Etude de marqueurs biologiques prédictifs de la perte de réponse aux anti-TNF

Mélanie Rinaudo-Gaujous

▶ **To cite this version:**

Mélanie Rinaudo-Gaujous. Etude de marqueurs biologiques prédictifs de la perte de réponse aux anti-TNF. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2015. Français. NNT : 2015STET016T . tel-01629668

HAL Id: tel-01629668

https://theses.hal.science/tel-01629668

Submitted on 6 Nov 2017

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

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

Année 2015

FACULTÉ DE MÉDECINE
JACQUES LISFRANC I SAINT-ÉTIENNE

THESE

Présentée devant l'Université Jean Monnet – Saint-Etienne

Ecole Doctorale – Science, Ingénierie, Santé

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

Discipline : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Par **Mélanie Rinaudo-Gaujous**

Etude de marqueurs biologiques prédictifs de la perte de réponse aux anti-TNF

Présentée et soutenue publiquement le 26 octobre 2015

Jury :	Pr Pierre Miossec	Président du jury
	Pr Denis Mulleman	Rapporteur
	Pr Arnaud Hot	Rapporteur
	Pr Corinne Miceli	Examinatrice
	Pr Hubert Marotte	Directeur de Thèse
	Dr Stéphane Paul	Co-directeur de Thèse

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Pierre MIOSSEC

Qui me fait l'honneur de présider ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Denis MULLEMAN

Pour avoir accepté de juger cette thèse en qualité de rapporteur, du temps consacré à la lecture de ce travail.

A Monsieur le Professeur Arnaud HOT

Qui a accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je le remercie pour l'intérêt et la considération qu'il a porté à ces travaux.

A Madame le Professeur Corinne MICELI

Pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant d'examiner ce travail et de siéger parmi les membres de ce jury de thèse.

A Monsieur le Professeur Hubert MAROTTE

Qui a accepté de m'accompagner dans ce projet. Un grand merci pour l'aide que vous m'avez apporté dans la réalisation de ce travail, votre disponibilité tout au long de l'élaboration de cette thèse.

A Monsieur le Docteur Stéphane PAUL

Qui m'a aidé tout au long de ce travail, et que je remercie tout particulièrement pour sa confiance, ses conseils avisés, et l'intérêt constant qu'il a témoigné pour ce projet. Merci pour tout ce que vous m'avez transmis, permis et appris.

A mes parents, qui ont toujours été là pour me soutenir et m'encourager durant toutes ces années, quel que soit la distance. Merci pour leur soutien moral et logistique sans faille.

A mon mari, pour son soutien et sa solidarité lors de ces soirées de travail.

A ma fille, pour son sourire, ses bisous et l'émerveillement qu'elle me procure chaque jour depuis plus d'un an.

A mon frère, pour tous nos bonheurs d'enfance partagés et notre complicité, pour m'avoir appris la patience.

A ma belle-famille, pour m'avoir accueillie

A mes amis,

Gaëlle, pour toutes ces années partagées et pour toutes celles qui nous attendent

Fanny, Christophe, Marie, Hélène, Mickaël, Yann, Cathy, pour les bons moments, les encouragements et le réconfort qu'ils ont su me donner malgré la distance.

A mes confrères stéphanois,

Guillaume, mon co-thésard, pour sa motivation, ses conseils et son aide précieuse

Cyril et Paul, pour leur guidage dans les méandres de la bactériologie

Marina, mon binôme de ces années d'internat et Jean-Philippe, mon acolyte du vendredi midi

Julie, Anne, pour leur aide et leur soutien

Amélie, Pierre, Fabrice, Pauline, Caroline, Alexis, pour leur bonne humeur et leurs sourires.

Et mes confrères plus éloignés

Aline et Philippe qui ont toujours été là pour moi. Pour m'avoir aidée et supportée durant ces années de médecine.

A toute l'équipe du laboratoire d'immunologie,

Adeline, Alice, Françoise, Jocelyne, Nadine, Pascale, Peggy, Martine, Christine, Virginie

Pour leur accueil, leurs conseils et leur disponibilité

A toute l'équipe des laboratoires du LBTO et du GIMAP,

Pour m'avoir permis de réaliser mes projets

Aux chefs de service, aux biologistes et à l'ensemble du personnel du plateau de biologie du CHU de St Etienne

Je garde un souvenir précieux des années passées à vos cotés.

Table des matières

REMERCIEMENTS 3
ABREVIATIONS 9
Introduction 11
Chapitre 1: Les anti-tumor necrosis factor (TNF) 13
1.1 Place du TNF dans la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques auto-immunes 13
1.1.1Effets biologiques du TNF 13
1.1.2 Rôle du TNF dans la polyarthrite rhumatoïde 15
1.1.3 Rôle du TNF dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Fig 3) ... 16
1.2 Développement des antagonistes du TNF pour le traitement des MICI et de la PR 19
1.2.1 Caractéristiques structurales et mode d'action des antagonistes de l'anti-TNF 19
1.2.2 Mode de production 23
1.2.3 Indications 28
1.2.4 Biosimilaires 30
1.2.5 Autres approches ciblant le TNF 31
Chapitre 2 : Intérêt et limites d'un traitement par anti-TNF dans les maladies inflammatoires 35
2.1 Efficacité clinique des Anti-TNF 35
2.1.1 Infliximab (IFX) 35
2.1.2 Adalimumab 37
2.1.3 Etanercept 39
2.1.4 Certolizumab 40
2.1.3 Golimumab 42
2.2 Possibles effets secondaires liés à un traitement par anti-TNF 44
2.2.1 Immunogénicité (Fig.16) 44
2.2.2 Réactions liées à l'injection de l'anti-TNF 47
2.2.3 Infections 48
2.2.4 Tumeurs malignes et troubles lymphoprolifératifs 49
2.3 Facteurs prédictifs de non réponse aux anti-TNF 49
2.3.1 Facteurs prédictifs identifiés dans la rectocolite hémorragique 49
2.3.2 Facteurs prédictifs identifiés dans la maladie de Crohn 52
2.3.3 Facteurs prédictifs identifiés dans la polyarthrite rhumatoïde 56
Chapitre 3 : Rôle du microbiote intestinal dans la physiopathologie des MICI 65

3.1 Rôle de la perméabilité intestinale dans les MICI 65
3.1.1 Structure et fonction de la barrière intestinale (Fig.24) 66
3.1.2 Anomalies de la barrière intestinale dans les MICI (Fig.26) 68
3.1.3 Augmentation de la perméabilité intestinale et auto-immunité 71
3.2 Immunisation anti-agents infectieux dans les MICI 75
3.2.1 Les Ac anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA) 75
3.2.2 Les Ac anti-antigènes microbiens 75
Chapitre 4 : Rôle du microbiote oral dans la physiopathologie de la PR 79
4.1 Parodontopathie et polyarthrite rhumatoïde (PR) 79
4.1.1 Définition, diagnostic et épidémiologie de la parodontopathie 80
4.1.2 Facteur bactérien dans la maladie parodontale 81
4.1.3 Parodontopathie et maladies systémiques 83
4.1.4 Lien entre la parodontopathie et la PR 88
4.2 Rôle de *Porphyromonas gingivalis* dans l'induction de l'auto-immunité 90
4.2.1 Caractéristiques du pathogène *PG* 90
4.2.1.1 Description morphologique et épidémiologique (Fig.36) 90
4.2.1.Facteurs de virulence 92
4.2.2 Rupture de tolérance dans la PR 96
Présentation du projet de recherche 101
Partie 1 : Rôle de l'immunogénicité des anti-TNF dans la perte de réponse au traitement 105
Résultats 1 : Immunogénicité et réponse clinique chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) 109
Introduction 109
Articles 111
Résultats et discussion 169
Résultats 2 : Immunogénicité et réponse clinique chez des patients atteints de Polyarthrite Rhumatoïde 173
Introduction 173
Article 175
Résultats et discussion 193
Partie 2 : Implication d'un facteur bactérien dans la résistance au traitement par anti-TNF 195
Résultats 1 : Etude des marqueurs bactériens et de leur évolution chez des patients atteints de MICI traités par infliximab 195
Introduction 195

Article 197
Résultats et discussion 207
Résultats 2 : Implication de *Porphyromonas gingivalis* dans la PR et dans son traitement 209
Introduction 209
Article 211
Résultats et discussion 243
Perspectives 245
Conclusion et perspectives 251
1. Résumé des objectifs et résultats obtenus 251
2. Etudes complémentaires liées à l'immunogénicité 252
Références 255
ANNEXES 316

ABREVIATIONS

ADA : anticorps anti-médicament

ADCC : cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps

ANCA : anticorps anti-cytoplasme des neutrophils

AOL : appel d'offre local

ASCA : anticorps anti-Saccharomyces cerevisiæ

CDC : cytotoxicité dépendante du complément

CDR : complementary determining regions

CRP : C-reactive protein

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

HLA : human leukocyte antigen

IDR : intradermo reaction

IFN : interferon

IFX : infliximab

Ig : immunoglobuline

IL : interleukine

LPS : lipopolysaccharide

MC : maladie de Crohn

MICI : maladie inflammatoire chronique de l'intestin

MMP : metalloprotéinase matricielle

PAD : peptidylarginine déaminase

PBMC : peripheral blood mononuclear cell

PEA : pellicule exogène acquise

PEG : polyéthylène glycol

PG : porphyromonas gingivalis

PPAD : peptidylarginine déaminase bactérienne

PR: polyarthrite rhumatoïde

RCH : Rectocolite hémorragique

TLR : Toll-like receptor

TNF : Tumor necrosis factor

Introduction

Les anticorps anti-Tumor Necrosis Factor alpha (TNF) constituent une avancée thérapeutique spectaculaire dans le traitement de certaines maladies inflammatoires chroniques, comme la polyarthrite rhumatoïde (PR) et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Néanmoins environ 25 % des patients présentent une réponse incomplète à des doses standard, justifiant l'adaptation des posologies suivant des modalités qui restent pour l'instant encore mal définies. Les effets secondaires potentiels ainsi que le coût du traitement sont à prendre en considération. Un outil permettant d'identifier « a priori » un patient susceptible d'être bon ou mauvais répondeur serait extrêmement utile. L'identification de facteurs prédictifs de réponse aux anticorps anti-TNF nécessite une connaissance des mécanismes de régulation du TNF, son rôle dans la physiopathologie de ces maladies ainsi que les facteurs pouvant perpétuer sa production.

Ainsi, cete introduction va être divisée en 4 chapitres permettant d'appréhender les différents facteurs prédictifs sur lesquels s'est focalisé mon travail de thèse.

- Le premier chapitre sera consacré à décrire l'importance du TNF dans les 2 familles de pathologies inflammatoires que sont la PR et les MICI. Une fois l'intérêt de son blocage démontré, l'ingénierie des anti-TNF et les différentes molécules développées seront exposées.

- Le deuxième chapitre rassemblera les résultats des essais montrant l'efficacité clinique des anti-TNF ayant reçu l'autorisation de mise sur le marché pour ces 2 indications, ainsi que les principaux effets secondaires rencontrés. Les différentes pistes déjà explorées pour la recherche de facteurs prédictifs de réponse au traitement seront présentées.

- Le troisième chapitre ciblera le rôle du microbiote intestinal dans la physiopathologie des MICI, le TNF étant sécrété physiologiquement en réponse à une agression infectieuse. Une synthèse des marqueurs biologiques d'immunisation bactérienne dans les MICI et l'intérêt de leur dosage seront exposés.

- Enfin, le quatrième chapitre sera dédié au rôle du microbiote oral dans la physiopathologie de la PR. Plus précisément, les spécificités d'une bactérie en partie responsable de la parodontopathie, *porphyromonas gingivalis* (PG), seront décrites et son rôle potentiel dans le déclenchement de la PR détaillé.

Chapitre 1: Les anti-tumor necrosis factor (TNF)

1.1 Place du TNF dans la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques auto-immunes

Le TNF a été pour la première fois identifié en 1975 comme un facteur sanguin produit par l'organisme en réponse à des endotoxines et responsable d'une toxicité tumorale dans un modèle murin de sarcome[1]. Cette substance plasmatique a été initialement caractérisée comme une glycoprotéine produite spécifiquement par les macrophages activés. Depuis sa découverte, le TNF s'est révélé être en fait une puissante cytokine pro-inflammatoire au centre de la régulation de la réaction inflammatoire de l'organisme.

1.1.1Effets biologiques du TNF

Le TNF est majoritairement produit par les lymphocytes T et les macrophages activés sous forme de pro-TNF lié à la membrane plasmatique. Cette forme transmembranaire du TNF peut aboutir à une forme soluble au niveau du domaine extracellulaire, après clivage par la métalloprotéinase ADAM-17 (TACE). Il y a ainsi 2 formes de TNF qui sont actives sous forme trimérique[2].

L'action du TNF passe par sa liaison à un de ses 2 récepteurs : TNFR1 (également nommé p55) et TNFR2 (p75). L'effet du TNF sur l'inflammation et l'apoptose dépend principalement de son interaction avec le récepteur TNFR-1, provoquant une cascade d'activation intracellulaire et plus précisément l'activation des facteurs de transcription NF-κB et AP (Fig 1). Ces facteurs de transcription régulent de nombreux gènes liés à la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, IL-2…), mais également ceux liés à la synthèse de molécules d'adhésion cellulaires (VCAM-1, ICAM-1...), de facteurs de croissance cellulaire comme le GM-CSF ou bien encore des régulateurs de l'apoptose[3]. Le TNF participe ainsi au recrutement des différentes populations lymphocytaires indépendamment de la reconnaissance de l'antigène, à une vasodilatation locale par stimulation de la cyclooxygénase-2[4] et à une augmentation de la perméabilité vasculaire entrainant un œdème par passage trans-endothélial de plasma. La vasodilatation et l'œdème correspondent à la triade de la réaction inflammatoire, rougeur, chaleur et tumeur. Le récepteur TNFR-2, quant à lui, pourrait plutôt contribuer à la réparation tissulaire et à l'angiogenèse, mais son rôle est moins bien défini. La transduction du signal par le récepteur TNFR-2 pourrait jouer un rôle critique dans la stabilité fonctionnelle des lymphocytes T régulateurs ($CD4^+FOXP3^+$) et ainsi limiter l'étendue de la réaction inflammatoire et la destruction tissulaire du patient[5].

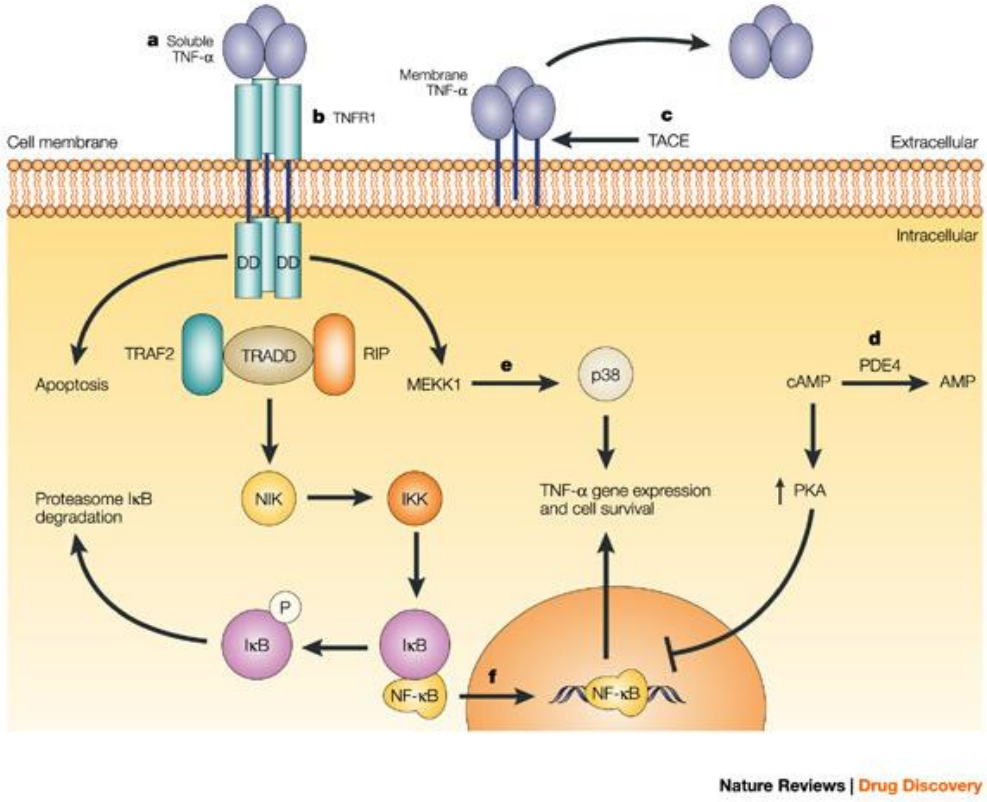


Figure 1: Voies de signalisation cellulaire induite par le TNF d'après Palladino et al.[6]
cAMP, cyclic AMP; DD, death domain; IκB, inhibitor of NF-κB; IKK, IκB kinase; MEKK1, mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1; NF-κB, nuclear factor-κB; NIK, NF-κB-inducing kinase; PDE4, phosphodiesterase 4; PKA, protein kinase A; RIP, receptor-interacting protein; TACE, TNF-α-coverting enzyme; TNF-α, tumour-necrosis factor-α; TNFR1,TNF-α receptor 1; TRADD, TNFR1-associated death-domain-containing protein; TRAF2, TNFR-associated factor 2.

L'un des rôles prépondérants du TNF réside dans sa participation à la défense de l'organisme contre les pathogènes, qu'ils soient d'origine bactérienne, virale ou parasitaire. En effet, le TNF n'est pas détectable dans le sérum de sujets sains, mais un taux élevé a été retrouvé lors de processus inflammatoires[7] ou infectieux[8], avec une corrélation entre le taux de TNF et la gravité de l'infection[9]. A l'aide de souris déficientes en TNF, il a été démontré que le TNF était indispensable à la survie à certaines infections bactériennes[10] secondaires à *Listeria monocytogens*[11], *Mycobacterium tuberculosis*[12], *M. avium, Salmonella typhimurium,* à des parasitoses intra-cellulaires comme la *Leishmania major* ou *Trypanosoma cruzi,* et à certaines viroses notamment liées à l'herpès simplex virus (HSV-1)[13] ou le cytomegalovirus (CMV)[14].

Bien que le rôle du TNF soit important dans la défense de l'hôte, sa production excessive et inappropriée au cours de la physiopathologie de certaines maladies autoimmunes peut être nocive et responsable de dégâts tissulaires. Ces maladies sont engendrées par un déséquilibre de la balance entre les cytokines pro-inflammatoires surexprimées et anti-inflammatoires sous-exprimées aboutissant à une inflammation chronique. Ce projet de thèse se focalisera plus précisément sur 2 familles de maladies auto-immunes où le TNF joue un rôle

prépondérant: la polyarthrite rhumatoïde (PR) et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).

1.1.2 Rôle du TNF dans la polyarthrite rhumatoïde

Les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle pathogénique clé sur les processus d'inflammation, de prolifération synoviale et de destruction du cartilage. L'interleukine-1 (IL-1) a été la première cytokine décrite dans le liquide synovial de patient atteint de PR et associée à la dégradation du cartilage *in vitro*[15,16]. De manière similaire, des taux élevés de TNF ont été rapidement corrélés avec une dégradation du cartilage *in vitro*[17]. Il existe ainsi dans l'articulation rhumatoïde un déséquilibre entre les cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF, l'IL-1 et l'IL-6[18] présentes en excès, et les cytokines à action anti-inflammatoire représentées par l'IL-10, l'IL-4 et l'IL-13, les récepteurs solubles du TNF et l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 en quantité insuffisante et ne pouvant bloquer l'action des premières. De nombreuses études *in vitro* ou *in vivo* ont confirmé le rôle prédominant du TNF dans l'inflammation articulaire de la PR. D'un point de vue clinique, des concentrations plus élevées de TNF ont été mises en évidence chez des patients PR en comparaison avec des sujets sains. De plus, la sévérité de la PR est corrélée avec les taux de TNF chez ces patients[18]. Le TNF a été identifié dans la membrane synoviale des articulations touchées et plus particulièrement au niveau de la jonction entre le pannus et le cartilage[19]. Enfin, les synoviocytes prélevés chez des patients PR produisent spontanément du TNF en culture[20].

Au niveau physiopathologique, le TNF peut promouvoir la résorption de l'os et du cartilage[17,21] (Fig 2). La résorption osseuse est en fait liée à l'action des ostéoclastes qui sont des cellules multinucléées formées par fusion de précurseurs mononuclées sous l'influence de plusieurs facteurs, et dont le pôle basal au contact de l'os sécrète des enzymes capables de détruire la matrice osseuse minéralisée. En effet, de nombreux ostéoclastes sont retrouvés accumulés au niveau du tissu synovial des articulations présentant une inflammation chronique. La différenciation en ostéoclaste nécessite la présence du « Macrophage Colony Stimulating Factor » (M-CSF) mais résulte aussi de l'interaction de RANK avec son ligand (RANKL)[22]. Le TNF fait partie des cytokines pro-inflammatoires pouvant augmenter l'expression de RANKL et du M-CSF et ainsi promouvoir l'activité et le développement des ostéoclastes[23]. A l'inverse, la formation osseuse par les ostéoblastes est presque inexistante chez les patients PR. L'action des cytokines est là aussi importante puisque le TNF va inhiber la formation des ostéoblastes en augmentant le facteur dickkopf homologue 1 (DKK1) qui agit en inhibant la protéine Wnt qui est nécessaire à la différenciation de ce type cellulaire[24]. Le TNF va donc participer au déséquilibre entre la formation et la résorption osseuse physiologique entraînant l'apparition de lacunes d'érosions osseuses juxta-articulaires[25]. La dégradation du cartilage apparaît lors de l'activation des synoviocytes et des chondrocytes avec relargage dans le liquide synovial de métalloprotéinases (MMPs)[26] dont la production est stimulée par le TNF. Cette famille d'enzymes permet la dégradation des différents composants de la matrice extracellulaire, à savoir les protéoglycanes, le collagène, l'élastine, la fibronectine, la gélatine et la laminine[27]. En effet, certaines MMPs (MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-13) sont retrouvées à des taux plus élevés dans le sérum[28] mais aussi au niveau du liquide synovial[29] de patients présentant une PR. La MMP-3 a été particulièrement

mise en avant dans la destruction articulaire par sa capacité à dégrader elle-même de nombreux composants présents au niveau articulaire mais aussi par sa faculté à activer les pro-MMPs 1, 7, 8, 9, 13 qui vont être responsable de la dégradation du collagène de type II qui est prépondérant dans le cartilage[30]. D'ailleurs, les taux de MMP-3 sont plus élevés chez les patients PR évoluant vers une destruction articulaire clinique[31] ou radiologique[32].

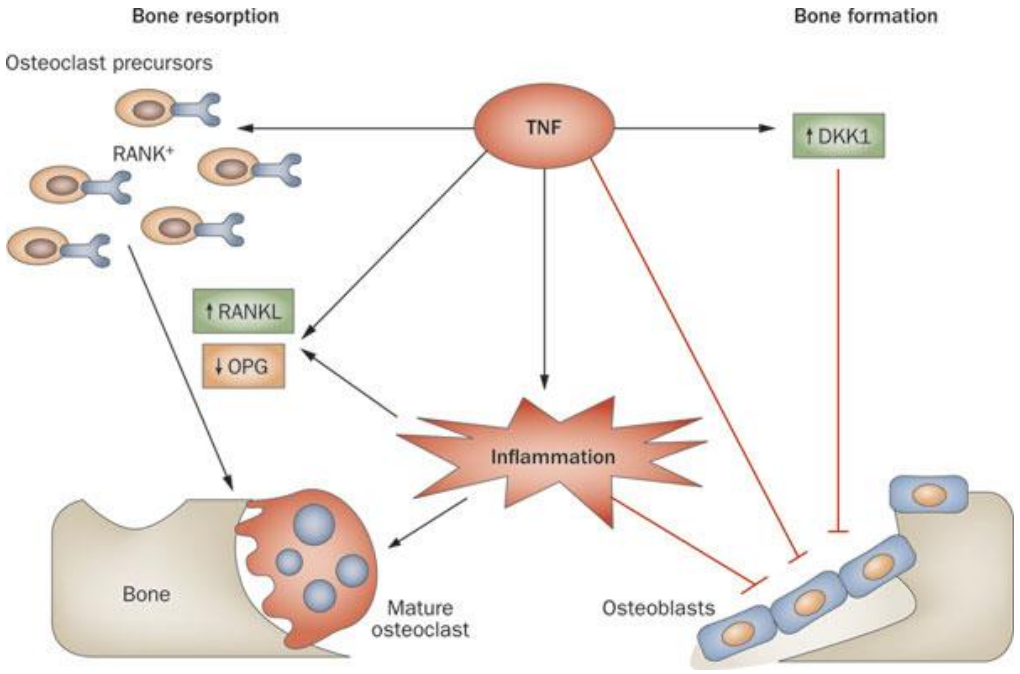


Figure 2: Rôle du TNF dans la perte osseuse de la PR d'après Gravellese *et al*[33]. *DKK1, Dickkopf-1; OPG, osteoprotegerin (TNF receptor superfamily member 11B); RANK, receptor activator of nuclear factor κB; RANKL, RANK ligand.*

De plus, le TNF aurait un rôle dans la fibrose et faciliterait l'infiltration des cellules inflammatoires en augmentant l'adhésion des neutrophiles et des lymphocytes aux cellules endothéliales[34,35]. Le rôle clé du TNF dans la PR a été confirmé grâce à des modèles animaux. En effet, des souris modifiées génétiquement afin de surexprimer le TNF développent spontanément une polyarthrite comparable à la PR d'un point de vue clinique et histologique[36]. A l'inverse, dans un modèle murin d'arthrite à collagène, le blocage du TNF s'est révélé efficace pour réduire l'activité de la maladie[37,38]. En utilisant des anticorps anti-TNF neutralisants sur des cultures cellulaires de synoviocytes, la synthèse d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6 ou le GM-CSF a également été inhibée[39,40]. Il ressort ainsi de ces études que le TNF peut être considéré comme un facteur agissant au début de la cascade de cytokines pro-inflammatoires synthétisée dans les processus inflammatoires et que son blocage pourrait être intéressant dans le traitement de la PR[41].

