzed on a Cytoflex S (*Beckman Coulter*). Results were expressed as the % of the total population.

Cell cultures

Cell populations, obtained from the SF, were cultured in complete culture medium at 37°C for 48 hours. Each culture well contained 10⁶ cells in presence of the different tested molecules and one cell well was used as the control sample. After 48 hours, samples were centrifuged at 300g. Culture supernatants were then stored at 20°C.

We tested one molecule: BIC 03 (30, 60nM or 120 nM) that targets TLR2 and CD209 also known as DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) and its related controls. BICs were produced by Dr. Nicolas Aubrey and his team. They are bispecific antibodies created using a single chain variable fragment (scFv) in tandem structure (Figure 1). Antigen-binding fragment (Fab) is composed of one constant and one variable domain of each of the heavy and the light chain. ScFv is the fusion of the variable regions of the heavy (VH) and light chains (VL) that connect via a short linker peptide.



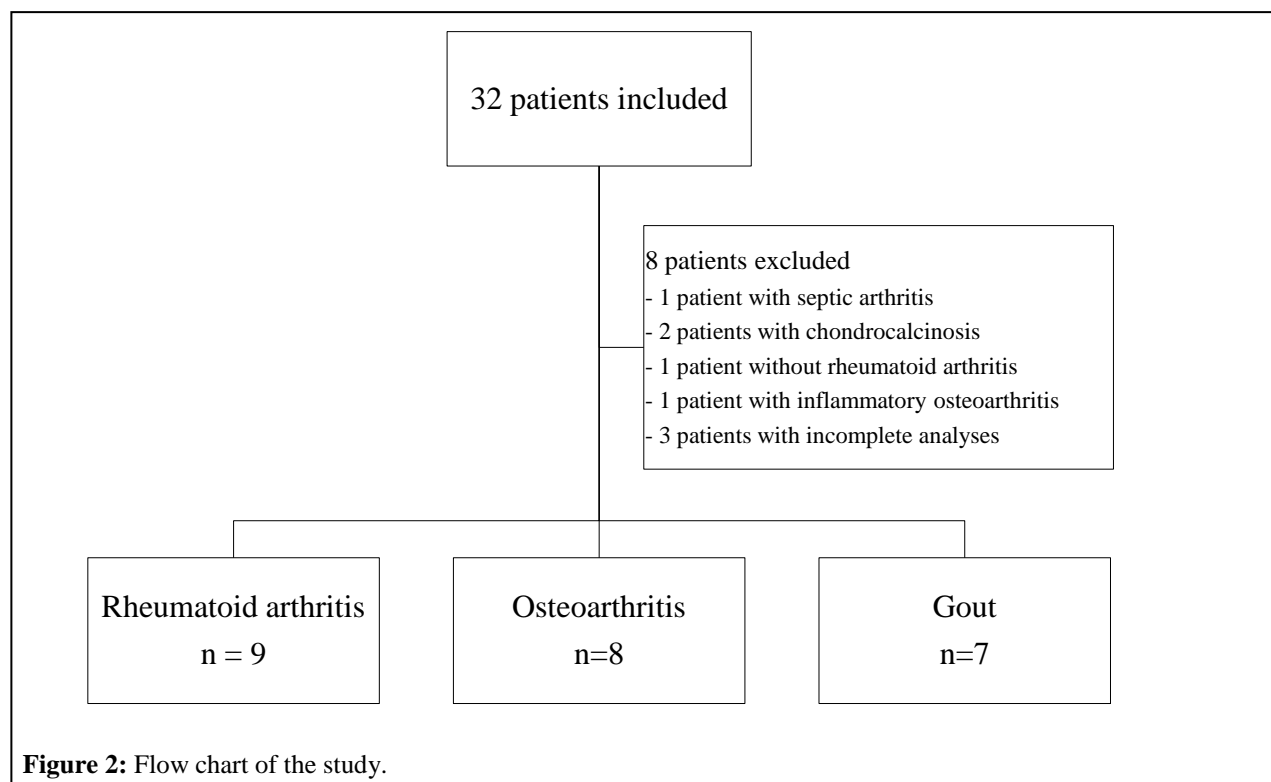
Cytokine dosages

Cytokines in synovial fluid were assessed by ELISA kits (*Invitrogen kits, Carlsbad, CA, USA*). Measurements of IL-6, IL-12, IFN- γ and TNF- α levels were performed on samples of synovial fluid initially stored at -20°C and on cells supernatants. IL-10 levels were also measured when SF cells were put in culture with BIC03 for 48h.

Results

Baseline characteristics

We enrolled 32 patients. 8 patients were excluded: septic arthritis was suspected in 1 patient, 2 patients had chondrocalcinosis, 1 patient did not meet the ACR/EULAR criteria for RA diagnosis, 1 patient had inflammatory OA and complete analyses could not be performed in 3 patients. Flow chart is presented in Figure 2.



In total, 9, 8 and 7 patients diagnosed with RA, OA and gout respectively were analyzed. The median age of the patients was 46 in the RA group, 79 in the gout group and 69 in the OA group. 75%, 0% and 62% of the RA, gout and OA patients respectively were female. Detailed demographic characteristics and laboratory tests at inclusion are shown in Table 1.

Table 1: Baseline Characteristics of the Patients.

Characteristics	RA (n=9)	OA (n=8)	Gout (n=7)
Age, years	46 (20-81)	69 (44-89)	79 (49-89)
BMI, kg/m ²	26.6 (20-35)	27.3 (22-28)	31.2 (24-33)
Female sex, n (%)	6 (75)	5 (63)	0

Laboratory tests

WBC, $\times 10^6/\text{ml}$	10.5 (6-18)	5.5 (4-9)	7.7 (7-11)
Lymphocytes, $\times 10^6/\text{ml}$	1.9 (1-3)	1.4 (1-2)	1.4 (0.3-2)
CRP, mg/l	28.4 (1-192)	7.5 (5-105)	150 (59-524)
Uric acid, $\mu\text{mol/l}$	207 (161-246)	365 (224-400)	523 (172-872)
RF positivity, n (%)	3 (33)	1 (13)	2 (29)
ACPA positivity, n (%)	1 (11)	0	0

Values are presented as median (min-max) or n (%).