1.1.3 Rôle du TNF dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Fig 3)

Le TNF est connu depuis plusieurs années pour être augmenté dans le sérum de patients atteints de MICI, que ça soit la MC ou la RCH[42]. Cette élévation est prépondérante lorsque la maladie est en poussée, avec une corrélation entre le taux de TNF sérique et l'activité de la MC[43]. De plus, le gène TNF est fortement surexprimé dans les biopsies de colon prélevées sur

des patients atteints de RCH ou MC[44] en comparaison avec des sujets sains, notamment pour les patients présentant une activité modérée ou sévère de la pathologie. Cette surexpression est corrélée avec le score clinique mais aussi endoscopique d'activité de la maladie[45]. Les lymphocytes T et les macrophages situés dans la *lamina propria* sont présents en plus grand nombre dans les MICI et seraient responsables de la production excessive de TNF[45].

Le TNF conduit à des effets pro-inflammatoires pléiotropiques incluant une augmentation de l'angiogenèse, l'induction de l'apoptose des cellules de Paneth par nécroptose, la production de MMPs par les myofibroblastes, l'activation des macrophages et des lymphocytes T effecteurs mais également une détérioration des cellules épithéliales intestinales[46]. En effet, plusieurs études ont montré que le TNF pouvait contribuer à l'altération de la barrière intestinale, ce qui permettrait aux pathogènes situés dans la lumière intestinale de pénétrer dans la muqueuse intestinale. Dans une culture cellulaire de Caco-2 mimant le système épithélial *in vitro*, la présence de TNF produit une augmentation temps et concentration-dépendante de la perméabilité des jonctions serrées. Cette augmentation est accompagnée d'une diminution des protéines *zonula occludens* -1 (ZO-1) avec une anomalie de leur localisation. Le mécanisme d'action passerait par l'activation du facteur de transcription NFκB[47]. Plus récemment, d'autres protéines impliquées dans les jonctions serrées ou adhérentes ont été étudiées. Une redistribution de ZO-1 mais aussi des occludines, claudines, E-cadhérines a été montrée au profit des membranes basolatérales des cellules épithéliales intestinales[48]. Ces jonctions serrées sont rattachées à un anneau de filaments d'actine et d'actomyosine péri-jonctionnel. La contraction de cet anneau est provoquée par la phosphorylation de la chaîne légère régulatrice de la myosine de type II (MLC) par la « Myosine Light Chain Kinase » (MLCK) et permet ainsi une régulation du transport paracellulaire par la jonction serrée[49]. L'expression de la MLCK est élevée dans l'épithélium iléal et colique de patients présentant une MC ou une RCH, avec une corrélation entre son expression et l'activité de la maladie évaluée par un score histologique. Il en résulte une augmentation de la phosphorylation de la MLC mise en évidence sur les biopsies de colons issus de patients présentant une maladie active[50]. La relation entre MLCK et perméabilité intestinale est renforcée par un modèle *in vi*tro de Caco-2 où une stimulation par du TNF et de l'IFNγ provoque une diminution de 22% de la résistance trans-épithéliale avec une augmentation de la phosphorylation de la MLC de plus de 170%. A l'inverse, un traitement par inhibiteur de la MLCK normalise partiellement la phosphorylation de la MLC dans ce modèle mais permet alors la restauration complète de la résistance trans-épithéliale[51]. Enfin, chez des souris présentant une diarrhée suite à l'activation lymphocytaire T avec élévation du TNF, une augmentation de la phosphorylation de la MLC est observée quelques heures après l'injection d'un anticorps anti-CD3. Cette phosphorylation est TNF dépendante puisqu'un traitement supplémentaire par un anticorps anti-TNF empêche cette modification enzymatique. L'élévation puis la normalisation de la MLC phosphorylée dans ce modèle est parallèle à l'apparition et la résolution de la diarrhée, liant les symptômes cliniques et le mécanisme physiologique sous-jacent[52].

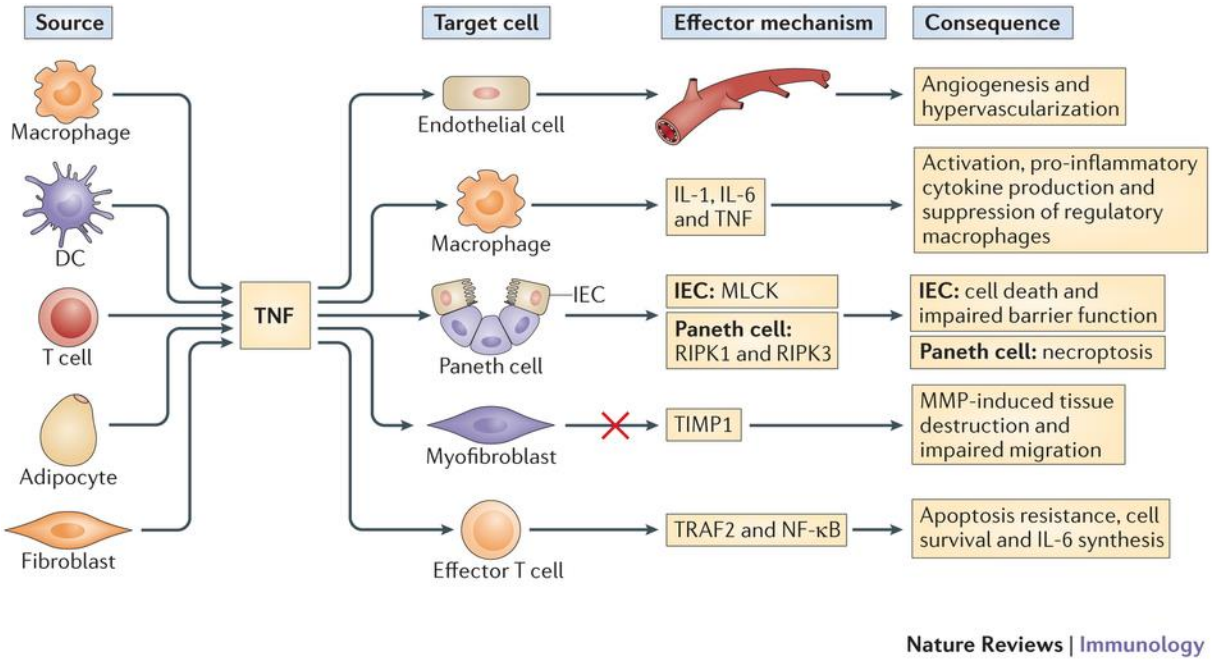


Figure 3: Rôle central du TNF dans la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, d'après Neurath MF[46]. *IL, interleukin; MLCK, myosin light chain kinase; RIPK, receptor-interacting protein kinase; TIMP1, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1.*

Des anomalies concernant les récepteurs du TNF sont aussi impliquées dans les MICI. En effet, l'activité de la maladie (MC et RCH) est corrélée avec la concentration sérique des récepteurs solubles TNF-R1 et TNF-R2. Dans la MC uniquement, les patients présentant un taux élevé de TNF-R2 évoluent vers une forme compliquée de la maladie[53]. Une surexpression du TNF-R2 a été montrée au niveau des cellules épithéliales coliques dans les 2 formes de MICI[54], ainsi qu'au niveau des lymphocytes $TCD4^+$ de la *lamina propria* intestinale et des lymphocytes T périphériques chez des patients présentant une MC[55]. Des modèles murins de colite induite par l'activation lymphocytaire T et le relargage de TNF ont été développés grâce l'administration d'anticorps anti-CD3. Des modèles réalisés sur des lignées de souris déficientes en récepteurs au TNF ont permis de montrer que le TNF induisait une apoptose des cellules épithéliales par son interaction avec le TNF-R1 et TNF-R2, ce qui engendre une augmentation de la perméabilité intestinale. Ce mécanisme passerait par la production de la forme inductible de l'oxyde nitrique synthétase (iNOS) qui conduirait à la surexpression de la protéine pro-apoptotique p53[56].

L'importance du TNF dans les MICI a été confirmée par un modèle murin de colite médiée par le transfert d'une sous-population lymphocytaire T (TCD4+ $CD45RB^{haut}$) chez des souris immunodéficiences, pour lequel un traitement neutralisant les formes transmembranaire et soluble du TNF a permis de mettre les souris en rémission. Il est intéressant de noter que le seul blocage de la forme soluble du TNF n'a pas engendré de rémission dans ce modèle animal[57]. En effet, seule la neutralisation du TNF transmembranaire induit l'apoptose des lymphocytes T. A l'inverse, une activation du TNF-R2 sur les lymphocytes T, uniquement générée par le TNF transmembranaire, aggrave l'activité de la colite[58]. Cette constatation se retrouve au niveau clinique puisque les traitements ne ciblant que la forme soluble du TNF comme l'Etanercept n'ont pas d'action bénéfique sur les patients présentant une MICI.

1.2 Développement des antagonistes du TNF pour le traitement des MICI et de la PR

Etant donné l'importance du TNF dans la physiopathologie des maladies inflammatoires qu'elles soient rhumatologiques ou digestives, plusieurs molécules dont le but est de bloquer l'action de cette cytokine ont été développées et ont reçu l'autorisation de mise sur le marché à ce jour : l'infliximab, ses biosimilaires Inflectra et Remsisa, l'adalimumab, l'étanercept, le certolizumab et le golimumab. Leur utilisation a clairement modifié la prise en charge thérapeutique des patients permettant une rémission clinique plus longue, associée à une diminution des complications nécessitant une chirurgie ou une hospitalisation. Leurs caractéristiques structurales, leurs modes d'action et leurs indications peuvent être cependant différents. Leur prescription se fait généralement en association avec le traitement de fond non biologique dont l'efficacité est parfois insuffisante pour permettre la rémission clinique. Les caractéristiques des principales molécules sont exposées ci-après.

Nom du traitement	Indications rhumatismales ou gastro-entérologiques	Mode d'action	Effets secondaires
Méthotrexate	PR	Anti-métabolites Blocage du cycle des folates inhibition de la synthèse d'ADN	Myélosuppression, troubles gastro-intestinaux, hépato-biliaires, respiratoires, cutanées, rénaux,
Azathioprine	MC, RCH	Cytotoxicité (cassures chromosomiques) Blocage synthèse ADN	Toxicité hépatique et médullaire, troubles gastro-intestinaux, hépato-biliaires,
6 mercaptopurine	MC, RCH	Anti-métabolites. Inhibe la synthèse de l'ADN	Myélosuppression, troubles gastro-intestinaux, hépato-biliaires
Sulfasalazine	PR, MC, RCH	Inhibe l'acide arachidonique	Troubles hématologiques, cutanées, hypersensibilité, photosensibilité, atteintes hépato-biliaires et rénales

Figure 4: Caractéristiques des principaux traitements de fond utilisés dans la PR ou les MICI.

1.2.1 Caractéristiques structurales et mode d'action des antagonistes de l'anti-TNF

1.2.1.1 Généralités sur la structure et la fonction des anticorps (Fig. 5)

Les anticorps sont des immunoglobulines formées de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes (H, heavy) et deux chaînes légères (L, light) kappa ou lambda qui sont reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures assurant une flexibilité de la molécule. Il existe cinq types de chaînes lourdes, désignées par les lettres grecques γ (gamma),α (alpha), μ (mu), δ (delta), ε (epsilon) qui définissent les cinq classes d'immunoglobulines,

respectivement IgG, IgA, IgM, IgD, et IgE. Certaines classes sont divisées en sous classes comme pour les IgG (IgG1 à IgG4) et les IgA (IgA1 et IgA2).
Les chaînes des IgG forment une structure en Y. La région au niveau de laquelle les bras de la structure d'anticorps sont en forme de Y est appelée « charnière » car c'est à ce niveau que la molécule présente un certain degré de flexibilité. Pour un anticorps donné, les deux chaînes lourdes sont identiques, de même pour les deux chaînes légères. Les chaînes lourdes sont composées de domaines constants (CH1, CH2, CH3 voire CH4) et d'un domaine variable (VH). Les chaînes légères ont un domaine constant (CL) et un domaine variable (VL). L'association est telle que les domaines VH et VL sont appariés de même que les domaines CH1 et CL. On appelle Fab (Fragment antibody) l'association entre les domaines VH-VL-CH1-CL. Chaque monomère d'immunoglobuline comporte donc deux Fab. Les domaines VL et VH sont appelés domaines variables, ce sont eux qui lient l'antigène. Chaque domaine variable possède trois boucles hypervariables appelées CDR (régions déterminantes de complémentarités, complementary determining regions) qui se caractérisent par une très grande variabilité en acides aminés d'un anticorps à un autre. Les CDR constituent le site de combinaison antigénique[59].
La base de l'Y contient la région Fc, fragment cristallisable, impliquée dans la fixation de la molécule à des récepteurs cellulaires FcR et à la fixation du complément.

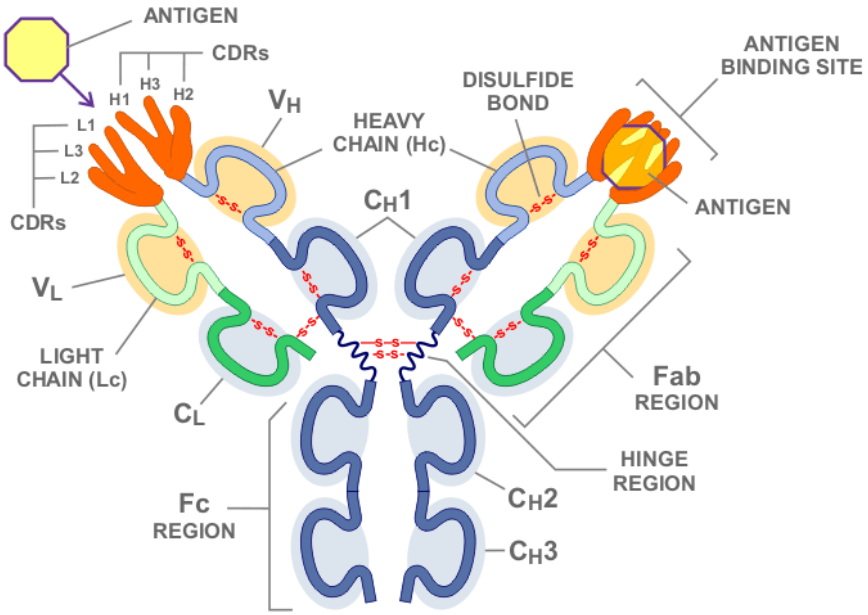


Figure 5: Structure générale d'une immunoglobuline IgG

Plusieurs fonctions peuvent être ainsi générées par les anticorps *via* le Fc:

- L'opsonisation des pathogènes : recouvrement des microorganismes par des anticorps permettant leur phagocytose
- La cytotoxicité dépendante des anticorps (CDC) : les anticorps fixés sur leur antigène peuvent activer la voie classique du complément. Si l'activation de ce système va à son terme, la formation du complexe d'attaque membranaire conduit à la lyse de la cellule sur laquelle se sont initialement fixés les anticorps
- La cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) : le fragment Fc peut interagir avec les FcR présents sur les cellules NK, les monocytes/macrophages ou les

polynucléaires et activer ces dernières pour détruire la cellule cible. Ainsi, les cellules NK expriment le récepteur FcγRIII (CD16) qui reconnaît les IgG1 et les IgG3. Le mécanisme de lyse des cellules NK est identique à celui des cellules T CD8+ cytotoxiques et implique le système perforine-granzyme.

La fraction Fab est bien sûr responsable de la reconnaissance de l'antigène mais peut avoir certaines fonctions effectrices de ce fait : la neutralisation de toxines bactériennes, l'inhibition de l'adhésion bactérienne aux surfaces cellulaires et le blocage de l'infectiosité des virus[60].

1.2.1.2 Caractéristiques des antagonistes du TNF

- L'infliximab (Remicade)

Il s'agit d'un anticorps monoclonal chimérique composé d'une région constante IgG1 humain pouvant fixer le complément et d'une région variable d'origine murine responsable de la liaison avec l'antigène[61]. L'infliximab est connu pour sa capacité à neutraliser l'activité fonctionnelle du TNF en se liant à la forme soluble et transmembranaire du TNF avec une grande affinité. Il empêche ainsi l'interaction du TNF avec ses récepteurs cellulaires en formant des complexes stables infliximab-TNF. Au niveau de sa structure, ce complexe est composé d'une molécule trimérique de TNF lié de manière symétrique par 3 molécules Fab d'infliximab[62]. Cet anti-TNF n'interagit pas avec la lymphotoxine α (TNFβ), ce qui rend sa liaison spécifique au TNF. Son catabolisme passe par un mécanisme d'opsonisation via le système réticulo-endoplasmique.

- L'adalimumab (Humira)

L'adalimumab a été le premier anticorps monoclonal de type IgG1 entièrement humain dirigé contre le TNF disponible sur le marché. Cet anticorps est indiscernable en structure et en fonction d'une IgG1 naturelle et présente une demi-vie comparable, à savoir environ 2 semaines[63]. Il possède une grande affinité et spécificité pour le TNF puisqu'il ne se lie pas à d'autres cytokines, et exerce son effet thérapeutique en bloquant l'interaction entre le TNF et ses 2 récepteurs TNF-R1 et TNF-R2[64]. L'adalimumab a la faculté d'induire la lyse, *in vitro*, des cellules exprimant à leur surface le TNF en présence de complément ainsi que de moduler les réponses biologiques induites ou régulées par le TNF, notamment le taux de molécules d'adhésions responsables de la migration leucocytaire (ELAM-1, ICAM-1, VCAM-1)[65].

- **Le certolizumab pegol (Cimzia)**

Cet anticorps est constitué d'un fragment Fab' d'anticorps humanisé recombinant, dirigé contre le TNF, conjugué à du polyéthylène glycol (PEG). Le PEG est un polyéther synthétique largement utilisé pour augmenter la taille moléculaire des protéines thérapeutiques et réduire ainsi leur filtration au niveau rénal. Il améliore la pharmacocinétique et la biodisponibilité des médicaments[66]. Il a été démontré que cette PEGylation augmentait la demi-vie de la fraction Fab circulante, ce qui permettait d'espacer les doses de Certolizumab de 2 semaines[67]. Le certolizumab pegol se lie et neutralise les 2 formes du TNF et inhibe les voies de signalisation passant par les récepteurs TNFR1 et TNFR2 *in vitro*. La particularité de

cet anti-TNF est son absence de fraction constante (Fc), ce qui limite potentiellement certains effets comme la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) ou la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps. A l'inverse des autres anti-TNF, le certolizumab pegol n'engendre pas l'apoptose des lymphocytes périphériques activés *in vitro* et inhibe presque complètement la sécrétion d'IL-1 induite par du LPS sur des monocytes[68]. L'absence de fraction Fc pourrait également jouer un rôle sur le passage transplacentaire de l'anti-TNF au cours de la grossesse[69]. Aucun risque pour le fœtus n'a été relevé sur des essais animaux mais peu de données chez l'humain peuvent confirmer son innocuité. En effet, un cas a d'abord été décrit d'une femme de 22 ans ayant reçu du certolizumab pour le traitement d'une maladie de Crohn pendant son 2ème et 3ème trimestre de grossesse sans qu'aucune anomalie du nouveau-né n'ait été notée. Le taux de certolizumab dans le sang du cordon était beaucoup plus faible que dans le taux maternel[70]. Ces données ont été confirmées sur une cohorte plus large de 10 patientes présentant une MICI[69].

- **Le golimumab (Simponi)**

La golimumab est un anticorps de type IgG1 entièrement humain mis sur le marché en 2009. Cette protéine de 150 kilodaltons possède de multiples glycoformes et se lie avec une grande affinité aux formes bioactives solubles et transmembranaires du TNF[71]. Il forme des complexes stables empêchant le TNF de se fixer à ses récepteurs. Le golimumab ne se lie pas à la lymphotoxine humaine ni ne la neutralise. Comme d'autres anticorps humains IgG1, le golimumab peut se lier aux récepteurs Fc et déclencher l'activation du complément. Toutefois, après l'ajout de complément ou de cellules effectrices, aucune lyse cellulaire médiée par le golimumab de monocytes humains stimulés par du LPS n'a été observée. Par ailleurs, aucune apoptose induite par le golimumab n'a été détectée dans les cellules mononuclées de sang périphérique humain stimulées par du LPS[72].

- L'étanercept (Enbrel)

Cet antagoniste du TNF est une protéine de fusion dimérique, soluble, entièrement humaine, composée de 2 copies du domaine extracellulaire du récepteur TNF-R2 liées à la fraction constante d'une immunoglobuline humaine de type IgG1. Les domaines CH2 et CH3 ainsi que la région charnière de la portion Fc de l'IgG1 sont présents mais non le domaine CH1. De par sa nature dimérique, chaque molécule peut se lier à 2 molécules de TNF. Sa structure le rend 50 à 1000 fois plus puissant pour lier le TNF que son récepteur soluble monomérique endogène[73,74]. Malgré la présence d'une fraction Fc, l'étanercept n'induit pas ou peu de CDC et d'ADCC *in vitro*. Contrairement aux autres anti-TNF, il peut se lier aux membres de la famille des lymphotoxines (LT) en plus du TNF, avec une affinité plus grande pour le LTα3, à l'instar du récepteur TNFR2 originel[75].

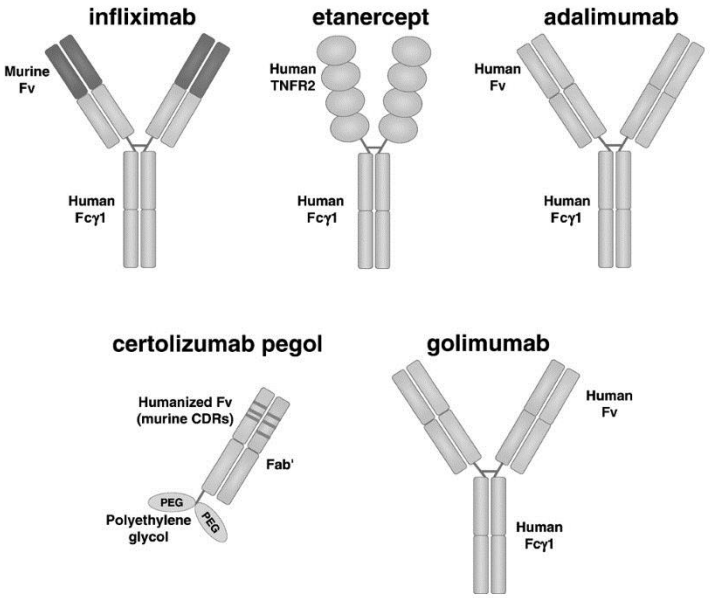


Figure 6: Structure des molécules anti-TNFα disponibles pour le traitement des maladies inflammatoires, d'après Keystone *et al*[76]. (*Gris foncé : partie murine)*

Même si ces molécules ont une cible commune, leur structure est bien différente (Fig.6) et engendre des variations pharmacocinétiques à prendre en compte lors de la sélection d'un médicament. En effet, la demi-vie des traitements va conditionner leur fréquence d'administration, avec une fréquence augmentée pour les demi-vies courtes comme l'Etanercept. Les propriétés pharmacocinétiques de ces différents antagonistes du TNF sont résumées dans le tableau ci-après.

TNF Inhibitor	Onset time	Half-life	Time-to-peak effect
Adalimumab	–	~2 weeks	~131 h
Certolizumab pegol	–	~14 days	54–171 h
Golimumab	–	~14 days	2–6 days
Infliximab	~2 weeks, Crohn's disease	7–12 days	–
Etanercept	~2–3 weeks; RA: 1–2 weeks	3–5 days	35–103 h

Figure 7: Paramètres pharmacocinétiques des 5 anti-TNF originaux ayant l'AMM[77].

1.2.2 Mode de production

1.2.2.1 Techniques employées pour le développement des anticorps thérapeutiques

La synthèse d'anticorps monoclonaux a d'abord débuté par la technique des hybridomes. Le principe général de la production d'hybridome repose sur la fusion de lymphocytes B de type murins par exemple, sécrétant des anticorps mais ne se multipliant pas *in vitro,* avec des cellules de myélomes lymphoïdes ayant la capacité de se multiplier rapidement et indéfiniment *in vitro* dans un milieu de culture. Cette technique a été mise au point par Georges Kohler et Cesar Milstein en 1975 et a permis la synthèse en grande quantité d'anticorps monoclonaux de première génération d'originemurine[78]. Ces premiers anticorps monoclonaux furent décevants sur le plan clinique puisque seul l'OKT3 (anti-CD3) s'est révélé performant pour prévenir le rejet de greffe. Ces anticorps murins étaient notamment

éliminés rapidement par l'organisme en raison d'une induction d'anticorps humains anti-anticorps murins (ou HAMA). Afin de réduire l'immunogénicité de ces anticorps, des anticorps chimériques ont été développés dans lesquels les régions constantes des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines murines sont remplacées par des régions constantes humaines. En effet, la région constante et la région variable d'un anticorps sont codées par des gènes différents. L'association des gènes humains des régions constantes aux gènes d'origine murine des régions variables de l'anticorps monoclonal initial est rendu possible par la technique de l'ADN recombinant. Pour cela, des gènes de la région variable des lignées cellulaires murines utilisées pour les hybridomes sont fusionnés aux gènes de la région constante humaine et ces gènes chimériques puis ensuite transfectés dans des cellules myélomateuses de souris afin de produire ces anticorps chimériques[79]. Pour exemple, l'infliximab, seul anti-TNF chimérique, est produit dans des cellules hybridomes murines par cette technique de l'ADN recombinant.

L'étape suivante a été d'humaniser les anticorps monoclonaux en remplaçant les régions hypervariables CDR d'un anticorps humain par des régions CDR d'origine murine à l'aide de la même technique de l'ADN recombinant ; ce remplacement aboutissant à n'avoir que 10% des séquences peptidiques d'origine murine[80]. Les régions hypervariables CDR contiennent la majorité des acides aminés constituant le site de liaison de l'antigène. Le but de l'humanisation d'un anticorps est de produire des régions variables proches des régions humaines sans que l'anticorps humanisé perde l'affinité et la spécificité de l'anticorps murin. Le certolizumab pegol est un exemple d'anticorps humanisé. En effet, l'anticorps « mère » a été choisi en sélectionnant des hybridomes liant le TNF humain. Les CDR murins ont été insérés dans la structure d'une région Fab d'une IgG1 humaine, ainsi que plusieurs autres résidus des régions charpentes (c'est-à-dire adjacentes aux CDR) qui étaient essentiels pour le maintien de l'affinité de l'anticorps[67]. L'expression du Fab humanisé a pu être réalisée dans des cellules d'*E. coli* . Le certolizumab a été ensuite pégylé *via* la fixation spécifique d'un fragment de 40 kDa de polyéthylène glycol (Fig.8).

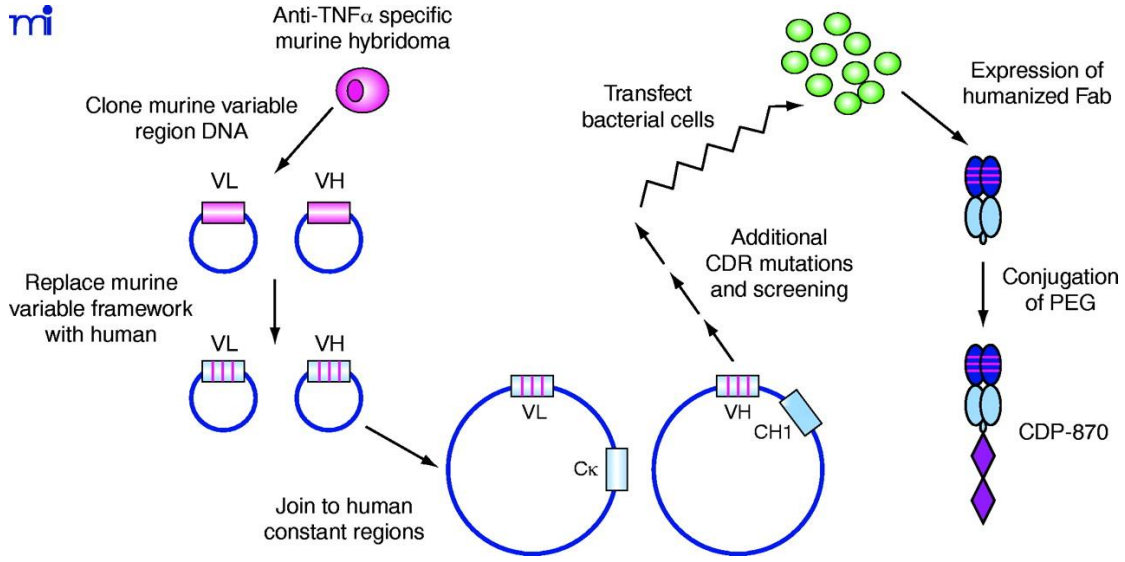


Figure 8: Principe de la fabrication du Certolizumab, utilisant la technologie de l'ADN recombinant. *CH1: constant heavy 1; CDR: complementarity determining regions ; PEG:polyethylen glycol ; VL: variable light ; VH : variable heavy*

La technique de l'ADN recombinant a permis également la production d'un type différent d'antagonistes anti-TNF basé sur la fusion du domaine extracellulaire du récepteur du TNF (p75) avec la fraction Fc d'un anticorps humain, l'étanercept. Ce traitement produit par génie génétique est exprimé dans des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO).

Enfin, des anticorps monoclonaux entièrement humains ont été produits en utilisant 2 techniques : celles des souris transgéniques « xenomouse » et celle de l'expression à la surface des phages (ou « phage display »). Un animal est dit transgénique lorsqu'il possède, outre ses propres séquences d'ADN, des gènes supplémentaires ou modifiés, dits transgènes, qui ont été ajoutés à son patrimoine héréditaire. La « xenomouse » est une souris transgénique qui exprime la grande majorité des gènes codant les immunoglobulines (Ig) humaines. Chez ces souris, la machinerie servant à la production d'Ig de souris est inactivée et humanisée avec la presque totalité des locus correspondant aux gènes codant les Ig humaines afin de permettre chez la souris la production d'une large diversité d'anticorps humains de forte affinité. Il est ensuite possible d'hybrider les cellules B de ces souris avec des cellules « immortelles » afin de créer une nouvelle lignée cellulaire productrice de l'anticorps monoclonal humain désiré[80]. La production du golimumab a ainsi été rendue possible par l'immunisation d'une souris transgénique Humab avec du TNF humain et par la réalisation d'une lignée cellulaire d'hybridome de souris transgénique[71].
La technique du « phage display », quant à elle, consiste à exprimer et à présenter un fragment d'anticorps fusionné à une protéine de surface d'un phage filamenteux (Fig.9). En effet, les bactériophages ou phages, sont des virus qui doivent infecter une bactérie hôte afin de se multiplier, en reproduisant leur ADN en un grand nombre de copies, puis sont libérés sous forme de particules virales comportant un assemblage de protéines virales entourant cet ADN. On peut introduire dans le génome des phages des séquences d'ADN codant les anticorps, de telle façon que ceux-ci se retrouvent joints au domaine N-terminal des protéines de surface du phage sous forme de fragments scFv et Fab. Les bactériophages exprimant les fragments d'anticorps dirigés contre la molécule cible, dans ce cas le TNF, sont sélectionnés et isolés par

des cycles répétés d'adsorption/élution, avec une étape d'amplification par l'infection de cellules bactériennes. En effet, après infection, de nouveaux phages sont produits en dizaines de millions d'exemplaires et présentent les fragments d'anticorps à leur surface[59,81]. Cette technique permet finalement de mimer la sélection naturelle *in vitro*. L'adalimumab a été généré grâce à la technique de sélection du « phage display » puis produit dans des cellules de hamster chinois (BHK-21) transfectées avec le plasmide nécessaire à l'expression des chaines légères et lourdes.

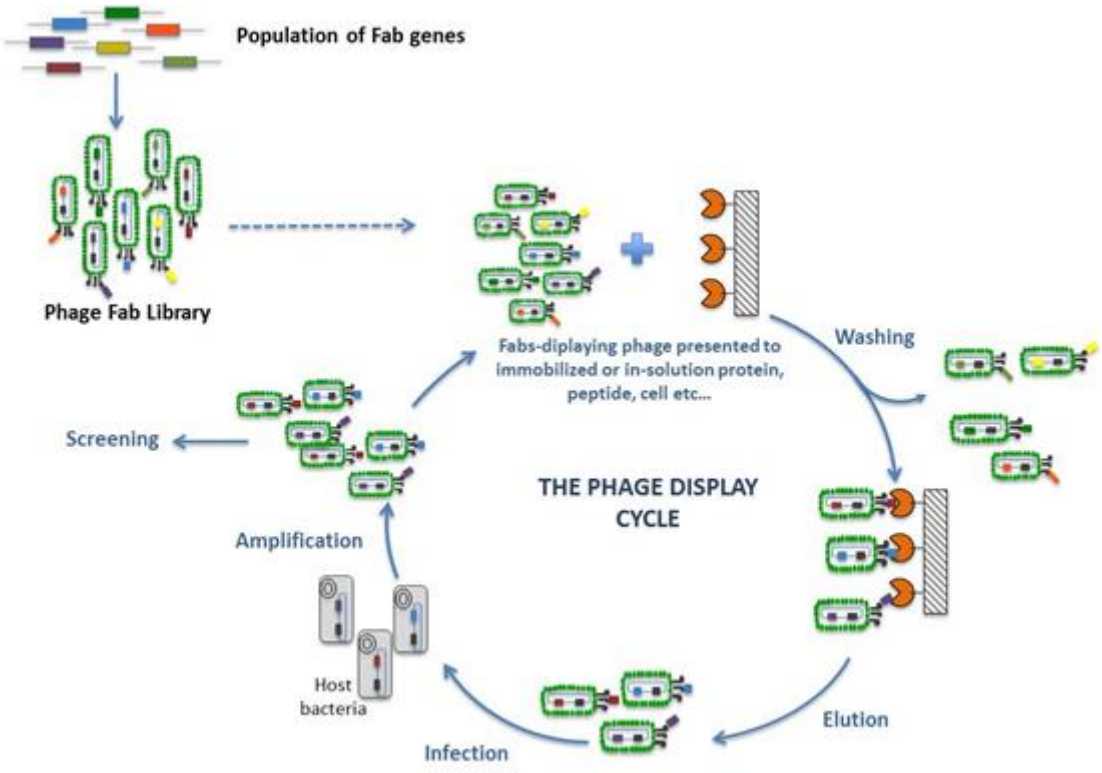


Figure 9: Principe de la sélection d'un fragment Fab par la technologie du phage display.

Bien que cette technologie ne soit pas encore applicable aux antagonistes du TNF, l'immortalisation d'anticorps naturels est rendue possible depuis quelques années. Pour cela, des lymphocytes B mémoires IgG^+ sont isolés à partir de sujets immunisés (envers le virus du SARS par exemple), immortalisés par l'Epstein Barr Virus (EBV) en présence de cellules mononuclées irradiées et de l'oligonucléotide CpG 2006 qui agit comme un activateur polyclonal de ces lymphocytes B mémoires. L'ajout de CpG 2006 augmente l'efficacité de l'immortalisation des lymphocytes B de 1-3% à 30-100%. Les clones EBV-lymphocytes B obtenus, toujours en présence de CpG 2006, sont stables et des anticorps monoclonaux spécifiques pour différentes protéines du SARS ont été récupérés dans le surnageant des cultures cellulaires à une concentration allant de 3 à 20µg/ml. Après isolement des clones neutralisants, un de ces anticorps a démontré sa capacité protectrice envers l'infection par le SARS in vivo dans un modèle murin[82].

1.2.2.2 Optimisation des anticorps thérapeutiques

Modulation de la liaison au récepteur FcRn

La demi-vie des anticorps chimériques, humanisés ou humains varie entre 3 et 27 jours dans la circulation sanguine. La modification des anticorps dans le but d'améliorer leur demi-vie offrirait un réel bénéfice en termes d'efficacité, de diminution de dose et de meilleure localisation de la molécule thérapeutique dans la zone d'intérêt. L'interaction entre le fragment Fc des IgG et le récepteur FcRn joue un rôle central dans l'homéostasie des IgG et permet en grande partie d'expliquer la demi-vie plus longue des IgG (Fig.10). En effet, le FcRn permet le recyclage des IgG après qu'ils aient été absorbés par pinocytose par les cellules endothéliales par exemple[83].

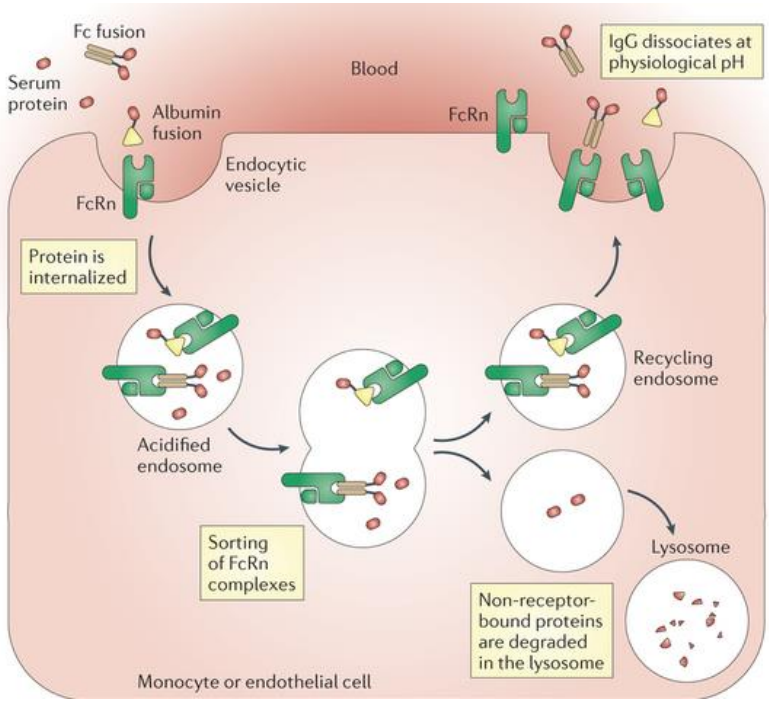


Figure 10: Recyclage des IgG grâce à leur fixation au récepteur FcRn.[83]

Certaines mutations de la portion Fc ont été reliées à une meilleure affinité de liaison avec le récepteur FcRn, et donc à une prolongation de la demi-vie de l'IgG et une meilleure efficacité *in vivo*. On peut citer les mutations QL (Thr250Gln:Met428Leu) ou LS (Met428Leu:Asn434Ser) chez l'homme et les mutations YTE (Thr250Gln:Met428Leu) chez le primate non humain. En effet, la triple mutation YTE a été introduite dans la portion Fc d'un anticorps monoclonal dirigé contre le virus respiratoire syncitial. Ces substitutions n'ont pas affecté sa capacité de liaison à son antigène mais sa fixation au récepteur FcRn a été multipliée par 10 à pH 6, avec une augmentation de la demi-vie sérique de cet anticorps de près de 4 fois chez le singe[84]. De même, le variant LS construit pour l'anticorps anti-VEGF a montré une amélioration de 11 fois pour l'affinité au FcRn, avec une demi-vie rallongée de près de 3.2 fois pour atteindre 31 jours en moyenne[85]. La construction d'un anticorps dont la liaison avec l'antigène dépend du pH peut aussi améliorer à la fois la pharmacocinétique et la durée de neutralisation de la cible. Cette liaison à l'antigène dépendante du pH permet de

sauver l'anticorps de la dégradation lysosomiale, engendre son recyclage à la surface cellulaire via le FcRn et rendre ainsi possible sa liaison ultérieure à une autre molécule cible[86]. Par exemple, le tocilizumab, un anticorps qui se lie au récepteur de l'IL-6 (IL-6R), se dissocie rapidement de l'IL-6R dans l'environnement acide de l'endosome (pH à 6) alors qu'il maintient son affinité de liaison au récepteur dans le plasma (pH à 7.4)[87]. Ceci pourrait permettre de délivrer le traitement moins fréquemment ou à des doses inférieures. Cependant, la modification du fragment Fc d'un anticorps pour améliorer son interaction avec le FcRn peut également influencer sa liaison avec d'autres molécules fixant le Fc, le FcRγ et le facteur du complément C1q, ce qui peut altérer les mécanismes cellulaires tels que l'ADCC ou le CDC[88].

Modification des fonctions effectrices des anticorps

L'amélioration de l'efficacité clinique des anticorps monoclonaux peut passer par la modification de la fraction Fc de l'anticorps, par mutagénèse ou par glycosylation, afin de potentialiser les fonctions ADCC et CDC de cette immunoglobuline. L'amélioration de ces fonctions pourrait permettre la lyse des cellules sécrétant le TNF. Ainsi, plusieurs variants d'un anticorps anti-52 ont été obtenus par substitution d'acides aminés rendant l'interaction entre le Fc et son récepteur plus favorable. Les 2 variants S239D/I332E et S239D/I332E/A330L montrent une amélioration considérable de leur liaison au FcγRIII et de l'ADCC, avec une augmentation de la déplétion des lymphocytes B chez les macaques[89]. La fonction ADCC peut être aussi modulée par les motifs glycosidiques attachés à la fraction Fc. Par exemple, les anticorps anti-CD20 ayant des oligosaccharides non fucosylés, complexes, sectionnés, attachés à l'asparagine 297 de la région Fc, présentent une meilleure liaison au récepteur FcγRIII humain, une ADCC augmentée et une meilleure efficacité anti-tumorale *in vivo*, que les anti-CD20 non transformés[90]. A l'inverse, des mutants Fc des anticorps anti-CD3 ayant des résidus altérés au niveau des acides aminés 234 et 235 ont une réduction très importante de leur fixation au FcRγ, une baisse de l'ADCC, de l'activation lymphocytaire T et du relargage de cytokines[91]. Concernant la fonction CDC, des variants Fc ont été conçus avec la capacité accrue de recruter le complément. Le variant S267E/H268F/S324T de l'anticorps anti-CD20 a une augmentation considérable de son affinité avec le C1q et de son activité CDC, avec un renforcement de la capacité cytotoxique de près de 23 fois de cet anticorps[92].

1.2.3 Indications

D'après les recommandations de l'European Medicines Agency (EMA)[93–97], les anti-TNF peuvent être prescrits dans les maladies inflammatoires rhumatismales, digestives ou dermatologiques suivant les molécules envisagées (voir tableau ci-après). Il est à noter que l'étanercept n'a pas montré une efficacité supérieure au placebo chez 43 patients MC dans l'obtention d'une réponse clinique à 4 semaines ; ce traitement n'est donc pas indiqué dans les MICI[98].

Seul l'infliximab est à administrer par voie intraveineuse (perfusion) après reconstitution des flacons avec de l'eau pour préparation injectable. Les autres traitements peuvent être injectés par voie sous cutanée.

Des infections sévères et des neutropénies ont été observées lors d'essais cliniques au cours desquels l'anakinra (anti-IL1) et l'étanercept ont été administrés de façon concomitante, sans bénéfice clinique supplémentaire comparativement à l'étanercept administré seul[99]. En raison de la nature des effets indésirables observés lors de l'association thérapeutique de l'anakinra et de l'étanercept, des toxicités similaires peuvent être également supposées lors de l'association entre ce traitement et un autre agent anti-TNFα. Par conséquent, l'association de l'infliximab, adalimumab, étanercept, golimumab et certolizumab avec l'anakinra n'est pas recommandée. Ces mêmes constatations ont été relevées concernant l'association entre les anti-TNF et l'abatacept (anti-CD80/86).

	Indications	**Mode d'administration**	**Contre-indications**	**Interactions médicamenteuses**
Infliximab	- Polyarthrite rhumatoïde - Maladie de Crohn (adulte/ enfant) - Rectocolite hémorragique (adulte/ enfant) - Spondylarthrite ankylosante - Rhumatisme psoriasique - Psoriasis	Voie intraveineuse (IV)	-Antécédent d'hypersensibilité à l'infliximab/ protéines murines/ excipients -Tuberculose ou infections sévères - Insuffisance cardiaque modérée ou sévère	- Association avec d'autres biothérapies non recommandée - Administration concomitante de vaccins vivants atténués non recommandée - Administration concomitante d'agents infections thérapeutiques non recommandée
Adalimumab	- Polyarthrite rhumatoïde - Maladie de Crohn (adulte/enfant) - Rectocolite hémorragique - Arthrite juvénile - Spondylarthrite axiale - Rhumatisme psoriasique - Psoriasis	Voie sous-cutanée (SC)	- Hypersensibilité au principe actif / excipient -Tuberculose ou infections sévères - Insuffisance cardiaque modérée ou sévère	- Association avec l'anakinra et l'abatacept non recommandée
Etanercept	- Polyarthrite rhumatoïde - Arthrite juvénile idiopathique - Rhumatisme psoriasique - Spondylarthrite axiale - Psoriasis	Voie sous-cutanée (SC)	- Hypersensibilité au principe actif / excipient - Septicémie ou risque de septicémie - Infections actives	- Administration concomitant avec l'anakinra et l'abatacept non recommandée, sulfalazine avec précaution
Certolizumab	- Polyarthrite rhumatoïde - Spondylarthrite axiale - Rhumatisme psoriasique	Voie sous-cutanée (SC)	- Hypersensibilité au principe actif / excipient -Tuberculose ou infections sévères - Insuffisance	- Association avec l'anakinra et l'abatacept non recommandée

			cardiaque modérée ou sévère	
Golimumab	- Polyarthrite rhumatoïde - Rhumatisme psoriasique - Spondylarthrite ankylosante - Rectocolite hémorragique	Voie sous-cutanée (SC)	- Hypersensibilité au principe actif / excipient -Tuberculose ou infections sévères - Insuffisance cardiaque modérée ou sévère	- Association avec d'autres biothérapies non recommandée - Administration concomitante de vaccins vivants atténués non recommandée - Administration concomitante d'agents infections thérapeutiques non recommandée

Figure 11: Synthèse des indications thérapeutiques des anti-TNF selon les recommandations de l'EMA.

1.2.4 Biosimilaires

Un biosimilaire est une copie d'un médicament « biologique » de référence autorisé dont le brevet est tombé dans le domaine publique. Depuis 2005, plusieurs biosimilaires ont été approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) et l'EMA, notamment des traitements à base d'érythropoïétine (EPO), d'hormone de croissance (somatropine) ou de facteurs de croissance des granulocytes (filgrastim). Les premiers biosimilaires d'anticorps monoclonaux anti-TNF ont été autorisés et mis sur le marché en 2013. Il s'agissait de 2 versions de l'infliximab : le Remsisa et l'Inflectra[100]. En France, ils sont disponibles depuis le 2ème trimestre 2015.

Les biosimilaires sont souvent comparés aux médicaments génériques bien que de nombreuses différences existent entre les 2. On entend par « médicament générique », un médicament qui possède la même composition qualitative et quantitative en substance(s) active(s) et la même forme pharmaceutique que le médicament de référence, et dont la bio-équivalence avec le médicament de référence a été démontrée par des études appropriées. La particularité de ces génériques est leur structure chimique de petite taille pouvant être reproduite de manière identique à l'atome près par rapport au médicament référent. A l'inverse, les médicaments « biologiques » sont des molécules complexes, souvent des glycoprotéines, issues du génie génétique et produites dans des systèmes vivants (cellules, bactéries) comme nous l'avons vu précédemment. Des variations mêmes minimes de ces différentes étapes de fabrication peuvent induire des modifications dans le repliement des protéines avec pour conséquence probable une différence dans l'efficacité ou la toxicité de ces molécules. Un changement du pH de la culture, la présence ou l'absence de cytokines, d'hormones, de nutriments peuvent également influencer le taux de glycosylation des protéines et ainsi en modifier son activité biologique. D'ailleurs, même sur plusieurs lots différents d'infliximab, une hétérogénéité structurale existe, essentiellement sur la chaîne lourde de l'anticorps, et correspond à des variations de glycosylation et de séquence d'acides aminés[101]. Les biosimilaires ne pouvant donc ne pas être à 100% identique au médicament référent, l'EMA a publié un cadre règlementaire définissant les conditions nécessaires pour l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché (Fig.12). Cette réglementation impose

entre autre des études de comparabilité prouvant la même efficacité et le même degré d'effets secondaires que le médicament référent.

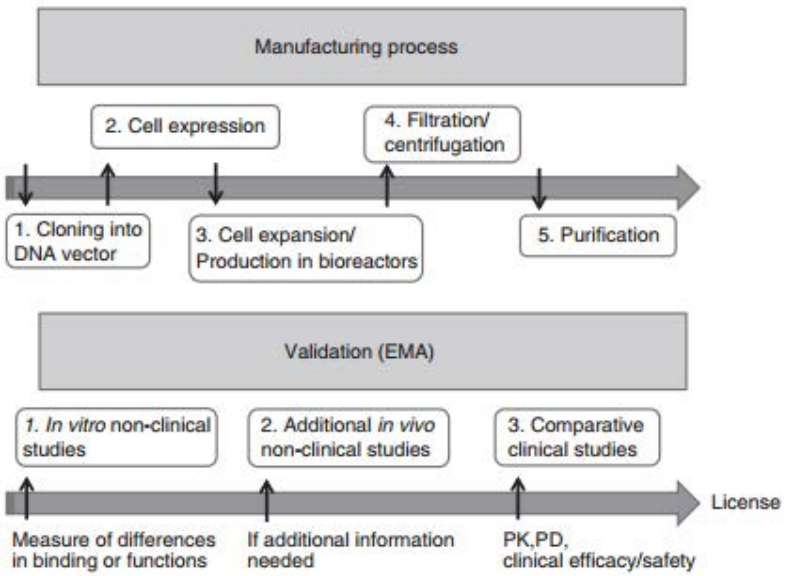


Figure 12: Processus de fabrication et réglementation des biosimilaires[102]

L'intérêt du développement des biosimilaires réside dans l'aspect économique relatif au traitement des maladies inflammatoires chroniques. A l'instar des génériques, une baisse du coût du traitement est à attendre, bien que le prix de fabrication des biosimilaires soit plus élevé que pour les génériques. Cette réduction de prix, même plus modeste, pourrait permettre une meilleure accessibilité de ces traitements aux patients au niveau européen et mondial. A l'heure actuelle, d'autres biosimilaires d'anticorps anti-TNF sont à l'étude[102].