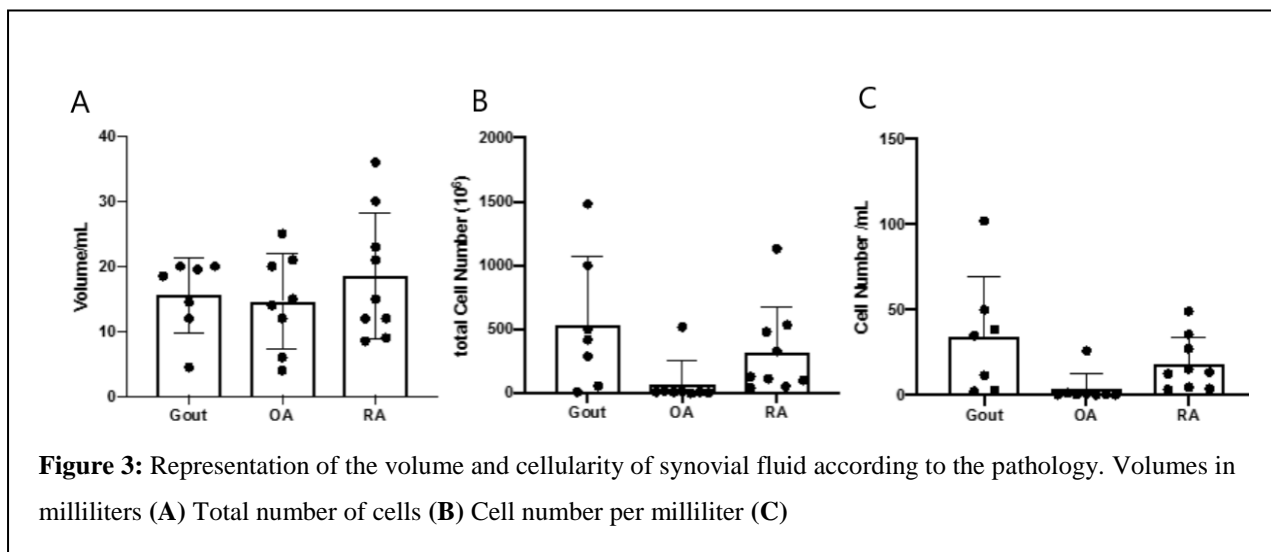
RA: rheumatoid arthritis, OA: osteoarthritis, BMI: body mass index; WBC : white blood cells; CRP: C-reactive protein; RF: rheumatoid factor

Cell numeration, volume, number of cells/ml of SF samples

The volumes of synovial fluids obtained were heterogenous depending on the severity of joint swelling. Volumes of SF were higher in patients with RA and gout whom usually have more important joint swelling compared to patients with OA. SF from patients with gout was richer in cells than patients with RA. The cellularity of the SF from patients with OA was very poor. The number of cells/ml from the samples obtained from RA patient was in-between the other two pathologies (Figure 2).

Population analyses

We analyzed cell populations in the SF using flow cytometry. Figure 4 shows three examples characteristic of each disease group. We identified 3 main populations that differed with their size (FCS) and granularity (SSC). Population 1, defined by a small size and a low granularity, was predominant in patients with OA (Figure 4C). Population 2, characterized by a large size and an average granularity, was predominant in the SF of patients with RA (Figure 4A) and was also present in lower proportions in patients with gout and OA. Population 3 referred to cells of average size and high granularity, which was absent in OA SF (Figure 4C) and present in both RA and gout SF (Figure 4A and 4B respectively).