1.2.5 Autres approches ciblant le TNF

Une nouvelle approche pour bloquer l'action du TNF est en cours d'évaluation et passerait par la production d'anticorps polyclonaux directement par le système immunitaire du patient. Le TNF-kinoïde est une molécule immunothérapeutique composée de TNF humain recombinant conjugué à une protéine de transport (l'hémocyanine de patelle), inactivée et adjuvantée avec une émulsion ISA-51 huile dans eau. L'administration de ce TNF-kinoïde provoque la production d'anticorps polyclonaux de type neutralisants contre le TNF. Dans un essai clinique ouvert de phase I/II, 3 doses de TNF-kinoïde ont été évaluées chez 22 patients atteints d'une forme modérée à sévère de MC. Aucun événement indésirable grave lié au traitement n'a été observé et l'ensemble des patients a terminé l'essai. Quelques réactions locales et systémiques mineures ont été reportées de manière transitoire après l'immunisation. Des anticorps anti-TNF ont bien été induits, d'intensité variable mais dont la présence a persisté 3 à 4 mois. Aucune réponse lymphocytaire T spécifique du TNF n'a été détectée. Une réponse clinique (réduction du score clinique CDAI de 70 points) a été observée chez 66-78% des patients et une rémission clinique (150 points de réduction) chez 36 à 50% des patients. Par contre, une analyse d'une étude de phase II incluant 60 patients MC semblent décevants. Les résultats définitifs de cette étude sont attendus[103].

Une chaîne unique de fragment variable, appelée scFv, est une protéine de fusion des régions variables des chaînes lourdes (VH) et légères (VL) des immunoglobulines, liées par un polypeptide flexible de 25 à 30kDa. Ces fragments d'anticorps pourraient présenter une meilleure biodisponibilité et une plus faible immunogénicité, bien que leur clairance sanguine soit rapide. Un scFv dirigé contre le TNF (ESBA 105) a montré une efficacité similaire à l'infliximab sur plusieurs tests *in vivo*. En effet, l'arthrite du genou induite par l'injection intra-articulaire de TNF recombinant chez des rats Lewis est inhibée par un excès molaire d'ESBA 105, ce qui aboutit à une diminution de 90% des gonflements articulaires, des infiltrats inflammatoires et de la perte des protéoglycanes du cartilage. De même, la pénétration rapide dans le tissu synovial, le cartilage et les tissus environnants a été observée après l'injection intra-articulaire de [(125)I]-ESBA105 dans l'articulation du genou du lapin[104]. Dans l'étude ex-vivo de cartilage bovin, l'ESB105 a bien pénétré dans le cartilage alors que l'infliximab est resté à la surface, un avantage dans le traitement local de l'inflammation[104]. Toujours afin de cibler le TNF, le scFv TSA1 a d'abord été construit grâce à une chaîne lourde V_H5 et une chaîne légère V_k1 avec les CDRs substitués par des peptides antagonistes du TNF. Bien que ce TSA1 montre une bioactivité pour lier le TNF, son activité était moins puissante que la forme scFv de l'infliximab[105]. Avec l'aide de la conception moléculaire assistée par ordinateur, une autre scFv a été conçu, le TSA2, qui montre une amélioration conséquente de sa bioactivité par rapport au TSA1, en particulier concernant l'inhibition de la cytotoxicité induite par le TNF et l'activation du NF-kB. Cette nouvelle approche pour concevoir des fragments d'anticorps anti-TNF pourrait être utile dans le développement de nouvelles thérapies[106].

En cours d'évaluation, la technologie des « nanobodies » serait une piste thérapeutique prometteuse, avec une molécule ayant déjà atteint un essai clinique de phase II dans le traitement de la PR. Cette technologie se base sur l'utilisation d'immunoglobulines fonctionnelles dépourvues de chaînes légères, découvertes dans le sérum des mammifères de la famille des camélidés. Ces anticorps à chaîne lourde reconnaissent l'antigène par une région unique du domaine variable de la chaîne lourde (VHH), qui peut être facilement produite et clonée dans des bactéries ou des levures. De plus, la solubilité et la stabilité de ces anticorps VHH permet leur utilisation pour construire des anticorps bispécifique et bivalents. Ainsi, un anticorps trivalent constitué de 2 « nanobodies » anti-TNF et d'un « nanobody » liant l'albumine, l'ATN 103 (ou Ozoralizumab), a été développée avec succès (Fig.13). L'albumine sérique a été choisi comme transporteur en raison de son rôle dans l'allongement de la demi-vie de l'anticorps mais également pour son ciblage présumé de la zone inflammatoire[107].

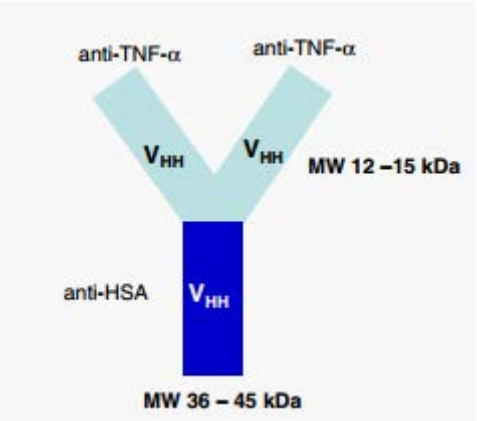


Figure 13: Représentation schématique de l'anticorps trivalent ATN-103[108]

Le stade préclinique conduit sur un modèle murin d'arthrite à collagène montre que cet anticorps trivalent permet une amélioration des scores cliniques de l'arthrite et de l'œdème des pattes de manière plus importante que l'étanercept, avec une amélioration nette des érosions osseuses et cartilagineuses. La fixation à l'albumine permet de rallonger sa demi-vie pour passer de 54 mn à 2.2 jours, et son accumulation au niveau des pattes inflammatoires corrèle avec les scores cliniques d'arthrite[107]. Dans un essai clinique phase 1, l'ATN 103 a montré un bon profil de tolérance. Les phases 2 comprennent l'administration sous-cutanée d'ATN 103 toutes les 4 semaines pendant 16 semaines chez des patients PR ainsi qu'une extension en essai ouvert pour s'assurer de la sûreté de ce nouveau « nanobody » lié à l'albumine[108].

Enfin, la société Avaxia Biologics a développé le premier anti-TNF polyclonal pouvant être administré par voie orale, l'AVX470, isolé à partir du colostrum de vaches laitières immunisées pour le TNF[109]. La sécurité ainsi que la pharmacocinétique, l'immunogénicité et l'efficacité clinique ont été évalués chez 36 patients présentant des formes modérées à sévères de RCH. Les patients ont reçu soit de l'AVX470 à une concentration de 0.2, 1.6 ou 3.5g/j soit du placebo pendant 4 semaines consécutives. Le médicament a été bien toléré. Cette première étude montre que l'AVX470 permet une meilleure réponse clinique (28% vs 14.3% dans le groupe placebo) ainsi que des améliorations au niveau de la rémission clinique et endoscopique pour les doses les plus élevées. Des études complémentaires sont toutefois requises pour évaluer des doses plus élevées mais aussi une durée plus longue de traitement[110].

Chapitre 2 : Intérêt et limites d'un traitement par anti-TNF dans les maladies inflammatoires

Comme la majorité de l'arsenal thérapeutique disponible sur le marché, la prescription d'un traitement ciblant le TNF doit être réalisée après évaluation de la balance entre les effets bénéfiques et les risques possiblement induis pour les patients. Le TNF ayant un rôle central dans la régulation du système immunitaire et participant activement à la défense de l'hôte contre les pathogènes, certains risques liés au blocage de cette cytokine sont à prévoir. Afin de les mettre en évidence, des études cliniques de phase II et de phase III ont dû être conduites afin d'établir l'efficacité mais aussi la toxicité de ces molécules.

2.1 Efficacité clinique des Anti-TNF

2.1.1 Infliximab (IFX)

Maladie de Crohn

L'efficacité d'un traitement constitué d'une dose unique d'IFX a été évaluée chez 108 patients présentant une forme active de la maladie de Crohn (Indice d'Activité de la Maladie de Crohn (CDAI) $\geq 220 \leq 400$) malgré les traitements conventionnels, lors d'une étude randomisée en double aveugle, contrôlée versus placebo. Une seule infusion de 5mg/kg d'infliximab permettait d'induire une réponse clinique chez 81% des patients à la semaine 4, avec 33% atteignant la rémission clinique (CDAI < 150). Une réponse était observée après un délai de 2 semaines, avec une réponse maximale à 4 semaines. Lors de la dernière visite à 12 semaines, 41 % patients traités par IFX présentaient toujours une réponse clinique[111]. L'intérêt d'une combothérapie comprenant un traitement par azathioprine, 6 mercaptopurine ainsi qu'une dose d'infliximab de 5mg/kg aux semaines 0, 2,6 a été démontré sur 113 patients MC non stabilisés avec un traitement par prednisone pendant plus de 6 mois. Le groupe traité par IFX présentait moins de résistance aux stéroïdes et un meilleur taux de rémission clinique comparé au groupe ne recevant que les 2 autres molécules[112]. L'efficacité d'une association IFX 5mg/kg avec de l'azathioprine s'est révélée supérieure à une monothérapie par IFX seul ($p= 0.02$) ou par azathioprine ($p< 0.001$) sur l'obtention d'une rémission clinique sans corticoïdes à la semaine 26 chez 508 patients MC[113].
En phase de maintenance, la répétition de l'administration d'une dose de 5 ou 10 mg/kg toutes les 8 semaines permettait de maintenir l'effet bénéfique de l'infliximab tout en étant bien toléré[114,115] (Fig.14).

Tableau 5
Effets sur les taux de réponse et de rémission, données issues d'ACCENT I (Répondeurs à la semaine 2)

	ACCENT I (Répondeurs à la semaine 2) % de patients		
	Traitement d'entretien par placebo (n = 110)	Traitement d'entretien par 5 mg/kg d'infliximab (n = 113) (valeur p)	Traitement d'entretien par 10 mg/kg d'infliximab (n = 112) (valeur p)
Délai médian de perte de réponse tout au long des 54 semaines	19 semaines	38 semaines (0,002)	>54 semaines (< 0,001)
Semaine 30			
Réponse clinique[a]	27,3	51,3 (< 0,001)	59,1 (< 0,001)
Rémission clinique	20,9	38,9 (0,003)	45,5 (< 0,001)
Rémission sans corticoïdes	10,7 (6/56)	31,0 (18/58) (0,008)	36,8 (21/57) (0,001)
Semaine 54			
Réponse clinique[a]	15,5	38,1 (< 0,001)	47,7 (< 0,001)

Figure 14: Résultats synthétisés de l'étude ACCENT 1 évaluant l'efficacité de l'infliximab en phase de maintenance[96]

Dans la maladie de Crohn fistulisée, le traitement d'entretien par infliximab permet une diminution du nombre de fistules avec écoulement sans provoquer l'apparition d'abcès (ACCENT II)[116,117].
L'enjeu actuel est également de pouvoir diminuer la dose d'infliximab après mise en rémission des malades atteints de MC, afin de limiter les effets secondaires et le coût du traitement. Il a été raporté que 10% des patients développaient une rechute sévère à l'arrêt du traitement par anti-TNF. La désescalade de dose pourrait être alors la solution pour maintenir les patients en rémission. Ainsi, 20% des patients inclus avec des concentrations résiduelles en infliximab > 7 µg/ml ont expérimenté une désescalade de dose pour atteindre des taux compris entre 3 et 7 µg/ml grâce à l'augmentation de l'intervalle des perfusions d'infliximab de 2 semaines[118]. Cette diminution de dose ne s'est pas accompagnée d'un changement d'activité de la maladie ni de modifications des biomarqueurs inflammatoires à court terme. A long terme, une désescalade progressive de dose de 1 mg/kg à chaque perfusion pour atteindre les mêmes taux résiduels a été effective, avec la persistance d'une rémission clinique profonde, chez 18 des 20 patients suivis pendant un an[119].

Rectocolite hémorragique

Une première étude pilote réalisée sur un nombre très restreint de patients (n=11) atteints de RCH sévère et réfractaire aux stéroïdes a mis en évidence un potentiel effet bénéfique d'un traitement par infliximab à 5,10 ou 20 mg/kg[120]. Bien que ces résultats aient été au départ controversés dans une population de malades résistants aux corticoïdes[121], l'efficacité et la tolérance de l'infliximab ont été confirmées au cours de deux études cliniques (ACT 1 et ACT 2) randomisées, en double-aveugle, contre placebo, chez 364 patients adultes atteints de RCH

modérée à sévère (score de Mayo de 6 à 12 dont un score ≥ 2 pour l'endoscopie) ayant une réponse clinique inadéquate aux traitements conventionnels[122]. Dans les deux études, les patients étaient randomisés pour recevoir soit du placebo, soit de l'infliximab 5 mg/kg ou 10 mg/kg aux semaines 0, 2, 6, 14 et 22, et dans ACT 1 aux semaines 30, 38, et 46 afin d'évaluer les bénéfices d'un traitement d'entretien. Les taux de rémission clinique et de cicatrisation muqueuse étaient plus importants dans le groupe de patients recevant de l'infliximab toutes doses confondues comparé au groupe placebo à la semaine 54 ($p < 0,001$). Les patients pouvaient également arrêter les corticoïdes plus fréquemment, étaient moins souvent hospitalisés ni opérés à cause des complications liées à leur pathologie[122].

Polyarthrite rhumatoïde

L'efficacité de l'IFX a été évaluée lors de deux études cliniques pivot, multicentriques, randomisées, en double-aveugle : ATTRACT et ASPIRE. L'étude ATTRACT a évalué les réponses aux semaines 30, 54 et 102 dans le cadre d'une étude contrôlée versus placebo chez 428 patients présentant une polyarthrite rhumatoïde active malgré un traitement par méthotrexate. Les patients recevaient soit du placebo, soit 3 mg/kg ou 10 mg/kg d'infliximab aux semaines 0, 2 et 6, puis toutes les 4 ou 8 semaines. Tous les patients recevaient des doses stables de méthotrexate (en moyenne 15 mg/semaine) pendant 6 mois avant leur inclusion et étaient maintenus à des doses stables pendant l'étude[123]. A la semaine 30, la réponse ACR 20, représentant une amélioration de 20% par rapport au score initial, était atteinte pour globalement la moitié des patients, pour les 4 doses d'infliximab testés ($p<0.001$) et la réponse ACR 50 pour environ le tiers des patients. L'étude ASPIRE quant à elle, a évalué les réponses à la semaine 54 chez 1 004 patients naïfs de méthotrexate présentant une PR active dans sa forme débutante (durée de la maladie ≤ 3 ans, durée médiane de 0,6 ans) et active. Tous les patients recevaient du méthotrexate (optimisé à 20 mg/semaine à la semaine 8) et, soit du placebo, soit 3 mg/kg ou 6 mg/kg d'infliximab aux semaines 0, 2, et 6 puis toutes les 8 semaines. Toutes les doses d'infliximab associées au méthotrexate ont conduit à une amélioration statistiquement significative des signes et symptômes mesurés par la proportion de patients présentant une réponse ACR 20, 50 et 70. Un ralentissement de la progression des dommages structuraux a été observé aux semaines 30 et 54 dans les groupes IFX + méthotrexate, comparé au méthotrexate seul. D'autres études ont par la suite également confirmé l'intérêt d'un traitement par infliximab chez des patients PR en combothérapie avec du méthotrexate dans l'obtention d'une amélioration clinique et d'une absence de progression de l'atteinte articulaire[124–126].

2.1.2 Adalimumab

Maladie de Crohn

Pour évaluer l'efficacité d'un traitement par adalimumab chez des patients atteints de la maladie de Crohn, l'étude de phase III CLASSIC-1 a été conduite sur 299 patients[127]. Ces patients présentant une forme modérée ou sévère de la maladie malgré un traitement immunosuppresseur conventionnel n'avaient jamais reçu de traitement anti-TNF avant

l'étude. L'objectif primaire était l'obtention d'une rémission clinique à 4 semaines définie par un score d'activité de la maladie (CDAI) < 150. Les patients ayant bénéficié d'une injection de 160 mg au début de l'étude et 80 mg 2 semaines après atteignaient un taux de rémission de 36%, soit un taux significativement plus élevé que dans le groupe contrôle. Les répondeurs à l'induction des anti-TNF à la semaine 4 ont été ensuite suivis pendant 54 semaines dans un essai clinique de phase II (CLASSIC-2) pour évaluer l'efficacité à long terme d'une dose de 40 mg d'adalimumab toutes les semaines. Cet essai a mis en évidence une capacité de l'adalimumab supérieure au placebo à induire et à maintenir une rémission clinique pendant la durée étudiée[128]. En plus de la rémission clinique, la qualité de vie a été aussi analysée dans l'essai CHARM où 499 répondeurs à l'adalimumab à la semaine 4 ont été randomisés pour avoir un traitement de maintenance de 40mg toutes les 2 semaines, toutes les semaines ou du placebo. La qualité de vie globale était significativement augmentée à l'induction du traitement puis maintenue grâce aux doses d'adalimumab injectées régulièrement. Il s'agissait de la première étude montrant qu'un traitement par anti-TNF réduisait également la fatigue et la dépression chez des patients MC[129]. Enfin, la question s'est posée sur l'efficacité potentielle de l'adalimumab après une première exposition au seul anti-TNF disponible à l'époque, l'infliximab. Chez 325 patients non améliorés par l'IFX ou ne pouvant pas recevoir ce traitement à cause d'effets secondaires, l'adalimumab a permis de mettre en rémission un plus grand nombre de patients que le placebo (21% *vs* 7%)[130].

Rectocolite hémorragique

Concernant l'efficacité de l'adalimumab dans cette population, 2 études ont été initialement conduites pour évaluer ce traitement à l'induction (ULTRA-1) et en phase de maintenance (ULTRA-2). Le premier essai a porté 186 patients dont la RCH n'était pas maitrisée par les corticoïdes ou autre traitement immunosuppresseur. Avec 160 mg d'adalimumab à T0, 80 mg à la semaine 2 et 40 mg aux semaines 4 et 6, un nombre significativement plus élevé de patients atteignait la rémission clinique définie par un score de Mayo < 2[131]. Avec une dose de maintenance de 40 mg par semaine, les patients maintenaient plus souvent leur rémission à la semaine 52, qu'ils n'aient jamais eu d'IFX auparavant ou au contraire[132]. De plus, une amélioration clinique dès la semaine 8 était prédictive d'un bon pronostic à un an, avec un taux d'environ 30% de rémission clinique, 50% de réponse clinique et 40% de cicatrisation muqueuse. L'adalimumab est donc associé à une balance positive bénéfice/risque chez les patients présentant une forme active de RCH[133].

Polyarthrite rhumatoïde

Pour la PR, l'efficacité a d'abord été évaluée chez 619 patients ayant une forme active de la maladie répondant mal au méthotrexate[134]. Cet essai multi centrique en double aveugle a permis de montrer qu'une dose de 40mg d'adalimumab toutes les 2 semaines était équivalente à 20mg par semaine en plus du méthotrexate, pour induire une amélioration de la réponse clinique, des scores radiologiques et de la fonction physique. Afin d'évaluer l'efficacité de l'adalimumab seul, l'essai PREMIER a enrôlé pendant 2 ans 799 patients présentant une forme précoce agressive n'ayant jamais été traitée par méthotrexate. La combinaison du méthotrexate associé à de l'adalimumab 40 mg toutes les 2 semaines s'est révélée bien

supérieure à une monothérapie par l'un des 2 médicaments dans tous les résultats mesurés à 1 ou 2 ans. En effet, les réponses ACR 20, 50, 70 et 90 étaient meilleures dans le groupe traité par combothérapie, ainsi que la progression radiologique des atteintes articulaires évaluées par le score de Sharp[135]. Ces résultats ont été confirmés sur une autre cohorte (OPTIMA) incluant 1032 patients chez qui une même combothérapie était supérieure au méthotrexate seul en terme de réponse ACR 20,50,70, de rémission clinique, de baisse du DAS28, d'absence de progression radiologique ou du maintien d'une fonction physique normal à la semaine 26 ($p<0.001$ pour l'ensemble des paramètres)[136].

2.1.3 Etanercept

Maladie de Crohn

Sandborn *et al* ont administré 2 fois par semaine pendant 8 semaines 25mg d'étanercept par voie sous cutanée à des patients présentant une forme modérée à sévère de MC, et comparé son efficacité versus placebo (n=43). A la semaine 4, aucune différence significative n'était enregistrée entre les 2 groupes concernant la réponse clinique ni les effets secondaires. Cette dose, approuvée dans le traitement de la PR, n'est donc pas efficace dans le traitement des MC[137]. Par conséquent, l'étanercept n'est pas indiqué dans le cadre de cette pathologie.

Rectocolite hémorragique

Aucune étude d'efficacité et de tolérance de l'étanercept n'a été réalisée sur des cohortes de patients présentant une RCH. Ce traitement n'a donc pas l'autorisation de mise sur le marché pour cette indication-là.

Polyarthrite rhumatoïde

L'étanercept est le traitement anti-TNF ayant la plus faible demi-vie. Sa posologie a donc d'abord été évaluée à 10 mg et 25mg 2 fois par semaine pendant 6 mois chez 283 patients ayant une PR active ne répondant pas au traitement de fond. L'échelle HAQ (Health Assessment Questionnaire), incluant le handicap, l'activité, l'état mental, l'état général, l'état des fonctions articulaires, a été évaluée tous les 3 mois. Il en ressort que l'ensemble des domaines de cette échelle ont été améliorés chez les patients traités par étanercept en comparaison avec les patients sous placebo à 3 et 6 mois. De la même manière, les réponses ACR 20 et ACR 50 étaient supérieures chez les patients traités par étanercept[138,139]. Une réponse dose-dépendante a été observée dans cette étude avec des résultats intermédiaires entre le placebo et 25 mg pour la dose de 10 mg. Pour approfondir cette relation dose effet, 201 patients PR ayant une réponse suboptimale avec une dose de 50 mg par semaine en association avec du méthotrexate ont été randomisés afin qu'un groupe reçoive 50 mg 2 fois par semaine d'étanercept. Cette augmentation de dose n'a pas donné lieu à une différence significative en termes d'amélioration du DAS28 ou d'apparition d'effets secondaires[140].
Le méthotrexate étant le traitement de référence de la PR, une comparaison de l'efficacité de l'étanercept vis-à-vis de cette molécule a été réalisée chez 682 patients ayant une PR active, de moins de 3 ans, et n'ayant jamais reçu un des deux traitements. Les patients ont été

randomisés afin de recevoir de l'étanercept 25 mg uniquement (2 fois par semaine), du méthotrexate oralement ou la combinaison des 2 traitements. Dans cette étude, l'atteinte articulaire a été évaluée radiographiquement et exprimée en modification du Score Total de Sharp (STS) et de ses composants; le score d'érosion et le Score de Pincement Articulaire (SPA). L'étanercept à 25 mg a été significativement supérieur au méthotrexate pour les scores d'érosion, à la fois à 12 et 24 mois. Cependant, les différences entre le groupe méthotrexate et le groupe étanercept à 25 mg pour le STS et le SPA n'étaient pas statistiquement significatives. Il est intéressant de préciser que la combinaison des 2 traitements était bien supérieure à une seule des molécules pour la réponse ACR ($p<0.0001$) à 24 semaines, pour freiner le développement des atteintes articulaires ($p<0.0001$) et améliorer le handicap fonctionnel présenté par ces patients[141].

Enfin, la question de la possibilité d'arrêter ou de diminuer le traitement par anti-TNF chez des patients en rémission clinique s'est également posée. L'étude PRESERVE a ainsi enrôlé 604 patients PR ayant une activité faible de la maladie (Low disease activity (LAD)) sous traitement associant du méthotrexate et une dose de 50 mg d'étanercept chaque semaine pendant au moins 8 semaines. Ces patients ont été ensuite randomisés pour avoir un traitement d'entretien à base de méthotrexate seul ou en combinaison avec de l'étanercept 50 ou 25 mg par semaine. A la semaine 88, la majorité des patients ayant arrêté totalement l'anti-TNF présentait une perte de réponse clinique. La LAD est donc un état instable nécessitant le maintien d'un agent bloquant le TNF. Par contre, une dose réduite d'étanercept était liée à la persistance de bonnes réponses cliniques, de manière assez similaire à la dose conventionnelle[142].