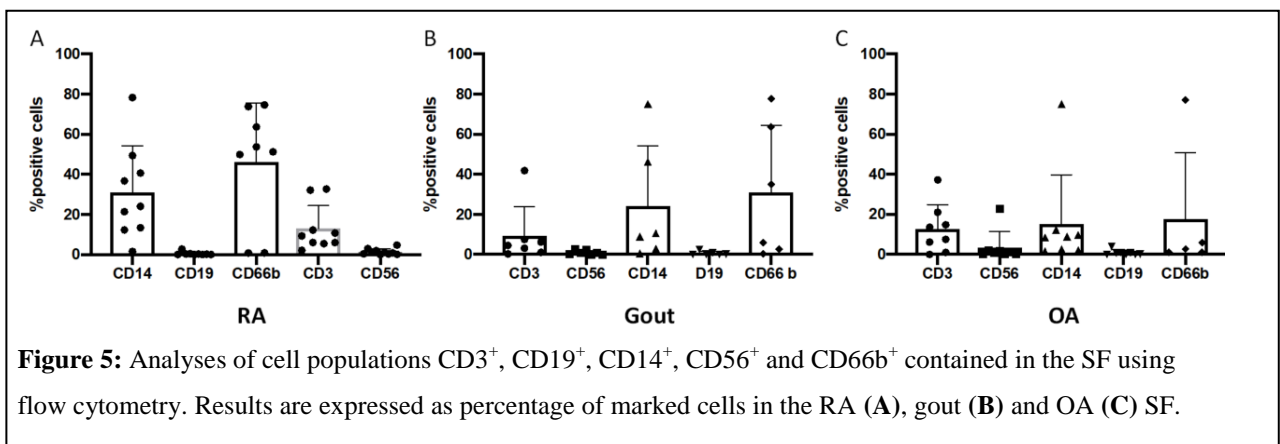
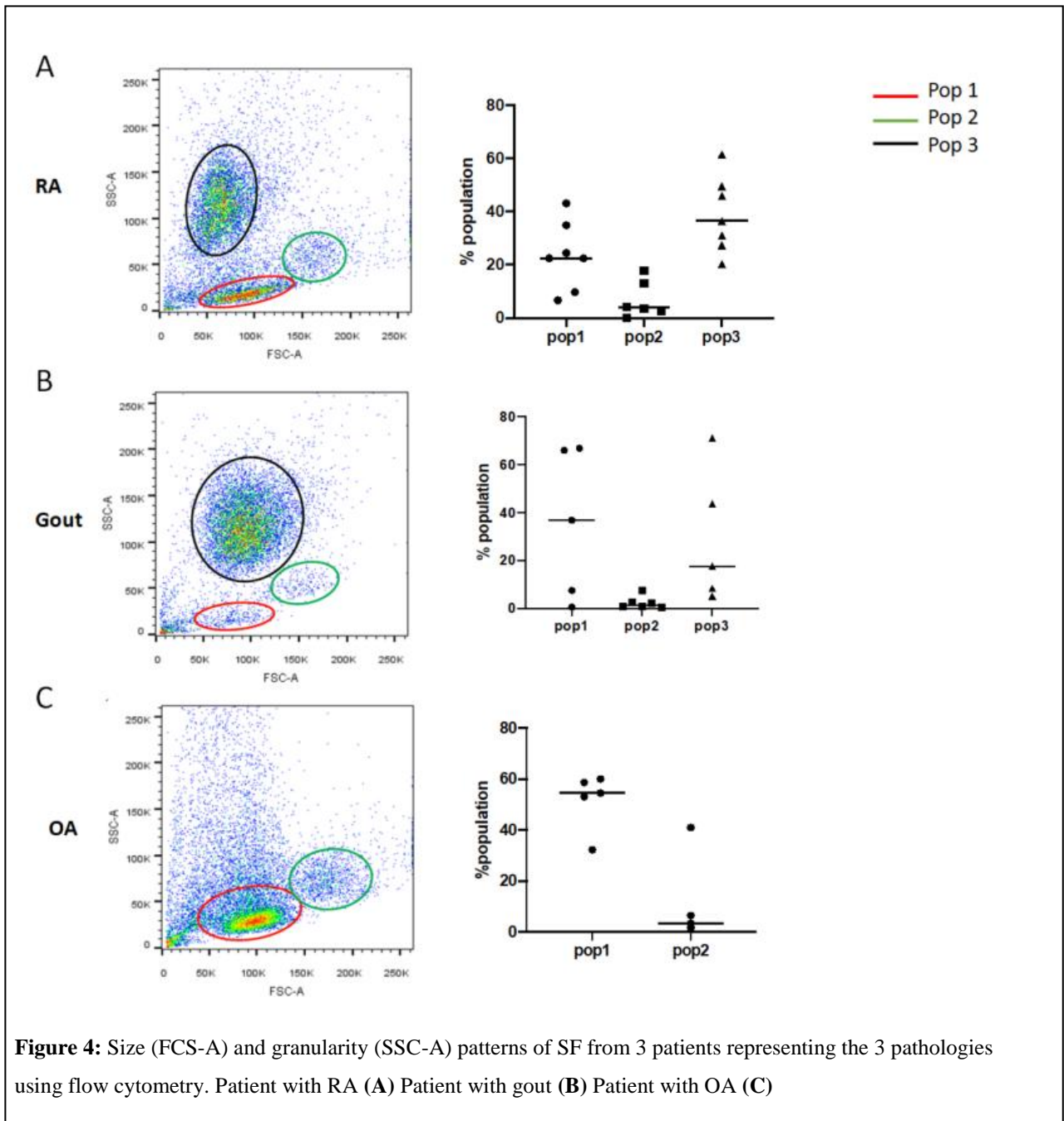


Cells from the SF were labeled with the appropriate anti-human antibodies to identify the following populations: CD4 and CD8 T lymphocytes (CD3⁺), B lymphocytes (CD19⁺), NK cells (CD56⁺), monocytes (CD14⁺) and neutrophils (CD66b⁺). Analyses were performed on the gated CD45⁺ populations. The percentages of these populations according to the different pathologies are shown in Figure 5.

Concerning lymphocytes, the CD3⁺ population was present in the 3 pathologies but was more abundant in the SF from patients with RA and OA. These cells had a similar size-granularity pattern as population 1 (Figure 4). Both CD19⁺ and CD56⁺ cells were practically non-existent in the 3 different pathologies except for one OA patient whom presented a positive percentage of CD56⁺ cells (Figure 5C).

Regarding CD14⁺ cells, they were mostly found in the SF from patients with RA and gout (Figure 5A and 5B). This cell population was less abundant in SF from OA patients compared to the other groups (Figure 5C). CD14⁺ cells were comparable to the size-granularity pattern of population 2 (Figure 4).

Finally, SF from patients with RA and gout contained a high proportion of CD66b⁺ cells that identifies neutrophils (Figure 5A and 5B). They were present in a smaller proportion in OA SF. CD66b⁺ cells were similar to population 3 in terms of size-granularity pattern (Figure 4).



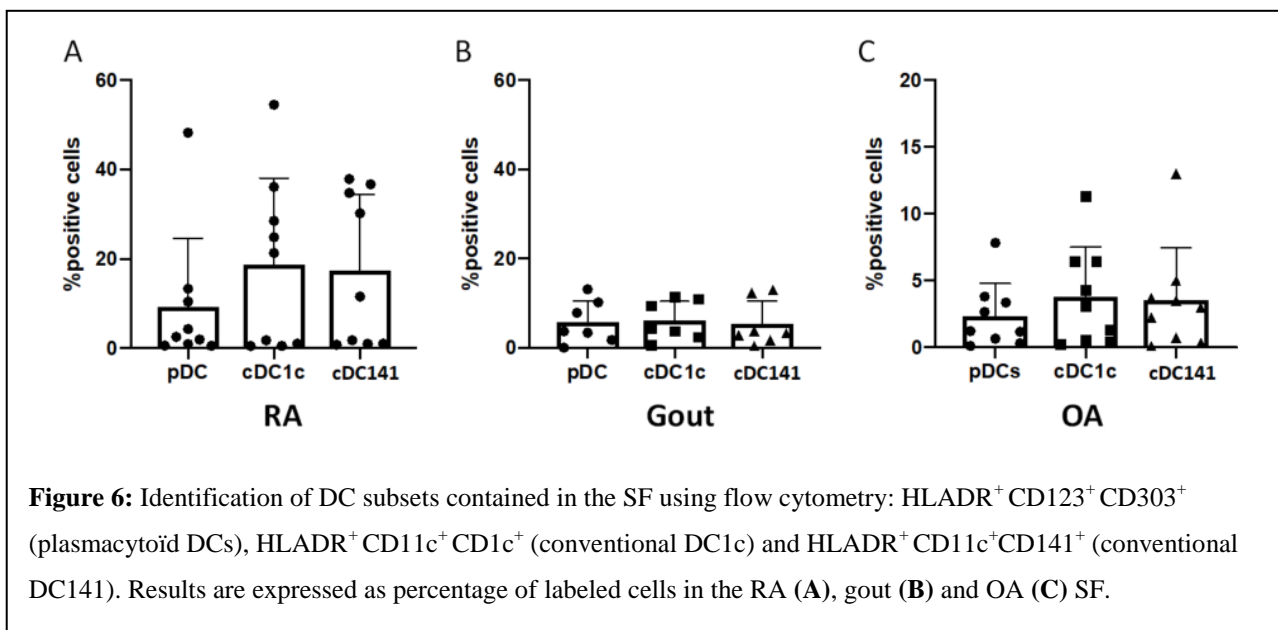
Identification of DC subsets

Similarly, DCs contained in the SF were identified by an HLA-DR⁺ CD123⁺ CD303⁺ labeling for plasmacytoid DCs (pDCs), an HLA-DR⁺ CD11c⁺ and CD1c⁺ or CD141⁺ labeling for the conventional DCs subsets i.e cDC1c and cDC141 respectively. The results obtained are shown in Figure 6. The size-granularity patterns of these labeled cells were comparable to population 2 as previously described (Figure 4).

Regarding plasmacytoid DCs, their proportion was slightly higher in the SF from RA patients compared to gout SF (Figure 6A). The percentage of pDCs was lower in OA SF compared to the other groups.

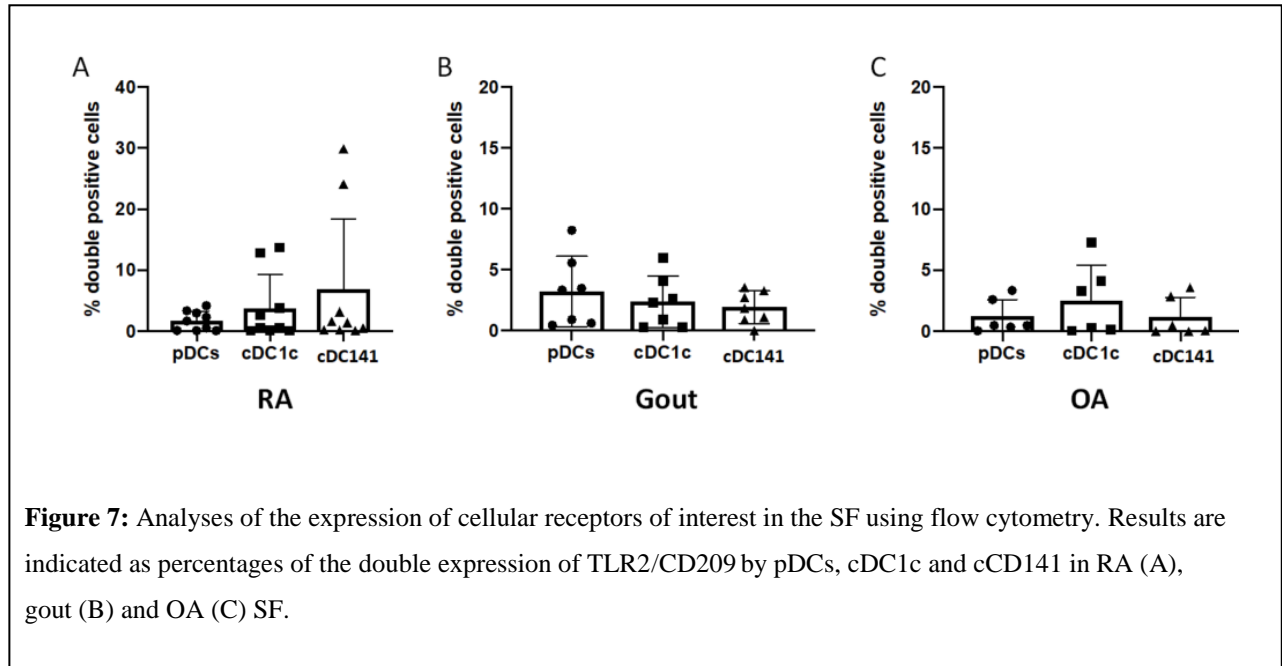
In regards to the cDCs, their proportions were similar in gout and OA groups for both cDC1c and cDC141 (Figure 6B and 6C). Their proportions were higher in RA SF than in the two other groups (Figure 6A).

cDC1c and cDC141 accounted for the majority of these.



Analyses of cellular receptors of interest in the SF

To determine the expression of TLR2 and CD 209 molecules, which are the target receptors of interest in our study, we analyzed the percentage of their double expression by DCs in the SF in the HLA-DR⁺ population as previously done (Figure 7).



For RA SF, cDCs appeared to express both receptors more than pDCs. In particular, cDC141 had the highest percentage of double positive cells (Figure 7A). On the contrary, in the SF from patients with gout, we observed a higher percentage of double expression of both receptors for pDCs as compared with the other groups (Figure 7B). For patients with OA, cDC1c displayed the highest percentage of double positive DCs (Figure 7C).