2.1.4 Certolizumab

Maladie de Crohn

Une étude de phase II comparant les doses de 100, 200 et 400 mg de certolizumab pegol chez 292 patients MC avait montré de meilleurs taux de réponse clinique pour le groupe recevant la plus forte dose[143]. Néanmoins, une première étude de phase III comparant 400 mg de certolizumab pegol au placebo injectés par voie sous cutanée à la semaine 0, 2, 4 puis toutes les 4 semaines chez 662 adultes présentant une forme modérée à sévère de MC, n'a pas conforté l'intérêt de ce traitement dans cette pathologie. En effet, seule une modeste amélioration des taux de réponse clinique, et non de rémission, était rapportée pour un traitement d'induction et de maintenance par certolizumab pegol *vs* placebo[144]. Ces résultats ont été retrouvés plus récemment chez 439 patients MC où les taux de rémission clinique à la semaine 6 n'étaient pas significativement différents entre certolizumab et placebo ($p=0.174$). Par contre, un sous-groupe de patient dont la CRP était augmentée (>5mg/l) au début de l'étude présentait un meilleur taux de rémission clinique à la semaine 6 en cas de traitement par certolizumab[145]. Concernant les patients ayant atteint une rémission clinique grâce à cet anti-TNF, le maintien d'une dose de 400 mg tous les mois empêchait la survenue d'une perte de réponse au traitement par rapport au switch avec du placebo[146].

Dans l'attente de nouveaux essais cliniques ciblant plus particulièrement les patients présentant un syndrome inflammatoire très important, le certolizumab pegol n'est donc pas autorisé pour cette pathologie en Europe.

Rectocolite hémorragique

Aucune étude d'efficacité ni de tolérance n'a été réalisée sur des cohortes de patients présentant une RCH. A l'instar de la MC, le certolizumab n'a pas d'indication en Europe pour cette pathologie.

Polyarthrite rhumatoïde

Dans la PR, l'efficacité et la sécurité du certolizumab pegol ont été évaluées lors de 2 études cliniques randomisées (RA-I (RAPID 1) et RA-II (RAPID 2)), en double aveugle, contrôlées, *versus* placebo, chez des patients âgés ≥ 18 ans ayant une PR active depuis au moins 6 mois avant le début de l'étude. Une administration de méthotrexate par voie orale était associée au traitement par certolizumab pegol. Des réponses ACR 20 et ACR 50 supérieures de manière statistiquement significative par rapport au placebo ont été obtenues, respectivement, à partir de la semaine 1 et de la semaine 2, dans les deux études cliniques. Les réponses se sont maintenues jusqu'à la semaine 52 (RA-I) et 24 (RA-II). Les résultats sont similaires au niveau de la réduction du DAS 28 VS ($p<0.001$). Au niveau de la réponse radiologique, la progression des signes radiographiques a été plus faible chez les patients traités par certolizumab par rapport à ceux recevant le placebo, aux semaines 24 et 52. Dans les études RA-I et RA-II, les patients traités par certolizumab pegol ont également rapporté des améliorations significatives, par rapport au placebo, de leurs capacités fonctionnelles évaluées par le HAQ-DI (Health Assessment Questionnaire – Disability Index), de leur fatigue évaluée par l'échelle d'évaluation de la fatigue (FAS) à partir de la semaine 1 et jusqu'à la fin des études. D'autres évaluations physiques et mentales (SF-36, HRQoL – health related quality of life), ainsi que l'évaluation de la productivité au travail (Work Productivity Survey) montrent aussi le bénéfice d'un traitement additionnel par certolizumab[147,148].
En monothérapie, le certolizumab a également prouvé son efficacité *vs* placebo chez 220 patients PR en échec d'un premier ou de plusieurs traitements conventionnels. A une dose de 400 mg toutes les 4 semaines, les patients traités par cet anti-TNF avaient des taux de réponse ACR20 statistiquement plus importants dès la première semaine et jusqu'à la semaine 24 ($p<0.001$). Des améliorations étaient rapportées au niveau de la réponse ACR 50, du DAS 28 et des scores fonctionnels et mentaux[149].
En phase de maintenance, l'administration de certolizumab 200 mg toutes les 2 semaines ou 400mg toutes les 4 semaines était comparable et supérieure au placebo au niveau de la réponse clinique prolongée à la semaine 34[150].
Il est intéressant de noter que le certolizumab garde une efficacité versus placebo chez des patients PR ayant déjà reçu 1 ou 2 autres anti-TNF au préalable, que ça soit de l'adalimumab, de l'étanercept ou de l'infliximab. Les taux de réponse étaient cependant numériquement plus élevés pour les patients naïfs en anti-TNF[151].

2.1.3 Golimumab

Maladie de Crohn

Aucune étude ciblant spécifiquement l'efficacité du golimumab dans une population de MC n'a été conduite. Ce traitement n'est donc pas indiqué à l'heure actuelle dans la prise en charge de ces patients.

Rectocolite hémorragique

L'efficacité du golimumab à l'induction, par voie sous-cutanée, a été évaluée en incluant 1064 patients atteints de RCH active, modérée à sévère (score Mayo de 6 à 12 ; sous-score endoscopique ≥ 2), cortico-dépendants, qui n'avaient pas répondu de manière adéquate ou qui avaient mal toléré un traitement conventionnel (PURSUIT-Induction)[152] (Figure 15).
Les résultats de l'étude d'entretien (PURSUIT-Maintenance) sont basés sur l'évaluation de 464 patients ayant obtenu une réponse clinique après le traitement d'induction par golimumab[153].
Les principaux résultats de ces 2 essais cliniques sont résumés ci-après. Dès la semaine 6, le golimumab s'est montré capable d'induire une réponse clinique, une rémission, une cicatrisation muqueuse et une augmentation de la qualité de vie par rapport au placebo de manière significative[98].
En traitement de maintenance, un plus grand pourcentage de patients ayant reçu une dose de 100 mg de golimumab étaient en rémission clinique ou présentaient une cicatrisation muqueuse par rapport au placebo ou au groupe traité par 50 mg de golimumab.

PURSUIT-Induction			
	Placebo N = 251	**Simponi 200/100 mg** N = 253	
Pourcentage de patients			
Patients en réponse clinique à la semaine 6[a]	30 %	51 %**	
Patients en rémission clinique à la semaine 6[b]	6 %	18 %**	
Patients avec une cicatrisation des muqueuses à la semaine 6[c]	29 %	42 %**	
PURSUIT-Maintenance			
	Placebo[d] N = 154	**Simponi 50 mg** N = 151	**Simponi 100 mg** N = 151
Pourcentage de patients			
Maintien de la réponse (patients en réponse clinique jusqu'à la semaine 54)[e]	31 %	47 %*	50 %**
Rémission maintenue (patients en rémission clinique à la semaine 30 et à la semaine 54)[f]	16 %	23 %[g]	28 %*

Figure 15: Principaux résultats d'efficacité des études PURSUIT - Induction et PURSUIT – Maintenance chez des patients atteints de RCH. ** p ≤ 0,001 * p ≤ 0,01[97]

Le golimumab a été approuvé pour le traitement de la PR par voie sous cutanée ou intraveineuse. La question de la voie d'administration s'est donc également posée pour la

RCH. Le programme PURSUIT –IV, qui a évalué une induction thérapeutique unique par voie intraveineuse, montre une supériorité de la voie sous-cutanée à l'initiation du traitement par golimumab[154].

Polyarthrite rhumatoïde

Plusieurs essais cliniques randomisés ont évalué l'efficacité et la tolérance du golimumab dans différents groupes de patients PR : une cohorte n'ayant jamais reçu de méthotrexate (étude GO-BEFORE)[155], une autre ayant une réponse non satisfaisante au méthotrexate (étude GO-FORWARD)[156] et enfin un groupe ayant déjà bénéficié d'un traitement par anti-TNF (étude GO-AFTER)[157].

L'étude GO-BEFORE a évalué 637 patients atteints de PR active, naïfs de méthotrexate et n'ayant pas été traités auparavant par un anti-TNF. Les patients randomisés ont reçu soit du méthotrexate ou du golimumab (100 mg) seuls, soit une association méthotrexate et golimumab (50 mg ou 100 mg). Ce même schéma de randomisation a été fait pour les 444 patients PR non stabilisés par du méthotrexate 15 mg/semaine, inclus dans l'essai GO-FORWARD. L'étude GO-AFTER, quant à elle, s'est basée sur 445 patients ayant été précédemment traités avec un ou plusieurs anti-TNF : l'adalimumab, l'étanercept ou l'infliximab. Les patients randomisés ont alors reçu soit du placebo, soit du golimumab (50 mg ou 100 mg), avec possibilité de continuer un autre traitement conventionnel comme le méthotrexate ou la sulfasalazine.
En général, aucune différence significative d'un point de vue clinique au niveau de l'efficacité n'a été observée entre les schémas golimumab 50 mg et 100 mg associé au méthotrexate, jusqu'à la semaine 104 dans les études GO-FORWARD ET GO-BEFORE et jusqu'à la semaine 24 dans l'étude GO-AFTER.
Pour les patients n'ayant jamais reçu de méthotrexate, l'objectif principal, qui était de montrer une supériorité d'une combothérapie méthotrexate + golimumab par rapport au méthotrexate seul en terme de réponse ACR 50, n'avait pas été atteint à la semaine 24. Cependant, un degré de significativité était atteint pour cette semaine-là pour les réponses ACR 20 et ACR 90. Cette combinaison s'est aussi révélée bénéfique en termes d'amélioration du DAS 28 (réponse ou rémission), du nombre d'articulations douloureuses, du taux de CRP et de l'évaluation par le patient de la douleur ainsi que de l'activité de sa pathologie. Le golimumab seul n'était pas inférieur au méthotrexate pour induire une réponse ACR 50 à la semaine 24[155].
Dans les études GO-FORWARD et GO-AFTER, des résultats significatifs d'un point de vue clinique et statistique concernant l'amélioration du DAS 28 ont été observés à chaque point d'évaluation prédéfini, à la semaine 14 et à la semaine 24 ($p \leq 0,001$). De plus, le golimumab a démontré une amélioration significative du score HAQ-DI évaluant la fonction physique et le handicap lié à la maladie ainsi que le score FACIT-F (*Functional assessment of chronic illness therapy-fatigue*) mesurant la fatigue éprouvée par les patients[97]. Dans l'étude GO-FORWARD, des améliorations significatives ont été démontrées à la semaine 24 concernant la qualité de vie associée à l'état de santé mesurée par la composante physique du score SF-36 chez les patients traités par golimumab *vs* placebo.

Le golimumab est donc un traitement ayant prouvé son efficacité non seulement en première ligne thérapeutique mais également après échec du méthotrexate ou d'un autre anti-TNF.

De manière générale dans la PR, tous les anti-TNF donnés en association avec du méthotrexate ont montré une efficacité clinique avec prévention des atteintes articulaires au niveau radiologique. En utilisant les critères de réponses de l'ACR, la proportion de patients obtenant une amélioration de 20, 50 et 70% était similaire pour les 5 médicaments. Peu d'essais ont comparé les anti-TNF entre eux. Dans une étude danoise comparant l'infliximab, l'adalimumab et l'étanercept, des taux plus bas de réponse clinique et de rémission étaient retrouvés pour l'infliximab alors que l'adalimumab présentait les taux les plus élevés. L'étanercept, quant à lui, présentait la survie la plus longue sans traitement. De plus, il y avait moins d'arrêt du traitement à cause des effets secondaires en comparaison avec les 2 autres anti-TNF, avec notamment moins de risque de tuberculose[158,159].

2.2 Possibles effets secondaires liés à un traitement par anti-TNF

La liste des effets indésirables pouvant être rencontrés lors de l'administration d'un traitement par anti-TNF est basée sur les essais cliniques et sur l'expérience après commercialisation. Cette liste exhaustive est synthétisée dans la notice d'utilisation des traitements en fonction des organes touchés et de leur fréquence. Nous ne détaillerons que certains de ces effets secondaires dans cette introduction et notamment ceux associés à une perte d'efficacité.

2.2.1 Immunogénicité (Fig.16)

Il a été montré que la prise d'agents biologiques pouvait conduire à la formation d'anticorps neutralisants ou non neutralisants dirigés contre ces molécules. Une majorité de ces anticorps anti-médicament (ADA) dirigés contre les anti-TNF chimériques ou humanisés sont neutralisants, avec une proportion d'anticorps neutralisants >90% pour l'infliximab et > 97% pour l'adalimumab, le golimumab et le certolizumab[160]. Les anticorps neutralisants agissent directement sur la capacité des anti-TNF à bloquer l'interaction du TNF avec son récepteur. Ces ADA seraient dirigés contre les idiotopes situés à l'intérieur ou à l'extérieur du fragment Fab de liaison au TNF des immunoglobulines. Ce blocage de l'anti-TNF peut aussi résulter soit d'un encombrement stérique secondaire à la fixation de l'ADA sur d'autres sites de l'anticorps, soit d'une agrégation ou d'une formation de complexes immuns qui masquent le site de liaison au TNF. La capacité neutralisante de ces ADA dépend également de leur affinité et de leur cinétique d'association/dissociation avec l'anti-TNF.

Les anticorps non neutralisants, bien que minoritaires, peuvent avoir aussi un rôle indirect impactant l'efficacité des anti-TNF. Ces ADA non neutralisants peuvent en effet compromettre la biodisponibilité du traitement ou accélérer sa clairance de la circulation sanguine. Dans le cas où le médicament est injecté par voie sous-cutanée, les ADA neutralisants ou non neutralisants peuvent former des complexes immuns au site d'injection et réduire le passage de l'anti-TNF dans la circulation sanguine. De même, les ADA non neutralisants peuvent altérer les propriétés pharmacocinétiques du médicament influençant sa disponibilité tissulaire à travers la formation de complexes immuns et leur élimination de la circulation par filtration splénique, par fixation aux récepteurs Fcγ des cellules phagocytaires

et par recyclage secondaire au récepteur de Brambell (FcRn). L'ensemble de ces procédés semble indépendant de la liaison au TNF[161].

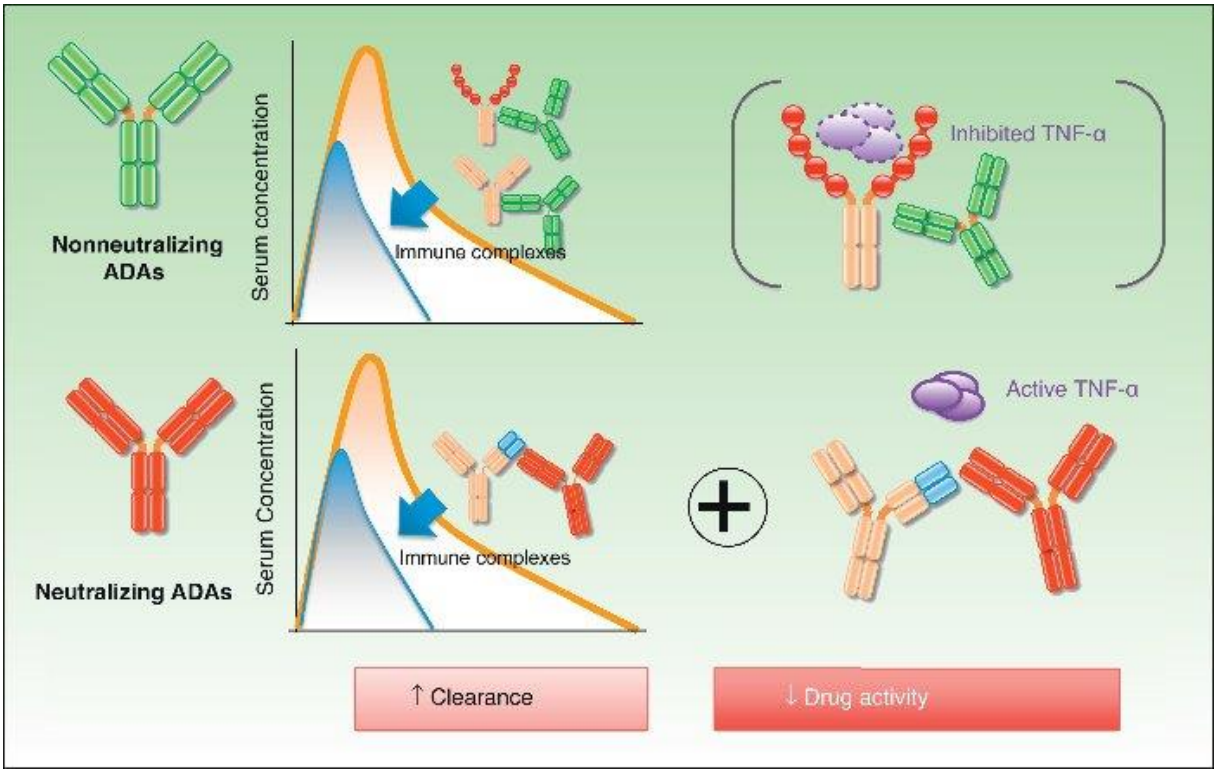


Figure 16: Mécanisme d'action des anticorps anti-médicament neutralisants et non-neutralisants. ADAs : Antidrug antibodies[162]

Pour l'étanercept, le certolizumab pegol et le golimumab, peu de données ont été publiées sur l'isotype des ADA développés. Par contre, les anticorps dirigés contre l'infliximab sont majoritairement des IgG, notamment de sous type IgG1 et IgG4, même si la présence d'isotypes IgA, IgM et plus rarement IgE ait été rapportée[163]. De même, une part des anticorps anti-adalimumab sont de sous-types IgG1 et IgG4. La similarité entre anticorps anti-infliximab et anti-adalimumab au niveau de la distribution des isotypes indique que la plupart des ADA produit lors des réponses immunitaires contre les agents anti-TNF sont de type IgG avec une prépondérance des IgG1 et 4. La production du sous type IgG4 est attendue dans ce contexte puisque ce type d'anticorps est induit lors de l'exposition répétée à un antigène. La présence d'anticorps de haute affinité de type IgG (IgG1 et 4) indique que la réponse immunitaire aboutissant à la production des ADA est médiée par les lymphocytes T[163].

Dans les patients atteints de MC, des ADA ont été retrouvés chez plus de 60% des patients traités par IFX et dans 10 à 20% des patients en traitement d'entretien[164]. La présence de ces ADA induit une augmentation de 30% de la clairance du médicament en comparaison avec un groupe de patients n'ayant pas développés ces ADA. La conséquence des ADA est la présence d'un taux résiduel bas d'anti-TNF. Une méta-analyse en 2013 a montré que les patients ayant des ADA dirigés contre l'infliximab avaient 3 fois plus de risque de perte de réponse clinique que les patients sans ADA[165].

La production de ces ADA peut être influencée par de nombreux facteurs liés au patient, au traitement et à son administration. Concernant les facteurs intrinsèques du patient, certaines études ont pointé l'importance du terrain génétique, notamment des polymorphismes des molécules HLA ou des cytokines, dans la formation des ADA. En effet, un polymorphisme du gène de l'IL-10, cytokine impliquée dans le développement et la différenciation des lymphocytes B, a été associée à la formation d'ADA chez des patients PR traités par adalimumab[166]. Chez des patients MC, une corrélation entre le locus HLA DR1 et la prévalence d'anticorps anti-infliximab a été rapportée, avec une proportion de 81% des patients présentant des ADA ayant une augmentation des résidus DRβ S13 contre 50% des patients sans ADA[164]. La forte composante inflammatoire systémique retrouvée lors des maladies traitées par les anti-TNF peut aussi augmenter l'immunogénicité des biothérapies. En effet, la présence de signaux inflammatoires peut aboutir à une production accrue d'IgG anti-médicament par les lymphocytes B. Les patients MICI ayant un syndrome inflammatoire important visualisé par un taux de CRP élevé ou à l'inverse un taux d'albumine sérique bas ont une clairance de l'infliximab augmentée. La part des ADA dans cette augmentation de clairance n'est cependant pas encore précisée. Dans la PR, les patients qui ont développés des ADA avaient de base une activité de leur maladie plus importante que les patients n'ayant pas développés une immunisation anti-médicament[163].

Le traitement en lui-même peut avoir une répercussion sur la formation des ADA. Il est reconnu que les anti-TNF humanisés sont moins immunogènes que les molécules chimériques bien que la formation d'ADA ait été associée aux 5 anti-TNF disponibles sur le marché . La mauvaise manipulation des produits peut causer une dégradation significative des protéines pouvant aboutir à la formation d'agrégats. Cette mauvaise manipulation peut inclure le non-respect de la température de stockage du traitement, l'exposition à la lumière, une accidentelle congélation-décongélation du produit, ou une agitation de la solution. Ces agrégats protéiques de taille variable peuvent alors stimuler une réponse immunitaire à la fois pour les protéines du soi et du non soi. L'impact de ces agrégats protéines sur l'immunogénicité des anti-TNF n'a pas été prouvé mais l'expérience issue d'autres traitements biologiques suggère que les anti-TNF ne doivent pas être considérés différemment.

Enfin, le schéma thérapeutique en lui-même peut avoir des conséquences sur la formation des ADA. L'essai clinique ACCENT 1 a permis de montrer que la prévalence des ADA lors d'un traitement de maintenance continu par IFX était bien plus faible que pour un traitement épisodique[167]. L'administration régulière d'IFX semble ainsi promouvoir une tolérance immunitaire envers ce traitement. De plus, les patients ayant développés des ADA peuvent voir leur taux diminuer ou disparaître dans le temps. Ainsi, 28% des patients en traitement de maintenance par IFX ont présenté uniquement des ADA de manière transitoire, avec une probabilité plus faible d'arrêt du traitement dans ce groupe de patients[168]. Chez des patients présentant des ADA persistants, ceux-ci disparaissaient entre 6 mois et 3 ans à l'arrêt du traitement[164]. Il est aussi décrit depuis peu des anticorps dirigés contre la région Fab de l'infliximab qui sont pré-existants à l'introduction du traitement[169]. Ces anticorps reconnaissent des séquences communes d'origine murine, engendrent la formation de complexes immuns et augmentent la clairance du traitement. La présence de ce type d'anticorps est associée à une absence d'efficacité de l'infliximab à long terme. En plus du rythme d'administration, la posologie de l'anti-TNF pourrait avoir un impact sur la formation

des ADA. L'utilisation de haute dose d'infliximab est connue pour réduire son immunogénicité et pour induire une tolérance immunitaire par épuisement de la réponse immunitaire. Chez les patients ne recevant que de l'anti-TNF en thérapie, il y a une prévalence 2 fois plus importante d'ADA avec un traitement par 5 mg/kg d'IFX en comparaison avec une dose de 10 mg/kg. De même, une étude prospective sur une cohorte de patients MC a démontré que les patients ayant un taux résiduel d'infliximab mesuré 4 semaines après la première perfusion < 2.5µg/ml avait une valeur prédictive positive de 86% pour le développement ultérieure de haut taux d'ADA[170]. Indépendamment du schéma d'administration des anti-TNF, de nombreuses études ont démontré qu'une association avec des immunomodulateurs réduit le développement des ADA. Chez des patients PR ou MC traités par anti-TNF, une combothérapie avec de l'azathioprine, mercaptopurine, hydrocortisone ou du méthotrexate était associée avec une fréquence moindre de formation d'ADA[171]. Même une fois produits, ces ADA peuvent être réduits par l'ajout d'un immunosuppresseur, augmentant alors le taux d'anti-TNF sérique et la réponse clinique[172].

2.2.2 Réactions liées à l'injection de l'anti-TNF

On distingue classiquement les réactions liées à la perfusion lors de l'administration d'infliximab par voie intraveineuse et les réactions au niveau du site de l'injection pour les autres anti-TNF qui sont injectés par voie sous-cutanée.

Les réactions à la perfusion se présentent en général de 2 manières : les réactions d'hypersensibilité aigues ou retardées. Les réactions aigues sont d'intensité faible à sévère et apparaissent pendant la perfusion ou dans les 2h qui suivent. Au niveau clinique, on retrouve une urticaire, un rash érythémateux, une fièvre, des frissons, une dyspnée et plus rarement un bronchospasme, un œdème pharyngé ou laryngé et une hypotension. Ces réactions aigues surviennent dans approximativement 20% des patients traités par infliximab. Par contre, les réactions sévères ne sont retrouvées que dans moins de 1% des cas. Les réactions d'hypersensibilité retardée se développent 1 à 14 jours après la perfusion d'infliximab et sont similaires à une maladie sérique. Ainsi, les manifestations cliniques regroupent un rash, un prurit, un œdème facial et des mains, une fièvre, une céphalée, une myalgie, polyarthralgie, et des maux de gorge ou une dysphagie. Les taux d'apparition de ces réactions retardées sont plus faibles, de l'ordre de 1 à 2.5% en moyenne. Les mécanismes impliqués dans la survenue de ces réactions à la perfusion peuvent être soit de nature immunologique, avec la présence d'anticorps anti-médicament ou d'autres réactions d'hypersensibilité, soit de cause non immunologique (vitesse de perfusion trop haute, dose de charge..). En effet, les patients ont 2 à 3 fois plus de risque de faire ces réactions si les perfusions sont espacées, si des ADA ont été produits ou si des anticorps anti-nucléaires sont présents. A l'inverse, un traitement immunosuppresseur diminue la fréquence de ces réactions liées à la perfusion[173].

Les taux de réactions locales liées à l'injection sous-cutanée sont d'environ 36% pour l'étanercept, 15% pour l'adalimumab, 6.4% pour le certolizumab et 5.8% pour le golimumab. Il est bien connu que cette incidence est plus élevée parmi les patients ayant développés des ADA[174]. Les symptômes incluent une rougeur, une démangeaison, une douleur, un œdème et une irritation au niveau du site d'injection. Malgré un taux de prévalence élevé, peu de

patients arrêtent le traitement à cause de cet effet secondaire puisque la plupart de ces réactions au site d'injection sont faibles. Elles apparaissent dans les premiers mois de traitement, durent 3 à 5 jours et diminuent en fréquence dans le temps. Le mécanisme d'action de ces réactions inclurait des réactions d'hypersensibilité de type allergique favorisées par le traumatisme local[173].

2.2.3 Infections

Une thérapie par anti-TNF est associée à un risque majoré d'infections d'origine bactérienne, fongique ou virale.

En effet, le TNF est essentiel pour la formation et le maintien des granulomes. Son inhibition peut donc entrainer une augmentation des cas de tuberculose active, une réactivation d'une tuberculose latente ou la survenue d'autres infections granulomateuses fongiques comme l'histoplasmose. Le TNF est aussi indispensable pour l'élimination des agents pathogènes intracellulaires (Listeria, Legionella, Salmonella) puisqu'il participe à l'activation des macrophages et à la formation des phagosomes. Après l'administration d'anti-TNF, une neutropénie peut survenir, exposant alors le patient à certaines infections opportunistes comme l'Aspergillus ou les candidoses. Enfin, le TNF ayant un rôle dans la défense anti-virale avec l'IFNγ, son blocage pourrait induire des complications liées à une infection par les virus de l'hépatite B, C ou le virus VZV par exemple[175].

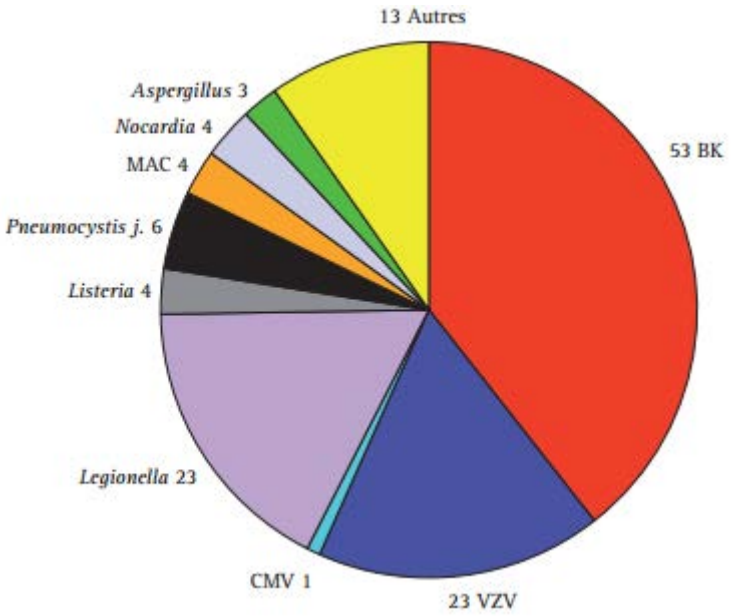


Figure 17: Détail des 134 cas d'infections opportunistes observés quelle que soit l'indication et le type d'anti-TNF, déclarés dans l'observatoire français RATIO entre 2004 et 2007 . BK : bacille de Koch ; VZV : varicella zoster virus ; CMV : cytomégalovirus ; MAC : Mycobacterium avium complex. [176]

La réactivation des infections granulomateuses est une complication grave chez les patients sous anti-TNF. Le risque relatif de développer une tuberculose augmente de 1.6 à 25 fois sous traitement selon le contexte clinique, la molécule utilisée et le pays d'origine du patient. 50% des cas de tuberculose sous anti-TNF sont des formes extra-pulmonaires pouvant se présenter à l'état de maladie disséminée avec une possible atteinte ostéo-articulaire, méningée, du

péritoine, de la plèvre, et du tractus génito-urinaire. Avant le début d'un traitement par anti-TNF, une tuberculose active ou latente soit être recherchée par un interrogatoire, un examen clinique, une radiographie du thorax et par la réalisation d'un test IFNγ IGRA « Interferon Gamma Release Assay » (ou IDR), et traitée selon les recommandations en vigueur en cas de positivité des tests[175].

2.2.4 Tumeurs malignes et troubles lymphoprolifératifs

Dans les phases contrôlées des études cliniques avec les anti-TNF, des tumeurs, notamment des lymphomes, ont été observés parmi les patients ayant reçu un anti-TNF par rapport au groupe contrôle[96]. Il est donc recommandé de faire un suivi régulier des patients pour prévenir la survenue de cancers ou pour les dépister et les traiter le plus précocement possible.
Néanmoins, une méta-analyse récente regroupant 22 essais cliniques et incluant les données de 7000 patients MICI traités par anti-TNF a montré que le risque relatif de développer une tumeur maligne n'était pas statistiquement plus haut dans le groupe anti-TNF que dans le groupe placebo. Ce résultat doit être nuancé puisque les patients ne sont peut-être pas suivis assez longtemps dans ces études pour permettre cette observation[177]. En rhumatologie également, plusieurs méta-analyses ont abouti à des résultats contradictoires vis-à-vis du risque cancéreux chez les patients traités par anti-TNF, la plus récente ne mettant pas en évidence de risque accru dans le groupe traité[178]. Il est intéressant de noter que, si une monothérapie par anti-TNF n'a pas été associée à un risque plus élevé de tumeur maligne, une co-administration d'immunosuppresseurs augmentait le risque d'apparition de carcinome cutanée (non mélanome) et d'autres cancers[179].

2.3 Facteurs prédictifs de non réponse aux anti-TNF

Malgré des résultats encourageants lors des essais cliniques, les traitements par anti-TNF se heurtent en pratique clinique à certaines difficultés : le prix élevé du traitement, l'apparition d'effets secondaires pouvant être graves ainsi qu'une absence de réponse primaire ou secondaire du traitement. Pour pallier à ces inconvénients, le but serait d'optimiser l'utilisation des agents anti-TNF en sélectionnant les patients pour lesquels la probabilité de non réponse est faible. Certains facteurs cliniques, biologiques et notamment immunologiques ainsi que radiologiques ont été étudiés.

2.3.1 Facteurs prédictifs identifiés dans la rectocolite hémorragique

- Paramètres cliniques et épidémiologiques

Plusieurs études ont analysé l'effet que la sévérité de la RCH pourrait avoir sur la réponse clinique après administration d'agents anti-TNF[180]. De manière générale, une majorité d'entre elles montrait que les cas sévères de RCH répondaient moins bien au traitement par anti-TNF. D'un point de vue clinique, le meilleur candidat serait alors un patient présentant une forme modérée à sévère de la maladie sans que la gravité de la pathologie requière une hospitalisation. En plus de la sévérité de la maladie, d'autres paramètres cliniques ont été analysés comme l'âge du patient au diagnostic mais ce facteur reste controversé selon les études. Dans l'essai clinique ACT, le facteur prédictif le plus significatif de colectomie à la

semaine 54 correspondait à une courte durée de la colite inflammatoire avant mise sous infliximab, à savoir une durée inférieure à 3 ans ($p < 0.001$)[181]. Enfin, le degré d'extension de la maladie peut aussi affecter la réponse au traitement. Chez 47 patients RCH sous infliximab suivis au long terme pendant 8 mois en moyenne, seule l'extension de la maladie était corrélée à la réponse clinique ($p = 0.02$)[182]. De même pour un traitement par adalimumab, les patients ayant une colite extensive répondaient de manière moins favorable au traitement[180] .

Une fois le traitement par anti-TNF débuté, les patients présentant une réponse précoce, c'est-à-dire dans les 3 mois, ont plus de probabilité d'être améliorés par le traitement de maintenance à long terme. Cette constatation a été faite à la fois pour l'infliximab et l'adalimumab. Une réponse clinique précoce était retrouvée associée à une rémission clinique à la semaine 54[183], ou à un risque plus faible d'évolution vers une colectomie[184–186]. De même, une amélioration endoscopique précoce conduisait à de meilleurs résultats cliniques ultérieurs ou un risque de colectomie plus faible au long terme[187].

- Indicateurs biologiques

La CRP est le marqueur le plus utilisé en pratique clinique pour définir un syndrome inflammatoire biologique. Ferrante *et al* ont rapporté sur une cohorte de 121 patients RCH traités par infliximab, l'absence de marqueur biologique prédictif d'une réponse clinique à long terme. Néanmoins, une valeur de CRP $\geq$ 5mg/l avant traitement était liée à un risque de colectomie ultérieure ($p = 0.006$)[186]. Plusieurs études ont ainsi relevé une corrélation entre le taux élevé de CRP et le risque de colectomie dans la RCH, bien que le seuil soit différent selon les études[188]. Dans l'essai clinique ACT par exemple, un taux de CRP supérieur à 2 mg/l était significativement associé à une augmentation du risque de colectomie.

Outre le risque de colectomie, un taux de CRP $\geq$ 3mg/dl était prédictif d'une rémission clinique à la huitième semaine chez 134 coréens atteints de RCH et ayant au moins eu une perfusion d'infliximab[189]. Toujours dans cette étude coréenne, un taux de base d'hémoglobine $\geq$ 11.5 g/dl était prédictif d'une bonne réponse à l'infliximab à la semaine 8 ($p = 0.0008$). Ces résultats sont en accord avec un essai clinique multicentrique ayant inclus 191 patients RCH traités par infliximab[188]. Une hémoglobine avant traitement $\leq$ 9.4g/dL prédisait une absence de réponse primaire à l'infliximab. Selon les critères de Truelove, un taux d'hémoglobine bas indique une forme sévère de RCH. Un taux normal avant mise sous anti-TNF correspondrait alors à des formes plus modérées de la maladie, connues pour mieux répondre au traitement.

La concentration sérique en albumine influence la pharmacocinétique des anti-TNF. En effet, des données issues de 2 essais cliniques incluant au total 728 patients RCH traités par infliximab montrent que les patients ayant des taux plus hauts en albumine sérique maintiennent des taux résiduels d'infliximab plus élevés, ont une clairance de l'infliximab plus faible et ainsi une demi-vie du médicament plus longue. Ainsi, les patients avec un taux sérique bas d'albumine ont des concentrations en infliximab abaissées et des taux de réponse clinique plus faible. Le dosage de l'albumine sérique pourrait donc servir de marqueur prédictif de réponse aux anti-TNF grâce à l'indication qu'il donne sur sa pharmacocinétique[190].

Chez les patients répondeurs, on note également une chute rapide des marqueurs biologiques de l'inflammation comme la CRP[183,191] ou la calprotectine fécale[192] après le début du traitement. Une baisse précoce de la calprotectine fécale à la semaine 2 prédisait une rémission endoscopique de la RCH. A la semaine 10, les concentrations de calprotectine fécale corrélaient avec la rémission à la fois clinique (score Mayo) et endoscopique.

La RCH est caractérisée classiquement par la présence d'anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles de type péri-nucléaire (p-ANCA). L'absence de ce type d'anticorps est liée à une meilleure efficacité de l'infliximab dans 2 études cliniques[193,194]. A l'inverse, un statut sérologique ANCA+/ASCA- était faiblement corrélé à des taux de réponse clinique plus faible.

L'inflammation intestinale retrouvée dans la RCH fait intervenir l'immunité adaptative, avec une augmentation des cytokines des voies de signalisation Th1, Th2 et Th17. Un dosage local de l'IFNγ (voie Th1) et de l'IL-17A (voie Th17) dans des biopsies de 74 patients RCH a permis de montrer que des taux élevés de ces 2 cytokines étaient associés à une rémission clinique après 3 perfusions d'infliximab[195]. Par contre, les cytokines des voies Th2 (IL-4, 6, 10) et des LTreg (IL-10, TGF-β) n'étaient pas corrélés à un certain pronostic clinique malgré leur surexpression par rapport au groupe contrôle[195].

Pendant la phase active de la maladie, de nombreux médiateurs pro-inflammatoires sont exprimés dans la muqueuse intestinale, notamment et bien évidemment le TNF. Celui-ci a donc été étudié en tant que facteur prédictif de réponse aux anti-TNF. Olsen *et al* ont montré qu'un taux élevé de TNF retrouvé au niveau des biopsies intestinales de 59 patients RCH était le seul facteur prédictif de rémission clinique et endoscopique à l'infliximab ($p = 0.01$ et $p = 0.003$ respectivement)[196].

Les répondeurs à l'infliximab sont aussi caractérisés pendant le traitement par une augmentation du nombre de lymphocytes T régulateurs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ ou $CD4^+CD25^-Foxp3^+$ au niveau de la circulation sanguine ($p < 0.05$) avec en parallèle une diminution de ce type cellulaire dans la muqueuse intestinale ($p < 0.001$). Le traitement par infliximab induit donc une redistribution des lymphocytes T régulateurs chez les répondeurs. La durée de la réponse clinique à l'infliximab était associée à une élévation périphérique durable de cette population lymphocytaire[197].

- Marqueurs génétiques

Une étude génomique étendue sur puces ADN affymétrix a été réalisée sur des biopsies de la muqueuse colique de patients RCH ayant reçu un traitement d'induction par infliximab. L'analyse de ces puces montre plusieurs gènes dont l'expression est significativement différente entre les répondeurs et les non-répondeurs. Les 5 gènes les plus différemment exprimés entre les 2 groupes étaient les gènes ostéoprotégérine, stanniocalcine-1, la prostaglandine-endoperoxyde synthase 2, le récepteur de l'interleukine 13 alpha 2 et l'interleukine 11. L'ensemble de ces gènes est impliqué dans la réponse immunitaire adaptative. La sensibilité et la spécificité pour prédire la réponse au traitement sont de 95% et 85% respectivement, en se basant sur ce profil génétique[198].

L'intérêt de la recherche de polymorphismes génétiques pour connaître la réponse possible aux anti-TNF dans la RCH reste encore mal connu et dans la pratique difficile à mettre en place. A l'heure actuelle, il a seulement été rapporté dans la littérature l'association entre des variants du gène du récepteur de l'IL-13 et une plus grande probabilité de réponse à l'infliximab[194].

- Marqueurs relatifs au traitement

Plusieurs études ont mis en évidence l'importance d'un traitement précédent par immunosuppresseur (stéroïde ou cyclosporine) comme facteur de risque de chirurgie et notamment de colectomie dans la RCH[181,186,188]. Néanmoins, l'interprétation de ces données cliniques doit prendre en compte le degré de gravité de la pathologie qui est plus important chez les patients ayant reçu des immunosuppresseurs. Comme la sévérité de la maladie est corrélée à une plus faible réponse clinique, les résultats sur l'administration au préalable de stéroïdes ou de cyclosporine peuvent alors refléter uniquement la gravité de la maladie.

Par ailleurs, pour les patients ayant bénéficiés d'un traitement par adalimumab après un premier agent anti-TNF, l'efficacité du traitement sera affectée par la réponse antérieure à l'infliximab. Ainsi, chez 48 patients RCH, une réponse clinique précoce à la semaine 12 était plus fréquente pour les patients ayant atteint une rémission clinique lors de leur traitement par infliximab[199] ($p = 0.01$).

Enfin, des travaux récents soulignent l'importance du taux résiduel d'infliximab ou d'adalimumab ainsi que la formation d'anticorps anti-médicaments dans l'efficacité thérapeutique de ces traitements. Des concentrations plus élevées d'infliximab (> 0.5 µg/ml) avec des taux bas d'anticorps (< 10 U/ml) étaient mesurées chez les patients présentant une réponse clinique prolongée à l'infliximab[200].

2.3.2 Facteurs prédictifs identifiés dans la maladie de Crohn

- Marqueurs cliniques

A l'inverse de la RCH, le tabagisme est connu pour être un facteur important d'aggravation de la MC puisqu'il augmente les risques de chirurgie et de récidives avec un taux d'environ 60% chez les fumeurs contre 20% chez les non-fumeurs. De même, les patients tabagiques nécessitent souvent une escalade thérapeutique afin d'atteindre une rémission clinique. En ce qui concerne son rôle dans l'efficacité des anti-TNF, les avis sont moins unanimes. Une première étude sur 30 patients MC traités par adalimumab suggère que les fumeurs ont moins de probabilité de répondre que les non-fumeurs, avec une tendance entre les taux de réponse et le nombre de cigarettes fumés par jour ($p = 0.064$)[201]. Il faut noter que cette étude ne comportait que 2 patients non répondeurs, ce qui pouvait interférer sur les conclusions décrites. En effet, le tabagisme n'est pas retenu en tant que facteur prédictif de réponse aux anti-TNF dans des cohortes plus importantes traitées par infliximab[202,203]. Au niveau clinique, les facteurs associés à une bonne réponse à l'infliximab incluaient la forme clinique de colite isolée et le traitement concomitant par immunosuppresseurs. A l'inverse, les formes d'iléites isolées, l'âge, ou une chirurgie antérieure étaient liés à un pronostic moins favorable sous traitement à court terme[203]. En pédiatrie, un faible indice de masse corporel au diagnostic,

l'impossibilité d'utiliser une combothérapie et une élévation de la CRP après induction marquaient les pertes de réponse au traitement[204]. Aucune implication des paramètres d'atteinte buccale (dentaire, parodonte et muqueuse orale) n'a pu être montrée dans l'efficacité des anti-TNF[205]. Par contre, l'ethnie pourrait avoir un rôle, la MC apparaissant souvent sur un terrain génétique prédisposant. Il a été récemment montré que les juifs ashkénazes semblaient moins disposer à développer d'ADA et ainsi être protégés d'un échec thérapeutique[202]. Au niveau radiologique, le score simple endoscopique à 3 mois après induction d'infliximab ou d'adalimumab prédisait la réponse à plus long terme (1 an), avec une sensibilité de 88% et une spécificité de 64%[206].

- Marqueurs biologiques

Comme pour la RCH, le taux de base de la CRP et son évolution sous traitement ont été étudiés dans le cadre de la réponse thérapeutique, la CRP étant déjà un marqueur de l'inflammation largement utilisé dans la MC. Une concentration élevée en CRP avant traitement a souvent été liée à une meilleure réponse à l'infliximab[207,208]. L'intérêt le plus généralement admis est néanmoins la valeur de la CRP après induction de l'anti-TNF : une diminution ou une normalisation de la CRP est associée à une réponse ou une rémission clinique à long terme ainsi qu'à une cicatrisation muqueuse au niveau endoscopique[207–210]. La CRP reste élevée pour les patients en perte de réponse secondaire au traitement[208].

D'autres marqueurs de la réponse inflammatoire ont été également évalués. En premier lieu, le taux de TNF au niveau de la muqueuse intestinale des patients MC. Des taux élevés de ce paramètre évalué localement sur biopsies avant traitement indiquaient un effet favorable des anti-TNF par la suite, et une rémission à long terme[211,212]. Récemment, l'évaluation de ce marqueur *in vivo* est rendu possible grâce à l'application topique d'adalimumab couplé à un fluorochrome (FITC) (Fig.18). La florescence est alors détectée par un laser confocal en endomicroscopie et correspond aux cellules exprimant le TNF. Ces premiers résultats d'images moléculaires par anticorps fluorescents sont encourageants dans la prédiction de réponse à l'adalimumab[213].

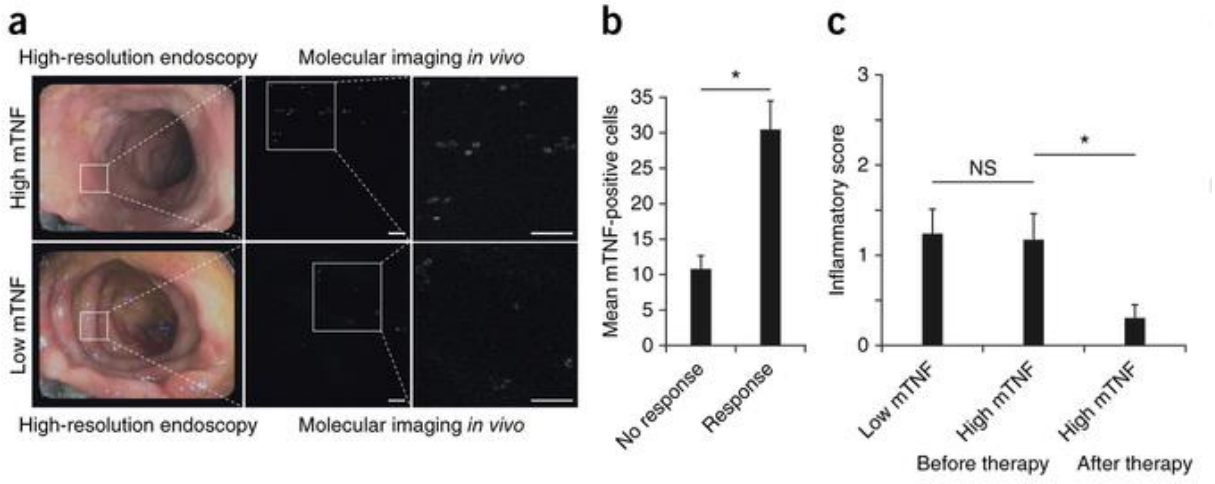


Figure 18: Evaluation du TNF muqueux *in vivo* et corrélation de ce taux avec la réponse clinique[213].

En plus du TNF, l'expression d'autres marqueurs réalisés sur des biopsies intestinales ont été dosés par PCR. Les transcrits d'IL-18, MRP14, et d'IL-8 étaient corrélés significativement avec la rémission clinique à long terme, le TNF restant tout de même le marqueur le plus important[211].

L'interleukine 15 joue un rôle majeur dans l'activation du système immunitaire innée et adaptatif. Bien que son rôle dans la physiopathologie de la MC soit encore mal défini, certains modèles animaux de colite inflammatoire ont une amélioration de leur état et de meilleurs taux de survie en cas de déficit d'IL-15, que ça soit par délétion génétique ou par neutralisation. Chez les patients MC, les taux d'IL-15 avant infliximab étaient plus élevés chez les répondeurs que chez les non-répondeurs, avec une diminution du taux en cas d'efficacité du traitement. L'infliximab induit aussi la libération du récepteur α de l'IL-15, antagoniste de l'IL-15, dont les taux sont ainsi retrouvés plus élevés chez les répondeurs[214].

Aucune incidence des anticorps p-ANCA et ASCA n'a pu être démontrée pour la réponse aux anti-TNF dans la MC, à l'inverse de la RCH[215].

La question de facteurs prédictifs de rechute après arrêt de l'anti-TNF est aussi importante. A l'heure actuelle, une étude a montré qu'une augmentation de l'expression de TNF, IL-17 et de FOXP3 prédisait la rechute clinique avant 26 semaines après discontinuation de l'anti-TNF. Au contraire, une normalisation du TNF et de l'IL-17 était le signe d'une rémission clinique à long terme[216]. Le syndrome inflammatoire biologique réapparait donc avant la rechute clinique.

- Marqueurs génétiques

Le gène NOD2/CARD15 est le premier gène de susceptibilité découvert pour la MC, et représente le facteur de risque le plus important avec un risque x40 en cas de mutation homozygote. Des mutations de ce gène ont déjà été décrites comme facteurs prédictifs péjoratifs de réponse aux corticostéroïdes dans la MC[217]. L'ADN de patients MC traités par infliximab a donc été collecté dans 3 cohortes différentes et génotypé pour les 3 variants majeurs de NOD2/CARD15 qui sont associés à la MC : les mutations faux sens R702W (SNP8) et G908R (SNP12) et la mutation par insertion 1007fs (SNP13) (Fig.19). Aucune association de ces variants avec la réponse à l'infliximab n'a été démontrée dans les différentes cohortes[218,219]. De même pour l'adalimumab, ces 3 variants de NOD2/CARD15 n'étaient pas liés à la réponse thérapeutique, de même que les mutations Asp299Gly du TLR4 et le polymorphisme nucléotidique (SNP) C/T du CD14[220].

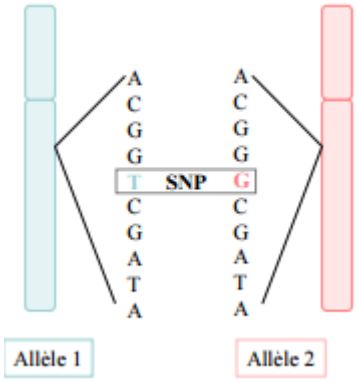


Figure 19: Représentation schématique d'un « Single Nucleotide Polymorphism » (SNP).

Le gène FCGR3A code pour le récepteur FcγRIIIa (CD16) situé sur les macrophages, les monocytes et les cellules NK. Ce récepteur permet de lier les anti-TNF ayant fixé du TNF membranaire et de déclencher une lyse de la cellule sécrétrice du TNF (ADCC) (Fig.20). Il existe 2 allotypes de ce gène secondaire à la présence d'une acide aminée phénylalanine (F) ou valine (V) en position 158 ; l'allotype V étant de plus haute affinité pour les IgG1 que l'allotype F.