Measurements of cytokine levels in the SF

In attempt to characterize more specifically the 3 different groups, we measured the cytokines into the SF. Analyses could not be performed for all patients because the amount of SF was not sufficient for all of them. The concentrations of INF- γ , IL-12, IL-6 and TNF- α are presented in Figure 8. INF- γ , IL-12, IL-6 were found in all groups of SF (Figure 8A, 8B and 8C). INF- γ and IL-6 dosages concentrations were higher in RA and gout than in OA SF. IL-12 concentrations were increased in patients with OA compared to the others groups. On the opposite, TNF- α was absent in patients with gout and RA but was found in low concentrations in SF from patients with OA (Figure 8D).

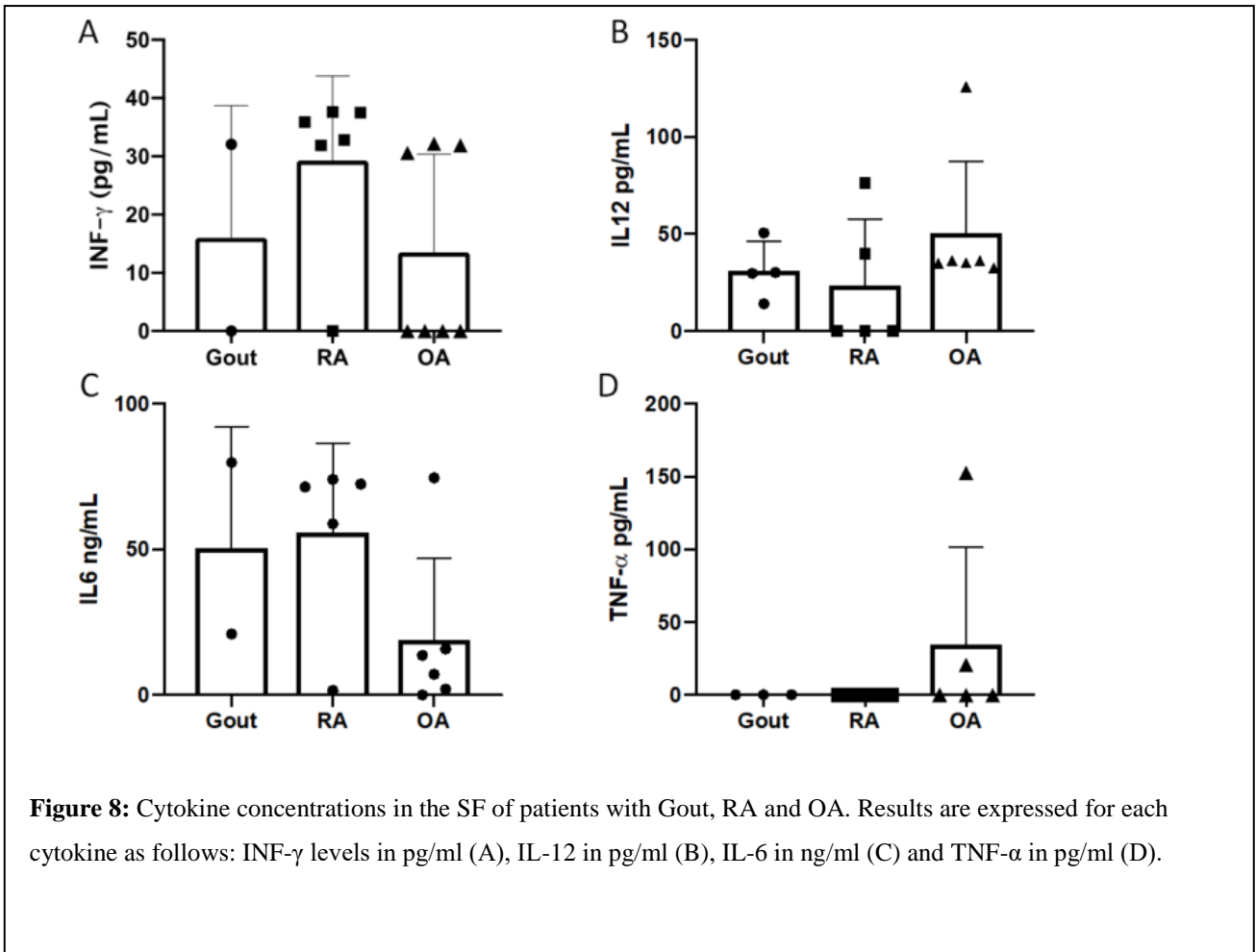


Figure 8: Cytokine concentrations in the SF of patients with Gout, RA and OA. Results are expressed for each cytokine as follows: INF- γ levels in pg/ml (A), IL-12 in pg/ml (B), IL-6 in ng/ml (C) and TNF- α in pg/ml (D).

IL-10 production in the presence of BIC03

To determine the cellular effects of BIC03, we measured the IL-10 concentrations in SF supernatants. We compared the production of IL-10 when SF cells were cultured in complete medium and with BIC03 (Figure 9). This was performed for 5 patients including 3 patients with RA and 2 patients with gout. We found that IL-10 concentrations were much higher in the presence of BIC03 for all patients.

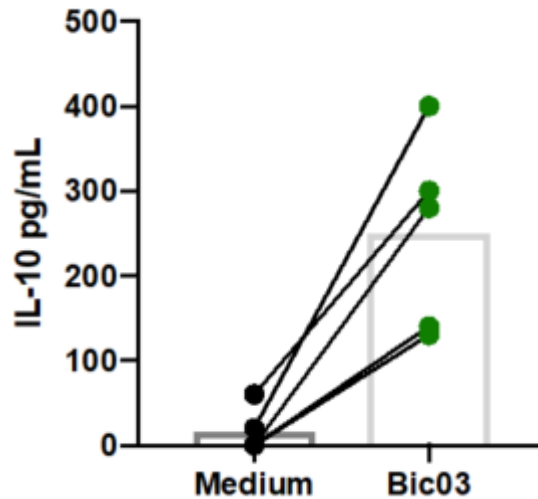


Figure 9: Effects of BIC03 on SF cells. Comparison of IL-10 concentrations (pg/ml) when SF supernatants were cultured with complete medium and with BIC03. For the 3 patients with RA, the concentrations of IL-10 in the presence of BIC03 were 130, 280 and 400 pg/ml. For the 2 patients with gout, the concentrations of IL-10 in presence of BIC03 were 140 and 300 pg/ml.