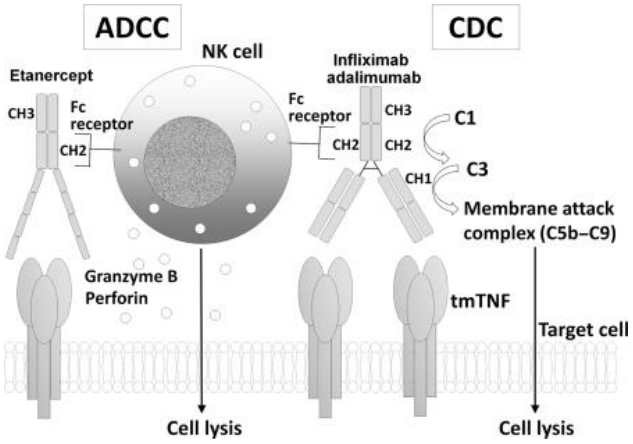


Figure 20: Représentation du mécanisme d'action ADCC et CDC dans les anti-TNF[221]

L'étude des polymorphismes du gène FCGR3A a montré leur influence dans la réponse biologique aux anti-TNF avec une diminution de la CRP qui est plus importante chez les patients porteurs des allèles V/V[222–224]. Ces variants affectent l'affinité de liaison de l'infliximab aux cellules NK et l'activité ADCC *in vitro*[222]. Malgré l'impact sur le plan biologique, aucune conséquence clinique sur l'efficacité de l'infliximab n'a été rapportée[223,224].

Les gènes FCGR3A et le gène de la CRP étant sur le même locus, un déséquilibre de liaison entre les 2 gènes a été recherché sans succès. Les polymorphismes du gène de la CRP n'ont pas été associés à la réponse aux anti-TNF[225], de même pour le SNP 308 du promoteur du gène du TNF[226]. D'autres polymorphismes du TNF (rs1568885 et rs1813443) ont par contre été confirmés dans la réponse clinique et biologique à l'infliximab[227].

Dans la MC, certaines cellules inflammatoires sont insensibles aux stimuli apoptotiques. Comme l'induction de l'apoptose est un important mécanisme d'action de l'infliximab, 21 polymorphismes liés à ce phénomène ont été étudiés chez 287 patients MC. Des mutations des gènes du système FasL/Fas et de la caspase 9 influencent la réponse à l'infliximab, avec une plus forte association retrouvée entre le génotype Fas ligand -843 TT et la non-réponse au traitement[228].

Enfin, une étude pan génomique a été réalisée pour définir une signature génétique de réponse aux anti-TNF dans les formes de colite ou d'iléite de la MC. Parmi les gènes différemment exprimés entre les répondeurs et les non-répondeurs, 5 permettent une complète séparation des 2 groupes présentant une colite (TNFAIP6, S100A8, IL11, G0S2, et S100A9). Par contre, aucun gène de prédiction n'a pu être mis en évidence pour les patients ayant une iléite[229]. Ces données génétiques sont prometteuses mais leur réalisation reste encore difficile en pratique courante à l'heure actuelle.

2.3.3 Facteurs prédictifs identifiés dans la polyarthrite rhumatoïde

- Paramètres cliniques et radiologiques

Plusieurs paramètres cliniques ont été inversement corrélés à la réponse clinique aux anti-TNF dans la PR. On peut citer une forte activité de la maladie[230], un handicap fonctionnel important, le nombre d'articulations douloureuses, le nombre de traitement de fond en cours ou ayant été pris[231] et un indice de masse corporel (IMC) élevé[232–235]. En effet, l'obésité semble plus influencer la réponse à l'infliximab, seule molécule dont la concentration administrée dépend du poids, par rapport à l'étanercept ou à l'adalimumab[236]. Un fort tabagisme actif était également lié à une mauvaise réponse clinique selon les critères de l'EULAR ainsi qu'à un arrêt prématuré du traitement[232,235,237].

Récemment, une étude a mis en évidence le rôle de la maladie parodontale dans la perte d'efficacité des agents anti-TNF. Le maintien de l'activité de la PR pourrait être expliqué par l'inflammation systémique engendrée par cette infection locale du parodonte ou par la réaction immunitaire envers les pathogènes oraux et leurs toxines[238].

Les facteurs prédictifs de réponse aux anti-TNF pourraient être influencés par le degré de sévérité de la PR. Une étude italienne incluant 1300 patients PR a montré que les patients ayant une activité modérée de leur pathologie (DAS 28 entre 3.2 et 5.1) n'avaient comme facteur prédictif de réponse que le sexe masculin. En plus de ce facteur, une réponse clinique était atteinte dans les maladies fortement actives (DAS 28 > 5.1) lorsque l'âge de début du traitement était bas, s'il n'y avait pas de comorbidités associées, ou si des corticostéroïdes n'avaient pas été utilisé auparavant[239].

- Indicateurs biologiques

La plupart des biomarqueurs dosés en pratique courante dans le suivi des patients atteints de PR n'ont pas réussi à clairement démontrer leur utilité dans la prédiction de la réponse clinique aux anti-TNF. En effet, la CRP, les facteurs rhumatoïdes (FR) et les anticorps anti-peptides cycliques citrullinés (anti-CCP) ont été évalués et aboutissent à des résultats

hétérogènes. Une méta-analyse en 2013 a échoué à démontrer l'influence du taux de base des FR IgM dans la réponse clinique aux anti-TNF[240]. Par contre, une diminution du taux de CRP à la semaine 4 prédisait une efficacité du traitement jusqu'à la semaine 48 chez les patients PR bénéficiant de ce type de traitement[230]. Même si d'autres études sont nécessaires pour confirmer ces données, il semblerait que les anticorps anti-Ro/SSA, les anti-nucléaires dont le taux dépasse 160 avant traitement ou augmente sous anti-TNF et le développement d'anticorps anti-ADN natif pourraient être liés à une faible efficacité du traitement[241,242].

Le monitoring des taux d'anti-TNF et des anticorps anti-médicaments a démontré un certain intérêt dans le suivi des patients PR. En effet, la présence d'ADA est associée à de plus faible réponses cliniques selon les critères de l'EULAR ainsi qu'à des taux abaissés d'anti-TNF. Les taux résiduels de médicaments sont corrélés à la diminution du DAS28, avec un seuil « cut-off » optimal dans cette étude de 1.274 µg/ml pour l'adalimumab et de 1.242 µg/ml pour l'étanercept pour prédire une bonne réponse clinique à 6 mois[243]. Ces seuils sont bien sûr dépendants de la technique utilisée. Cependant, de manière générale, une méta-analyse de 2013 conclut à une réduction de la réponse aux anti-TNF lors de la présence d'ADA, malgré la forte hétérogénéité des études incluses[244]. Cet effet des ADA sur la réponse thérapeutique était variable selon le diagnostic envisagé (PR *vs* autres pathologies).

De nombreuses protéines voient leur taux se modifier sous traitement par anti-TNF. Les cytokines sont particulièrement touchées, comme le TNF, l'IL 1β, l'IL-6, l'IL-10 et l'IFNγ mais également les chimiokines tels l'IL-8 et le « Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1). Dans les paramètres plus spécifiques de l'atteinte articulaire, les métalloprotéinases matricielle (MMP), notamment les MMP-1 et MMP-3, les marqueurs du remodelage osseux, les marqueurs de l'activité de la synoviale ou de la dégradation du cartilage varient au cours du traitement[245]. Toutefois, malgré ces variations de concentration, leur taux de base n'a pas réussi à prédire la réponse clinique aux anti-TNF.

Sous infliximab, une amélioration de l'anomalie fonctionnelle des Th1 dans le sang circulant a été observée. Les répondeurs aux anti-TNF voyaient clairement l'expression sérique de l'interféron (IFN) augmenter, contrairement aux non-répondeurs. Ce gain fonctionnel apparaissait lié à l'amélioration clinique de la PR[246]. Néanmoins, la balance Th1/Th2 au début du traitement et son évolution sous infliximab n'étaient pas prédictifs de la réponse clinique[245].

A l'inverse, des taux élevés de survivin avant traitement semblent prédire une mauvaise réponse à l'infliximab. L'expression de la survivin est généralement associée à la prolifération cellulaire et à la croissance tissulaire[247]. Des résultats similaires sont rapportés pour des taux élevés d'ARNm d'ADAMTS5, enzyme clivant l'aggrecane, un protéoglycane du cartilage[248].

Puisque l'IFN de type 1 plasmatique est variablement exprimé parmi les patients PR, une étude a analysé, sur 35 patients traités par anti-TNF, l'activité de l'IFN et des taux plasmatiques de IL-1ra, protéine inhibant l'IL-1 connue pour être induite par l'IFNβ. Certains patients ont donc présenté une activité élevée de l'IFN qui était associée à une réponse favorable aux anti-TNF. Par ailleurs, les meilleures réponses cliniques étaient observées pour une activité élevée de la forme d'IFNβ avant traitement plutôt que de l'IFNα. Les taux d'IL-

1Rα pouvaient servir de facteur prédictif complémentaire[249]. Pendant le traitement, les patients PR présentant une augmentation de l'expression du gène de l'IFN 1 à 2 mois après le début de l'anti-TNF présentaient une mauvaise réponse clinique. L'activité de base des gènes de l'IFN n'était par contre pas prédictive de l'évolution des patients sous traitement[250].

Au niveau local, l'expression synoviale du TNF, LTA, IL-1β, IL-1α, IL-1 receptor antagonist (IL-1Rα), IL-6, IL-10 or IL-18 a été exploré mais l'ensemble de ces paramètres a échoué à prédire la réponse aux anti-TNF[245].

- Approche protéomique et transcriptomique (Figure 39)

Seulement 4 études protéomiques réalisées grâce à des technologies différentes sur sérum ont retrouvé certaines protéines sériques ou des signatures protéiques associées à la réponse aux anti-TNF dans plusieurs populations PR. La première a caractérisé l'apolipoprotéine A-1 dont l'élévation était retrouvée chez les répondeurs à l'inverse du facteur plaquettaire 4 (PF4) qui était plus haut chez les non-répondeurs. Le MCP-1 et le facteur de croissance épidermique ont, quant à eux, étaient associés en cas de surexpression à la réponse à l'étanercept à 3 mois chez 33 patients PR. Une signature prédisant la réponse clinique à l'étanercept a également été mise en évidence grâce à la combinaison de 24 biomarqueurs dont le MCP-1 et les anti-CCP dans une 3ème approche protéomique[245]. La dernière étude souligne l'abondance de 14 protéines chez les patients non répondeurs à l'infliximab, notamment des apolipoprotéines, des composants du système du complément ainsi que des protéines de la phase aigüe de l'inflammation[251] (Fig.21).

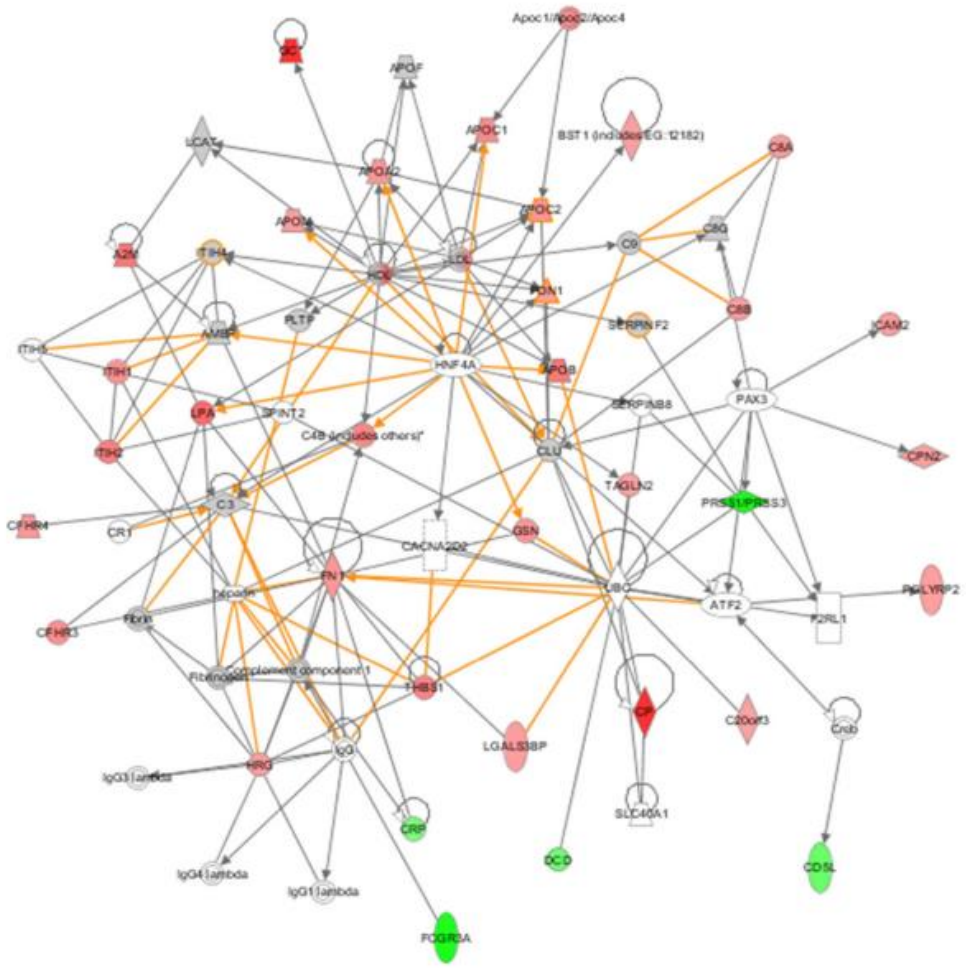


Figure 21: Analyse des interactions des protéines présentant une différence quantitative entre les patients PR répondeurs et non répondeurs à l'infliximab. Les protéines avec un ratio répondeur/non répondeur > 1.5 sont en vert ; le ratio inverse est représenté en rouge[251].

En dehors du sérum, des prélèvements urinaires ont été testés dans une seule étude protéomique qui retrouve un métabolite en particulier, l'histamine, pour discriminer les répondeurs des non répondeurs aux anti-TNF[252]. La signification de ces marqueurs protéiques dans la physiopathologie de la PR reste mal connue. Cependant, le MCP-1 pourrait corréler avec la forte réduction des monocytes dans les tissus synoviaux après la première perfusion d'infliximab. L'apolipoprotéine A-1 est connue pour diminuer l'expression de MCP-1 et ainsi le chimiotactisme des monocytes. Ces résultats montrent la pertinence de ces études protéomiques dans la mise en évidence de marqueurs propres à la réponse aux anti-TNF. Elles ne forment par contre qu'une première étape d'identification qui nécessite une confirmation sur de plus grandes cohortes avant leur utilisation en pratique courante.

Au niveau génomique, l'analyse de l'étendue du transcriptome est rendue possible et a pu être réalisée grâce à la technologie des puces ADN/ARN. Néanmoins, les résultats sont souvent hétérogènes, en grande partie par la variabilité des méthodes employées : type cellulaire étudié, puce à ADN utilisé et évaluation clinique réalisée. En utilisant les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) de patients PR traités par infliximab, 41 transcrits ont d'abord été identifiés pour discriminer les répondeurs des non répondeurs dans une étude

préliminaire sur un faible nombre de sujets. L'association de 20 de ces transcrits avec la réponse clinique à l'infliximab a ensuite été confirmé sur une cohorte de 20 patients avec une sensibilité de 90% et une spécificité de 70%[245253] (Fig.22).

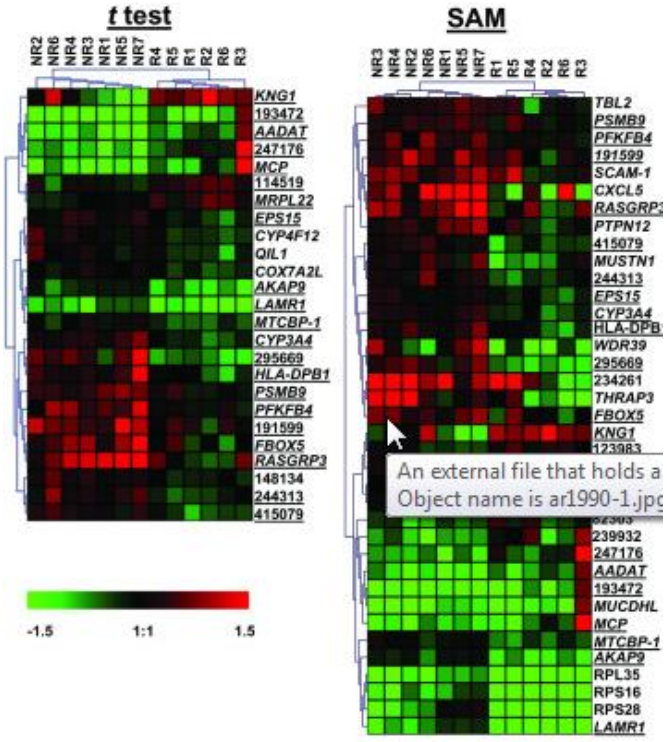


Figure 22: Signature des transcripts au niveau des PBMC de 6 patients PR répondeurs (R) et 7 non répondeurs (NR). Les taux de transcrits sont exprimés en ratios, diminués en vert, augmentés en rouge et identiques en noir[253].

Les résultats concernant la réponse clinique à l'étanercept sont controversés : un premier groupe de 40 gènes isolés de monocytes et qui étaient retrouvé associés à la réponse au traitement n'ont pas été confirmés sur des PBMC.

Cette étude des transcrits peut également être ciblée sur un gène en particulier. Bien évidemment, l'expression du gène du TNF a d'abord été analysée dans le sang total. A l'instar du niveau protéique, le taux de base des transcrits du TNF n'était pas associé à la réponse clinique. Par contre, un haut niveau d'expression de synovioline, une ubiquitine ligase impliquée dans la survie cellulaire et la physiopathologie de la PR, était lié à une mauvaise réponse à l'infliximab[245]. De manière générale, les non-répondeurs à une combothérapie méthotrexate et anti-TNF ont un profil pro-inflammatoire caractérisé par l'augmentation de l'expression de la chimiokine CCL4, des lymphocytes activés, et des cellules présentatrices de l'antigène (CD83). Le gène BCL2A1 impliqué dans l'inhibition de l'apoptose est réprimé chez les répondeurs[254].

Au niveau du synovium, le profil transcriptomique de biopsies synoviales obtenues chez 62 patients PR avant le début d'un traitement par infliximab n'a pas démontré d'intérêt pour prédire les non-répondeurs[255]. Néanmoins, une surexpression d'un certain nombre de gènes dans ce tissu a parfois été attribuée à la réponse thérapeutique, notamment des gènes

impliqués dans la division cellulaire et la régulation des réponses immunitaires (IL-7R, CXCL11, IL-18, IL-18rap, MK167)[245].

- Marqueurs génétiques

L'association génétique entre des gènes localisés dans la région HLA et la susceptibilité de développer une PR a été démontrée depuis de nombreuses années et consiste principalement en la présence d'un épitope partagé ou shared epitope (SE) au niveau du locus HLA-DRB1. Si la présence du SE est aussi liée à la sévérité de la maladie, plusieurs études ont par contre échoué à montrer son intérêt dans la prédiction de la réponse aux anti-TNF[245]. Par contre, des données préliminaires suggèrent le rôle d'une combinaison KIR-HLA activatrice des cellules NK par la présence de KIR2DS2 et de l'homozygotie HLA-C1 ou C2 dans la meilleure réponse aux anti-TNF[256].

Plusieurs polymorphismes nucléotidiques (SNPs) du TNF ou de ses récepteurs ont été étudiés dans ce même but mais les résultats ressortent de manière contradictoire. Le rôle potentiel du génotype TNFA -308GG a fait l'objet d'une première méta-analyse en 2010. Celle-ci regroupait 12 études portant sur la recherche de ce polymorphisme chez des patients PR caucasiens traités par anti-TNF. Aucun effet du polymorphisme du promoteur TNFA −308G→A n'a pu être confirmé[257]. Cette conclusion est remise en question par une nouvelle méta-analyse en 2013 incluant 3 études en plus. Les patients présentant l'allèle TNFA -308GG répondrait mieux au traitement par anti-TNF[258]. Des résultats contradictoires ont été rapportés également pour les polymorphismes TNFA -238GG et TNFA -857CC[245].

Concernant les gènes codant pour les récepteurs du TNF, certains SNPs ont été analysés : TNFRSF1A à la position -609, -580, -383, +36; et TNFRSF1B à la position+676. La majorité des études s'est concentrée sur ce dernier polymorphisme puisqu'il a été décrit auparavant comme un gène de susceptibilité et de sévérité de la PR. Même si certaines études ont lié ce polymorphisme à une mauvaise réponse à l'infliximab et l'étanercept, ces résultats n'ont pas été confirmés sur des cohortes plus importantes. De même, les polymorphismes nucléotidiques TNFRSF1A -609, -580, -383, +36 n'ont pas été discriminants en termes de facteur prédictif de réponse à l'infliximab ou à l'étanercept[245]. Le récepteur TNFR-1, comme le Tumor Necrosis Factor–related Apoptosis-inducing Ligand Receptor 1 (TRAIL-R1), contiennent un domaine de mort cellulaire cytoplasmique pouvant engendrer une apoptose par voie extrinsèque. Le rôle d'un polymorphisme au niveau de ces récepteurs de mort programmée dans la réponse aux anti-TNF a été étudié chez des patients PR. Les patients avec le génotype TRAILR1 CC atteignaient une meilleure réponse clinique à 3 et 6 mois que les patients avec le génotype CG ou GG. A l'inverse, le TNFR1A AA et l'allèle A étaient associés à une non réponse à 3 mois selon les critères de l'EULAR[259].

La majorité des anticorps anti-TNF disponibles pour le traitement des maladies inflammatoires contiennent une fraction Fc. Un polymorphisme au niveau des récepteurs des fractions Fc pourrait augmenter ou diminuer l'affinité du récepteur pour ces immunoglobulines et ainsi affecter l'efficacité des thérapies basées sur l'utilisation d'anticorps. Les génotypes FCGR3A 158FF et FCGR2A 131RR correspondant à des récepteurs de faible affinité ont été associés à la réponse ACR 50 à la semaine 6 et ACR 20 à

la semaine 30 chez des patients PR sous infliximab[260]. Le même génotype FCGR3A 158FF est ressorti en tant que marqueur de bonne réponse aux anti-TNF dans une autre étude nord-américaine, de même que le polymorphisme FCG3AV158F[261]. D'autres SNPs, quant à eux, ne sont pas associés à la réponse aux anti-TNF, comme les FCGR2A H131/R131, FCGR3A 176F/176V, FCGR3B NA1/NA2 et FCGR3A V212F[245].

En plus du gène du TNF, d'autres polymorphismes concernant les cytokines et leurs récepteurs ont été explorés afin de prédire la réponse aux anti-TNF. Des SNPs isolés de l'IL-10, TGFB1, IL1B et de l'IL1RN n'ont pas été associés à la réponse thérapeutique. Par contre, une combinaison de certains allèles, notamment le codon 25 du gène TGFB1 et l'allèle A2 de l'intron 2 du gène de l'IL1RN, était associée à une mauvaise réponse à l'étanercept. Concernant l'IL-6 et son récepteur, une étude portant sur 1050 patients PR recevant de l'infliximab, de l'adalimumab et de l'étanercept n'a pas trouvé de relation entre le SNP sIL-6R A358C et la réponse au traitement. Toutefois, un plus grand nombre de répondeurs était présent parmi les patients avec le génotype -174GG IL-6 en comparaison des génotypes -174GC or CC, pouvant laisser supposer que ce polymorphisme -174G/C du gène de l'IL-6 pourrait représenter un marqueur génétique de réponse à l'étanercept dans la PR[262].

Des gènes de susceptibilité de la PR ou liés à la réponse immunitaire ont été aussi sélectionnés dans ces études de pharmacogénétiques. Le CD6 est un marqueur de surface cellulaire jouant un rôle important dans le développement et l'activation lymphocytaire. Une insertion de 19 paires de base à l'intérieur du gène CD6 est associée à une bonne réponse clinique par rapport aux non répondeurs ou aux patients présentant une réponse modérée. Un microsatellite dans la « syntaxine bining protein 6 » (STXBP6), intervenant au niveau de la phagocytose, serait pareillement lié à la réponse clinique[263]. Par ailleurs, 7 SNPs retrouvés dans 5 gènes de la voie de signalisation cellulaire des MAP kinases auraient un impact sur l'amélioration du DAS28 à 6 mois chez des patients PR ($p < 0.1$), avec 1 SNP (rs2716191 dans le MAP2K6) corrélé à la réponse clinique EULAR. Ces SNPs auraient un plus grand impact sur la réponse aux anticorps monoclonaux comme l'infliximab et l'adalimumab plutôt qu'à l'étanercept[264], mais ces résultats nécessitent d'être vérifiés dans des études ultérieures. Le génotypage de 18 SNPs de 1012 patients PR traités par infliximab, adalimumab et étanercept ne retrouve qu'une faible association entre la réponse clinique et des SNPs sur les gènes AFF3 et CD226. Le gène AFF3 code pour une famille de facteurs de transcription que l'on pense être impliqué dans le système lymphoïde et le gène CD226 pour une protéine membranaire exprimée à la surface des cellules hématopoïétique impliquée dans le déclenchement de la cytotoxicité des lymphocytes T et NK[265]. Enfin, plusieurs SNPs situés sur les gènes des toll like récepteur (TLR) ou de la voie de signalisation NFκB a démontré une association avec la réponse clinique, en particulier à l'étanercept, mais aussi à l'ensemble des anti-TNF[266].