Discussion

Over the past years, progress has been made in the understanding of DCs in inflammatory diseases such as RA or gout. While DC subsets have been identified, their functional characterization has been limited by technical reasons making their isolation difficult(31). In humans, DC research focused on peripheral blood-derived DC(32). In the current study, our aim was to characterize the DC subsets present in the SF from patient with RA, an inflammatory disease characterized by a predominant adaptive immune response. We found that it contained more conventional DCs than plasmacytoid DCs. In comparison, SF from patients with gout, a predominantly innate mediated disease, presented fewer DCs. In the control group of OA, cDCs were predominant but less abundant than in the other groups.

We observed three cellular patterns according to the proportion of CD3⁺, CD14⁺ and CD66⁺ cells. For patients with gout, CD66⁺ cells were predominant suggesting an accumulation of neutrophils as described in the literature(33). Moreover, CD14⁺ cells were identified in lower quantity and CD3⁺ were present at a very low percentage indicating the major role of innate immunity in this group. For patients with OA, the 3 cell populations were comparable at lower levels, implying the intervention of both innate and adaptive immunity in this group in agreement with the literature(34). For patients with RA, CD66⁺ were the most abundant cells

followed by CD14⁺ and CD3⁺ cells. These results are in favor of both innate and adaptive immunity involvement in RA.

We identified different DC subsets using flow cytometry with the appropriate markers as reported in the literature. Hence, pDCs were identified by CD123⁺/CD303⁺ and cDCs by CD11c⁺/CD1c⁺ and CD11c⁺/CD141⁺ labeling in the HLA-DR gate(35,36).

Our results showed that the proportions of DC1 and DC2 were quite similar in RA SF. Conventional DCs include two major subsets defined as conventional DC1 and DC2 that both have high major histocompatibility class (MHC) II expression. DC1 are characterized by moderate expression of CD11c and high expression of CD141, while DC2 highly express CD11c and CD1c(5). Both DCs are known for their major role in antigen cross-presentation. It has been shown that DC1 induced a higher Th1 response compared with DC2(3). DC2 have been identified as the most potent IL-12 producing APC. They can secrete both IL-12 and IL-10 in response to TLR3 or TLR8 stimulation(37,38).

Plasmacytoid DCs are known for their ability to produce large amounts of type I interferons (IFN) in response to a viral infection(39). When activated, they acquire an APC function capable of CD4⁺ and CD8⁺ T cells activation(32,40). We found that pDCs were present in the SF in higher proportions of patients with RA and gout compared with OA. These results are consistent with the literature. *Lande R et al.*, observed a recruitment of pDCs in the SF of patients with RA and psoriatic arthritis when compared to patients with OA suggesting preferential accumulation of pDCs in inflamed joints. When analyzing the phenotype of pDCs contained in the SF, they found that they were similar to immature pDCs in peripheral blood i.e without expression of costimulatory molecules(41). This indicates that pDCs found in RA SF might fail to induce an immune response.

Our findings suggesting that cDC subsets are predominant in comparison with pDC subsets in RA SF are in accordance with other studies. *Cavanagh et al.*, compared RA SF with RA and healthy control peripheral blood for the proportion of CD123⁺ and CD11c⁺ DCs. They demonstrated that pDCs were not present in healthy control synovial tissue but SF from RA patients were infiltrated by pDCs, and CD11⁺ DCs were more abundant than CD123⁺ DCs in RA SF(42). In a study comparing SF from patients with Juvenile idiopathic arthritis (JIA) and septic arthritis (SA), an accumulation of CD141⁺ cDCs and CD123⁺ pDCs was highlighted in the SF from JIA patients compared to SA patients(43). JIA and RA patients were quite similar

as they are both chronic inflammatory rheumatic diseases, and we know that JIA patients can develop RA in adulthood.

Finally, we aimed at identifying DC subsets in RA SF that express both receptors to be targeted by BIC03. We found that cDCs had the highest percentage of concomitant TLR2⁺ and CD209⁺ receptors. This finding is promising since cDCs were more abundant than pDCs in RA SF. According to the literature, pDCs do not express TLR2. Moreover, high levels of TLR2 expression by cDC2 have been reported whereas cDC1 seem to express lower levels(44). *Lamendour et al.*, described that both cDC1 and cDC2 express CD209 but not pDCs(28).

In the presence of BIC03, we noticed a production of IL-10 in SF supernatants from patients with RA and gout. IL-10 is a tolerogenic cytokine blocking the production of pro-inflammatory cytokines. Hence, BIC03 appeared as able to induce a large amount of IL10 secretion by SF cells, which might be due to its action on DCs.

Our study has several limitations. First, we did not reach the number of patients needed per group which lower the strength of the results. Secondly, because of BIC03 availability issues during the study period, we could not test its effect in all SF. Thus, the results of 5 patients on IL-10 production presented herein may somehow limit the robustness of our conclusions.

Conclusion

SF from patients with RA contains DCs. Conventional DCs are more abundant than pDCs and express both TLR2 and CD209 receptors at a high rate. According to our study, cells from RA SF can produce IL-10 in the presence of BIC which could lead to immune tolerance. Thus, bispecific antibodies that are directed against TLR2 and CD209 expressed by DCs could represent a potential target for new therapeutics in RA. Furthermore studies with a larger number of patients are needed to confirm our findings.

Declaration

Ethics approval and consent to participate: This study was a non-interventional clinical trial (ID RCB: 2017-A02678-45) and approved by the institutional review board - *Comité de Protection des Personnes Ile de France VIII* (CPP: 17 11 76). This work was partly supported by the French Higher Education and Research Ministry under the program Investissements d'avenir (grant agreement: LabEx MAbImprove ANR-10-LABX-53-01). The patients included received an information on the use of their samples and medical data for research purpose. The present study was registered at ClinicalTrials.gov (NCT03416543).

Consent for publication: Not applicable

Availability of data and materials: Data are available upon request.

Competing interests: The authors declare that they have no competing interest in relation with the present work.

Authors contribution: Design and supervision: Denis Mulleman, Florence Velge-Roussel; Flow cytometry: Guillaume le Mélédo, Florence Velge-Roussel; Patients recruitment: Denis Mulleman, Sara Mahmoud, Guillaume Le Mélédo; ELISA: Florence Velge-Roussel. Draft: Sara Mahmoud. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Affiliations: EA 7501 GICC, University of Tours. FRAME team: Fc Receptors, Antibodies and MicroEnvironment; PATCH team: Pharmacology of therapeutic antibodies in humans. CHRU de Tours, Department of Rheumatology

Acknowledgements: We thank Yoann Desvignes for for technical support with the study Protocol; Marine Samain, Léa Lefeuvre, Johan Law-Wan, Simon Brunet for recruiting patients and collecting synovial samples; Nicolas Aubrey for providing bispecific antibodies; Nora Deluce and Maëlle Gilotin for assistance with flow cytometry.

References

1. Weyand CM. New insights into the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Oxf Engl.* juin 2000;39 Suppl 1:3-8.
2. Guillemin F, Saraux A, Guggenbuhl P, Roux CH, Fardellone P, Le Bihan E, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in France: 2001. *Ann Rheum Dis.* oct 2005;64(10):1427-30.
3. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis.* sept 2010;69(9):1580-8.
4. Klareskog L, Rönnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:651-75.
5. Lundberg K, Kinloch A, Fisher BA, Wegner N, Wait R, Charles P, et al. Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis Rheum.* oct 2008;58(10):3009-19.
6. Liao KP, Alfredsson L, Karlson EW. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* mai 2009;21(3):279-83.
7. Lutzky V, Hannawi S, Thomas R. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Dendritic cells. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(4):219.
8. Noss EH, Brenner MB. The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* juin 2008;223:252-70.
9. Schett G, Gravallese E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol.* nov 2012;8(11):656-64.
10. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update - PubMed [Internet]. [cité 16 mars 2021]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28264816/>
11. Combe B. Early rheumatoid arthritis: strategies for prevention and management. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* févr 2007;21(1):27-42.
12. Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis - PubMed [Internet]. [cité 16 mars 2021]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10774461/>
13. I N-M, Se S, Jr C. Systematic review of tumor necrosis factor inhibitor discontinuation studies in rheumatoid arthritis. *Clin Ther* [Internet]. nov 2013 [cité 18 mars 2021];35(11). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24156821/>
14. Moret FM, Hack CE, van der Wurff-Jacobs KMG, de Jager W, Radstake TRDJ, Lafeber FPJG, et al. Intra-articular CD1c-expressing myeloid dendritic cells from rheumatoid arthritis patients express a unique set of T cell-attracting chemokines and spontaneously induce Th1, Th17 and Th2 cell activity. *Arthritis Res Ther.* 20 oct 2013;15(5):R155.

15. Kontermann RE, Brinkmann U. Bispecific antibodies. *Drug Discov Today*. juill 2015;20(7):838-47.
16. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 19 mars 1998;392(6673):245-52.
17. Tran CN, Lundy SK, Fox DA. Synovial biology and T cells in rheumatoid arthritis. *Pathophysiol Off J Int Soc Pathophysiol*. oct 2005;12(3):183-9.
18. Smolewska E, Cebula B, Brózik H, Stańczyk J. Relationship between impaired apoptosis of lymphocytes and distribution of dendritic cells in peripheral blood and synovial fluid of children with juvenile idiopathic arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. août 2008;56(4):283-9.
19. Jongbloed SL, Lebre MC, Fraser AR, Gracie JA, Sturrock RD, Tak PP, et al. Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(1):R15.
20. Richette P, Bardin T. Gout. *Lancet Lond Engl*. 23 janv 2010;375(9711):318-28.
21. Chalès G, Coiffier G, Albert J-D. Goutte. Elsevier Masson [Internet]. 3 juin 2017 [cité 28 sept 2020]; Disponible sur: <https://www-em-premium-com.proxy.scd.univ-tours.fr/article/1123955>
22. Stevens-Lapsley JE, Kohrt WM. Osteoarthritis in women: effects of estrogen, obesity and physical activity. *Womens Health Lond Engl*. juill 2010;6(4):601-15.
23. Roux C-H. Physiopathologie de l'arthrose. Elsevier Masson [Internet]. 31 janv 2019 [cité 28 sept 2020]; Disponible sur: <https://www-em-premium-com.proxy.scd.univ-tours.fr/article/1272373>
24. Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW, Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR, et al. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N Engl J Med*. 30 nov 2000;343(22):1594-602.
25. Buch MH, Bingham SJ, Bryer D, Emery P. Long-term infliximab treatment in rheumatoid arthritis: subsequent outcome of initial responders. *Rheumatol Oxf Engl*. juill 2007;46(7):1153-6.
26. Thomas R. Dendritic cells and the promise of antigen-specific therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(1):204.
27. Deveuve Q, Gouilleux-Gruart V, Thibault G, Lajoie L. [The hinge region of therapeutic antibodies: major importance of a short sequence]. *Med Sci MS*. déc 2019;35(12):1098-105.
28. Lamendour L, Deluce-Kakwata-Nkor N, Mouline C, Gouilleux-Gruart V, Velge-Roussel F. Tethering Innate Surface Receptors on Dendritic Cells: A New Avenue for Immune Tolerance Induction? *Int J Mol Sci*. 24 juill 2020;21(15).

29. Peat G, McCarney R, Croft P. Knee pain and osteoarthritis in older adults: a review of community burden and current use of primary health care. *Ann Rheum Dis.* févr 2001;60(2):91-7.
30. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol.* 21 févr 2018;120:5.1.1-5.1.11.
31. Balan S, Saxena M, Bhardwaj N. Dendritic cell subsets and locations. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2019;348:1-68.
32. Boltjes A, van Wijk F. Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation. *Front Immunol.* 2014;5:131.
33. Hügle T, Krenn V. [Histopathophysiology of Gout]. *Ther Umsch Rev Ther.* 2016;73(3):137-40.
34. Haseeb A, Haqqi TM. Immunopathogenesis of osteoarthritis. *Clin Immunol Orlando Fla.* mars 2013;146(3):185-96.
35. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 déc 2000;165(11):6037-46.
36. Mair F, Prlic M. OMIP-044: 28-color immunophenotyping of the human dendritic cell compartment. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol.* avr 2018;93(4):402-5.
37. Nizzoli G, Krietsch J, Weick A, Steinfelder S, Facciotti F, Gruarin P, et al. Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood.* 8 août 2013;122(6):932-42.
38. Nizzoli G, Larghi P, Paroni M, Crosti MC, Moro M, Neddermann P, et al. IL-10 promotes homeostatic proliferation of human CD8+ memory T cells and, when produced by CD1c+ DCs, shapes naive CD8+ T-cell priming. *Eur J Immunol.* 2016;46(7):1622-32.
39. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med.* août 1999;5(8):919-23.
40. Mathan TSM, Figdor CG, Buschow SI. Human Plasmacytoid Dendritic Cells: From Molecules to Intercellular Communication Network. *Front Immunol [Internet].* 12 nov 2013 [cité 28 avr 2021];4. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3825182/>
41. Lande R, Giacomini E, Serafini B, Rosicarelli B, Sebastiani GD, Minisola G, et al. Characterization and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in synovial fluid and tissue of patients with chronic inflammatory arthritis. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 août 2004;173(4):2815-24.
42. Cavanagh LL, Boyce A, Smith L, Padmanabha J, Filgueira L, Pietschmann P, et al. Rheumatoid arthritis synovium contains plasmacytoid dendritic cells. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(2):R230-40.

43. Cren M, Nziza N, Carbasse A, Mahe P, Dufourcq-Lopez E, Delpont M, et al. Differential Accumulation and Activation of Monocyte and Dendritic Cell Subsets in Inflamed Synovial Fluid Discriminates Between Juvenile Idiopathic Arthritis and Septic Arthritis. *Front Immunol.* 2020;11:1716.
44. Hémond C, Neel A, Heslan M, Braudeau C, Josien R. Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness. *J Leukoc Biol.* avr 2013;93(4):599-609.

Vu, les directeurs de Thèse

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop on the left and a long horizontal line extending to the right.A handwritten signature in blue ink, featuring a large loop on the left and several diagonal strokes extending to the right.

**Vu, le Doyen
De la Faculté de Médecine de Tours
Tours, le**

MAHMOUD Sara

41 pages – 1 tableau – 9 figures

Effet in vitro d'un anticorps bispécifique ciblant les cellules dendritiques sur l'inflammation dans la polyarthrite rhumatoïde.

Introduction : Les traitements utilisés actuellement dans la polyarthrite rhumatoïde (PR) agissent en aval du processus physiopathologique en bloquant l'inflammation. Un nouvel anticorps bispécifique a été développé appelé Bispecific Immunomodulator of C-type Lectine Receptor (BIC) visant les cellules dendritiques (CDs). Notre objectif était de caractériser les sous-populations de CDs présentes dans le liquide synovial (LS) de patients atteints de PR en comparaison aux patients atteints de goutte et d'arthrose afin d'étudier l'effet des BIC sur le liquide synovial.

Méthode : Nous avons mené une étude prospective et observationnelle dans le service de rhumatologie du centre hospitalier universitaire de Tours. Nous avons inclus des patients atteints de PR, d'arthrose primitive ou de goutte se présentant avec une arthrite justifiant une ponction du LS. Les données démographiques, anamnestiques et clinico-biologiques ont été recueillies à l'inclusion. Les échantillons ont été purifiés et dilués en fonction de la viscosité du LS. Les populations cellulaires ont été caractérisées par cytométrie en flux dans chacun des trois groupes. Les cytokines IL-10, IL-6, INF- γ et TNF- α ont été mesurées par méthode ELISA. Les échantillons ont été ensuite mis en culture avec les BICs et l'IL-10 a été mesuré dans le surnageant.

Résultats : Nous avons analysé le LS de 9, 8 et 7 patients atteints respectivement de PR, goutte et arthrose. Nous avons observé que les CDs étaient présentes dans le LS des patients atteints de PR où les CDs conventionnels (cDC1c et cDC141) étaient majoritaires. La proportion de CDs plasmacytoïdes était plus élevée dans le LS des patients PR en comparaison aux patients atteints de goutte et d'arthrose. Nous avons mis en évidence que les cellules activées par les BICs sécrétaient de l'IL-10 chez tous les patients testés.

Conclusion : Le LS des patients atteints de PR contient des CDs. Selon notre étude, les CDs issus du LS des patients PR produisent de l'IL-10 en présence du BIC menant à un état de tolérance immune. Ainsi, les anticorps bispécifiques ciblant les CDs pourraient représenter une stratégie intéressante pour de nouvelles thérapeutiques dans la PR.

Mots clés : polyarthrite rhumatoïde – liquide synovial – cellules dendritiques – sous-populations de CD – anticorps bispécifiques – interleukine 10

Jury :

Président du Jury : Professeur Philippe Goupille

Directeurs de thèse : Docteur Florence Velge-Roussel, Professeur Denis Mulleman

Membre du Jury : Professeur Christophe Richez

Date de soutenance : le 17 juin 2021