Peu d'études ont été réalisées sur l'ensemble du génome grâce à l'utilisation de puces ADN (Illumina ou Affymetrix principalement). A l'instar de l'approche transcriptomique, cette technique est intéressante pour dépister à grande échelle certains SNPs pouvant être reliés à la réponse aux anti-TNF dans la PR, même si ces premiers résultats doivent toujours être confirmés par la suite sur de larges cohortes. Les données issues de ces études génomiques ne

sont pas consensuelles à l'heure actuelle et plusieurs polymorphismes différents sont mis en avant, bien que non confirmés. Ainsi, une première approche pan génomique a mis en évidence l'intérêt de multiples polymorphismes nucléotidiques au niveau des gènes v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (MAFB), de l'IFN de type 1, de l'IL-10 et de la paraxonase 1 pour des patients traités par infliximab, adalimumab et étanercept. Cependant, 16 des SNPs les plus fortement associés à la réponse thérapeutique dans cette étude exploratoire n'ont pas ensuite prouvé leur importance dans une cohorte de 151 patients PR[267]. De même concernant 7 autres SNPs (*PTPRC*, *CD226*, *AFF3*, *MyD88*, *CHUK*, *TRAF1-C5* et *STAT4),* leur validation dans une cohorte grecque a échoué[268] alors qu'ils avaient été précédemment décrits[266,269]. Des résultats différents peuvent être notés selon l'anti-TNF étudié, avec par exemple une association avec le locus 1q23/CD84 retrouvée uniquement chez des patients sous étanercept et non sous infliximab ou adalimumab[270]. De nombreux autres polymorphismes sont potentiellement différents entre les répondeurs et les non-répondeurs : notamment certains reliés à la voie de signalisation de l'IFN[271] (IFI44, IFI44L, IFIT1, IFIT2 and IRF2) ou au facteur de transcription FOXP1 impliqué dans la lymphopoïèse B selon le statut des facteurs rhumatoïdes des patients[272]. Cette dernière étude ne retrouvait pas l'association entre la réponse clinique et les SNPs précédemment décrits. La validité d'une série de 20 gènes initialement rapportés par l'équipe de Lequerré *et al* a été confirmée avec une sensibilité de 71% et une spécificité de 61%[245,273]. Bien qu'encourageantes, ces données sont encore insuffisantes pour permettre la mise en place en pratique quotidienne de ces marqueurs, d'autant plus que cette étude ne comportait pas de patient ayant une réponse modérée aux anti-TNF. Enfin, le génotypage a permis d'identifier 8 *loci* impliqués dans les processus de réponse inflammatoire, de maladie métabolique et de morphologie cellulaire pouvant expliquer 3.8% de la variation de la réponse au traitement des patients PR[274].

Les pistes pour mettre en évidence un ou plusieurs facteurs prédictifs de réponse aux anti-TNF sont très variées et nécessitent encore souvent des études complémentaires pour confirmer leur intérêt. L'hypothèse d'un rôle bactérien dans la résistance au traitement a rarement été explorée, bien que le microbiote soit de plus en plus impliqué dans la physiopathologie de ces maladies et qu'il soit responsable de la sécrétion de TNF par les différentes cellules du système immunitaire.

Chapitre 3 : Rôle du microbiote intestinal dans la physiopathologie des MICI

3.1 Rôle de la perméabilité intestinale dans les MICI

Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) résultent de l'inflammation chronique, intermittente ou continue, d'une partie du tube digestive. Elles comprennent 2 formes principales que sont la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Les symptômes cliniques classiques associent une douleur abdominale, une diarrhée, une rectorragie mais aussi une perte de poids, de la fièvre et une asthénie. Les MICI ont une incidence de 5 à 10 pour 100 000 habitants[275]. Ces 2 formes sont bien distinctes sur le plan physiopathologique, clinique et thérapeutique mais présentes néanmoins quelques points communs. En effet, les MICI sont des maladies auto-immunes dont l'origine exacte n'est pas connue mais qui résultent d'une réponse immunitaire inappropriée dirigée contre la flore intestinale survenant chez des personnes génétiquement prédisposées. Cette réponse immunitaire serait associée à une augmentation des lymphocytes T effecteurs avec diminution des lymphocytes T régulateurs, des modifications du microbiote intestinal (dysbiose), ainsi qu'à une altération de la membrane intestinale ou à certains facteurs environnementaux[276,277] (Fig.23).

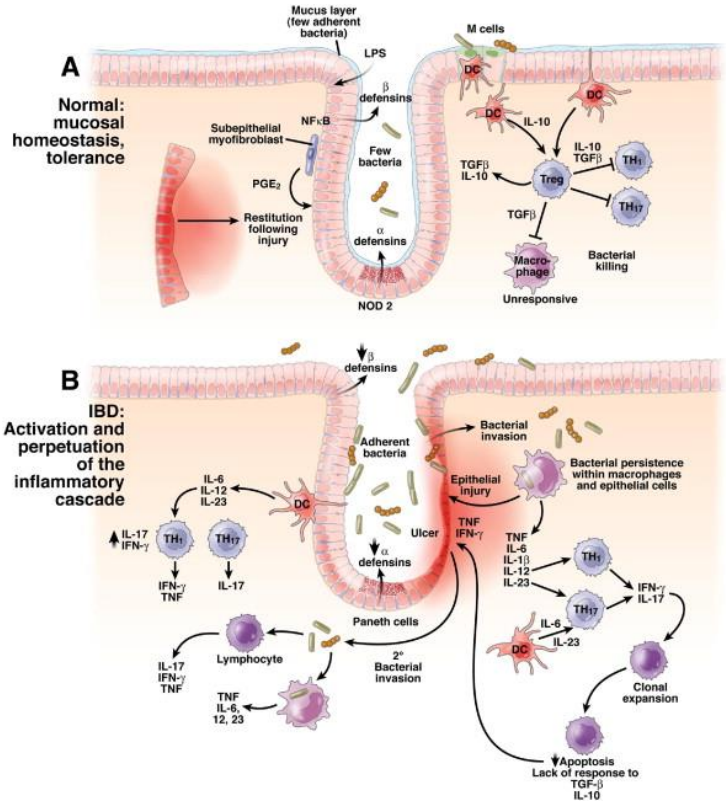


Figure 23: Différences des interactions entre bactéries, épithélium et système immunitaire au niveau d'un intestin normal (A) et dans une MICI (B)[278]

3.1.1 Structure et fonction de la barrière intestinale (Fig.24)

L'épithélium intestinal est la plus grande des surfaces muqueuses de l'organisme, couvrant environ 400m^2. Il forme une barrière physique et biochimique qui sépare les nombreuses bactéries commensales situées dans la lumière intestinale de la lamina propria sous-jacente et des couches intestinales plus profondes. L'épithélium intestinal est composé de 4 lignées cellulaires : les entérocytes, responsable de l'absorption et constituant les principales cellules de cet épithélium, les cellules caliciformes productrices de mucus, les cellules endocrines sécrétant des hormones telles la sérotonine et l'entéroglucagon, et les cellules de Paneth capable de fabriquer des peptides anti-microbiens (AMPs) et les lectines[279]. Les cellules stromales, les lymphocytes B (notamment les plasmocytes à IgA), les lymphocytes T, les macrophages et les cellules dendritiques de la *lamina propria* se trouvent directement sous la couche épithéliale intestinale. De plus, un sous-groupe de lymphocytes T spécialisés, les lymphocytes intra-épithéliaux γδ, et certaines cellules dendritiques sont situés entre les entérocytes, ce qui les rend stratégiquement positionnés pour échantillonner le contenu luminal. Cette surveillance des agents infectieux de la lumière intestinale est renforcée par l'action des cellules M ou Microfold pouvant présenter des antigènes ou des microorganismes entiers au système immunitaire muqueux sous-jacent. Ces cellules spécialisées sont concentrées dans l'épithélium recouvrant la surface luminale des structures lymphoïdes intestinales incluant les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes isolés (ILFs).[280]

La sécrétion de mucines fortement glycosylées dans la lumière intestinale par les cellules caliciformes forme la première ligne de défense anti-microbienne. La plus abondante de ces mucines, la mucine 2 (MUC2), joue un rôle essentiel dans l'organisation des couches intestinales de mucus à la surface de l'épithélium colique. D'autres produits sécrétés par les cellules caliciformes contribuent également à la régulation de cette barrière physique intestinale comme le facteur Trefoil 3, responsable de l'intégrité structurale du mucus, de la réparation épithéliale, de la résistance à l'apoptose et de la migration des entérocytes. La resistin-like molecule β (RELMβ) permet de promouvoir la sécrétion de mucine 2 et régule les réponses macrophagique et lymphocytaire pendant l'inflammation[280].

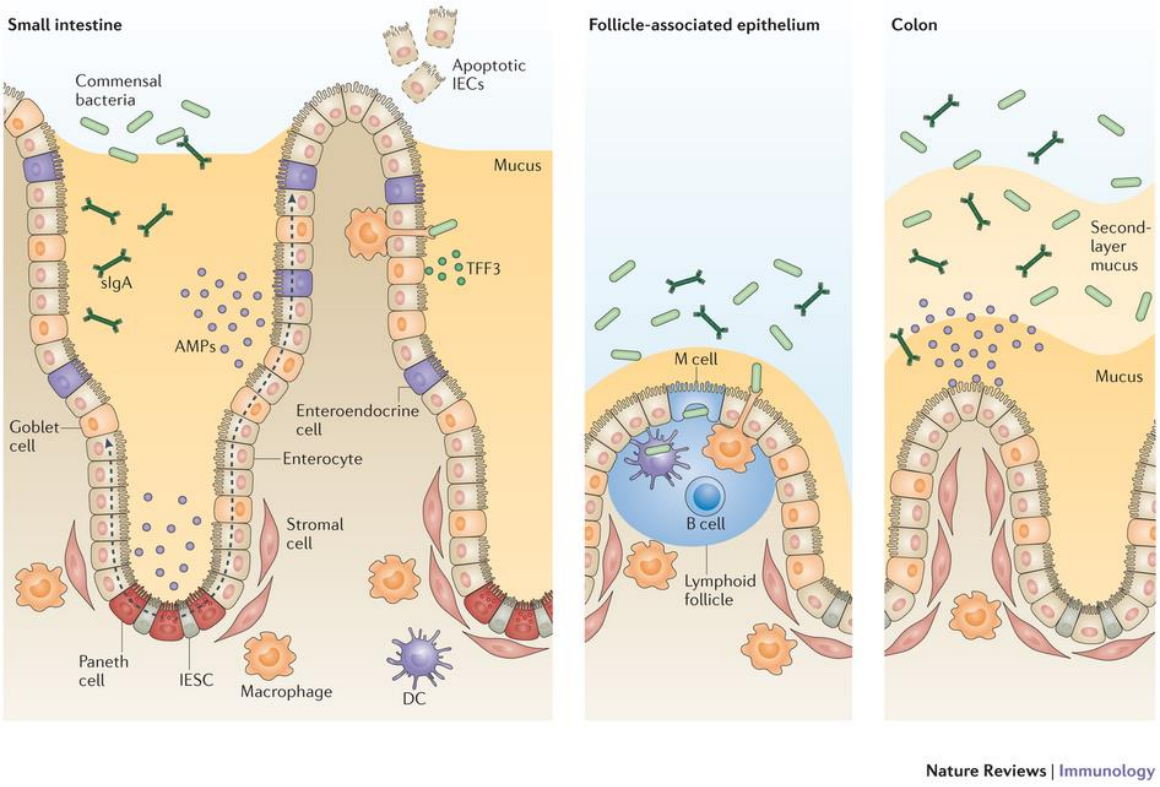


Figure 24: Structure de la barrière intestinale[280] . ***AMPs: antimicrobial proteins ; IECs : intestinal epithelial cells; IESC : intestinal epithelial stem cell ; sIgA : secretory IgA ; M cells : microfold Cells*** **;**

Sous la couche de mucus, les cellules intestinales forment une barrière physique continue. Les jonctions serrées connectent les cellules intestinales adjacentes et sont associées à des réseaux d'actine et de myosine cytoplasmiques régulant la perméabilité intestinale.

Les jonctions adhérentes, avec les desmosomes, induisent des liens adhésifs forts qui maintiennent une proximité entre les cellules épithéliales mais permettent aussi une communication intercellulaire (Fig.25). La perte des jonctions adhérentes se traduit par une perturbation des contacts cellule-cellule et cellule-matrice, une polarisation inefficace des cellules épithéliales intestinales et une apoptose précoce. Ces jonctions sont constituées par des cadhérines, une famille de protéines transmembranaires qui forment de solides interactions homotypiques avec les molécules des cellules adjacentes. Les jonctions adhérentes sont nécessaires pour l'assemblage de la jonction serrée qui scelle l'espace paracellulaire. Les jonctions serrées sont des complexes multi-protéiques composés de protéines transmembranaires, notamment les claudines et occludines, de protéines membranaires périphériques, comme les *zonula occludens* 1 et 2 (ZO-1 et 2), et de molécules régulatrices incluant les kinases. Tant les jonctions serrées que les jonctions adhérentes sont soutenues par un anneau dense perijonctionnel d'actine et de myosine pouvant réguler la fonction de la barrière intestinale[281].

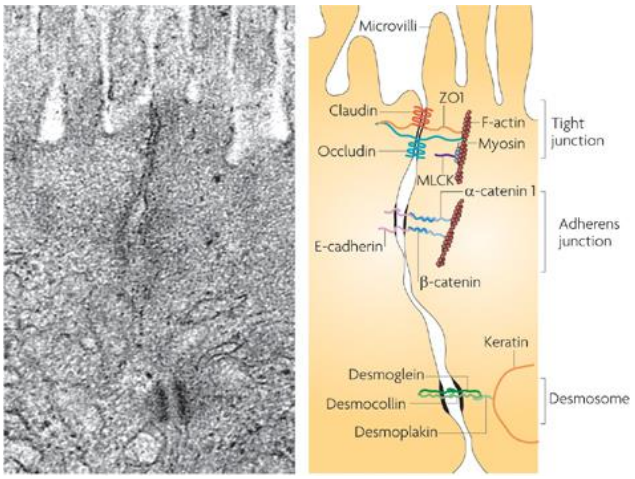


Figure 25: Représentation d'une jonction serrée et adhérente de l'épithélium intestinal.[281]

Cette barrière est encore renforcée par la sécrétion de peptides anti-microbiens (AMPs) par les cellules épithéliales. En effet, les entérocytes sont capables de produire certains AMPs comme la « C-type lectin regenerating islet-derived protein IIIγ » (REGIIIγ), tout au long de l'intestin grêle et du colon. En revanche, les cellules de Paneth n'interviennent qu'au niveau des cryptes de l'intestin grêle mais peuvent produire de nombreux AMPs supplémentaires comme les défensines, les cathélicidines et les lysosymes. Certaines défensives sont exprimées de manière constitutionnelle, comme la β défensine 1 (HDB1), alors que d'autres sont synthétisées en réponse à une inflammation, à la présence de pathogènes ou de bactéries probiotiques (HDB2 par exemple). Ces AMPs perturbent certaines fonctions très conservées et essentielles des bactéries comme les membranes de surface, ciblées par les défensines formant des pores membranaires et les cathélicidines, ou les peptidoglycanes de la paroi des bactéries gram positives, détruites par les lectines de type C. Cette stratégie permet une régulation large à la fois des bactéries commensales et pathogènes de la lumière intestinale et limite la résistance des bactéries aux réponses anti-microbiennes. Ainsi, les fonctions sécrétoires combinées des cellules intestinales semblent limiter la quantité et la diversité des bactéries vivantes pouvant atteindre la surface épithéliale ou interagir avec le système immunitaire de la muqueuse sous-jacente[280].

Les cellules intestinales transportent également directement des immunoglobulines sécrétoires à travers la barrière épithéliale. A la suite de leur production par les plasmocytes de la *lamina propria*, les IgA dimériques sont liés au récepteur polymérique des immunoglobulines au niveau de la membrane basolatérale des cellules épithéliales et passe dans la lumière intestinale par transcytose. La collaboration entre les lymphocytes B sécréteurs d'IgA et les cellules intestinales fournit une composante adaptative de la réponse immunitaire à la barrière intestinale qui régule la population bactérienne commensale et permet ainsi de maintenir l'homéostasie intestinale. Les IgA, ainsi que les IgM participent également activement aux phénomènes de tolérance intestinale.

3.1.2 Anomalies de la barrière intestinale dans les MICI (Fig.26)

La barrière intestinale est d'une importance critique dans la physiopathologie des MICI. En effet, plusieurs mutations de gènes relatifs à cette barrière ont été associées à la MC ou la

RCH[282]. De plus, des parents non symptomatiques de patients atteints de MC présentent également une augmentation de la perméabilité intestinale[283] et il existe une immunité anti-bactérienne envers les pathogènes de la flore intestinale chez les patients MICI.

Les jonctions serrées présentent des lésions dans les formes de MICI active, bien que la plupart de ces changements soient probablement en lien avec l'évolution de la pathologie. La quantification des protéines retrouvées au niveau des jonctions serrées montre une augmentation de la claudine 2 et une baisse des claudines 3, 5, 8 et de l'occludine dans la MC. Dans la RCH, une hausse de la claudine 2 était aussi retrouvée, associée à une baisse des claudines 1, 4, de l'occludine et de la tricelluline[284]. La claudine 2 est décrite comme favorisant la perméabilité de l'épithélium par formation de canaux paracellulaires[285]. L'intégrité fonctionnelle de la membrane intestinale peut être évaluée par la mesure de la résistance électrique transépithéliale. Celle-ci est anormale à la fois dans la MC et dans la RCH.

Le renouvellement des cellules épithéliales se fait par prolifération de cellules souches au niveau de la crypte, qui migrent et se différencient vers le sommet de la villosité où elles meurent par apoptose et exfolient. Cette exfoliation laisse un espace de manière temporaire dans la barrière intestinale, durant laquelle une redistribution de composés protéiques, incluant l'occludine et ZO-1, permet de préserver son intégrité. Ce phénomène est augmenté à la fois chez des patients MC et RCH. De plus, chez des patients MICI en rémission clinique, l'augmentation de l'exfoliation épithéliale est associée à une rechute dans les 12 mois suivant l'examen endoscopique[286].

Plusieurs défauts sont observés au niveau de la couche de mucus normalement présente à la surface luminale des cellules épithéliales. Des anomalies de glycosylation ont été rapportées comme le raccourcissement de la chaîne d'oligosaccharide, une réduction de la sulfatation, une augmentation de la sialylation et de l'expression de courts antigènes oncofoetaux glucidiques (antigène Thomsen Friedenreich et sialylTn). Ces changements ne sont pas mis en évidence uniquement dans les MICI mais aussi dans les cancers coliques et les polypes hyperplasiques et adénomateux[287]. Le nombre de cellules caliciformes est diminué chez les patients MICI et la sécrétion de mucus par ces cellules appauvrie[288]. Cela pourrait être induit par l'infiltration des cryptes par les polynucléaires neutrophiles, aboutissant à l'expulsion du mucus des cellules caliciformes[289]. La couche de mucus du colon est fine chez les patients présentant une RCH active, voire totalement absente dans les formes sévères de la maladie[290]. La mucine 2 (MUC2) est diminuée dans la RCH alors que des taux en ARNm étaient abaissés dans la MC concernant les gènes MUC4 et MUC5b (muqueuse saine) et MUC1 (muqueuse iléale atteinte)[291]. Un mécanisme potentiel de la réduction de cette couche muqueuse serait la dégradation plus importante du mucus par les enzymes bactériennes. En effet, la flore colique utilise le mucus comme source d'énergie et de carbone mais les glycans sulfatés sont relativement résistant à cette dégradation puisque les glycosidases bactériennes agissent peu sur ces sucres. La présence alors de sulfatases bactériennes pourrait avoir un rôle important dans cette dégradation du mucus. Une augmentation de ces sulfatases a été mise en évidence lors d'une RCH active et ces enzymes étaient corrélées à l'activité de la colite[287].

Ces bactéries mucolytiques pourraient ainsi influencer l'épaisseur et la stabilité de la couche de mucus dans la RCH.

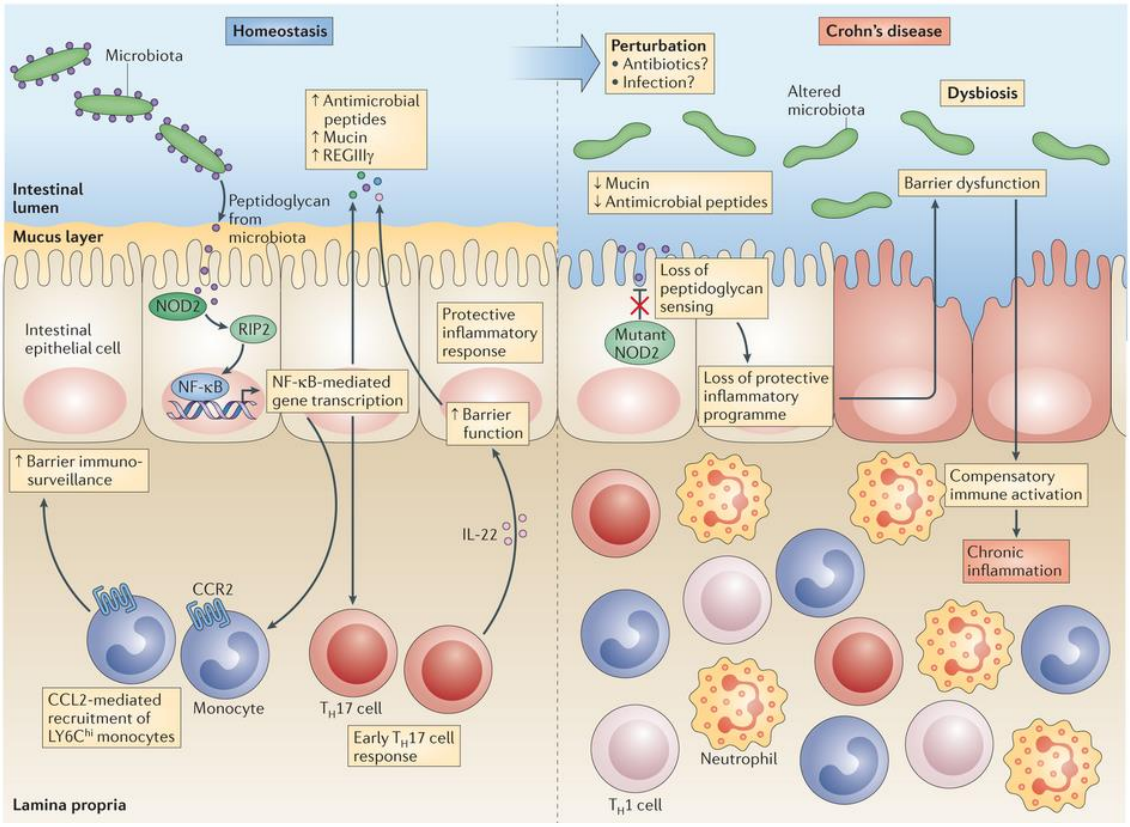


Figure 26: Anomalies de la barrière intestinale dans la physiopathologie de la MC[292].

La sécrétion des peptides anti-microbiens présente ensuite des anomalies qui sont différentes selon la pathologie étudiée. Les cellules de Paneth expriment moins les α-défensines dans la MC iléale, notamment la « human défensine α 5 » (HD5) et 6 (HD6). Cette baisse spécifique ne semble pas dépendante de l'état inflammatoire des biopsies sur lesquelles ont été réalisés les dosages, et n'était pas retrouvée dans la forme colique de MC, la RCH et la pouchite. L'expression iléale d'autres molécules synthétisées par les cellules de Paneth n'était pas modifiée entre les différents groupes, que ça soit des molécules anti-bactériennes (les lysosymes, sPLA2) ou n'ayant pas cette propriété (α-1-antitrypsin, pancreatic secretory trypsin inhibitor, protéine hepatoma-specific protein/pancreatitis, trypsine 2 (trypsine anionique), et trypsine 3 (mesotrypsine))[293]. Au niveau fonctionnel, ce déficit en α-défensines se traduit par une baisse de l'activité anti-microbienne contre *E. coli* et *S. aureus* dans les biopsies de muqueuse intestinale de patients ayant une forme iléale de CD. L'amplitude de cette réduction d'activité est parallèle aux taux d'expression de peptides anti-bactériens dans l'iléite[293]. La forme colique de MC est associée à une production atténuée des β-défensines, au niveau de la forme constitutive HDB1 mais aussi inductible HDB2. A l'inverse, les β-défensines sont surexprimées dans la RCH. Toutefois, il est admis que la capacité du mucus à lier et retenir les AMPs est cruciale pour empêcher l'adhésion et l'invasion bactérienne de l'épithélium intestinal. Ainsi, malgré la surexpression de ces défensines, la barrière anti-microbienne est sévèrement compromise dans la RCH de par l'absence ou la forte réduction du mucus.

Le défaut d'expression de ces défensines peut être en parti expliqué par des facteurs génétiques (Fig.27). En effet, plusieurs études ont montré un lien entre des mutations du gène NOD2 et le déficit en α-défensine des cellules de Paneth. NOD2 (ou CARD15), est un récepteur intracellulaire du muramyl dipeptide (MDP), un peptidoglycan commun à toute bactérie[294]. Les cellules de Paneth expriment NOD2 au niveau de l'intestin grêle. Des analyses plus approfondies ont permis de préciser l'association entre une mutation particulière, l'insertion 3020insC (SNP13) du gène NOD2, avec cette baisse d'expression des défensines. Cette mutation correspond au variant NOD2 le plus fréquemment retrouvé dans la maladie de Crohn[294].

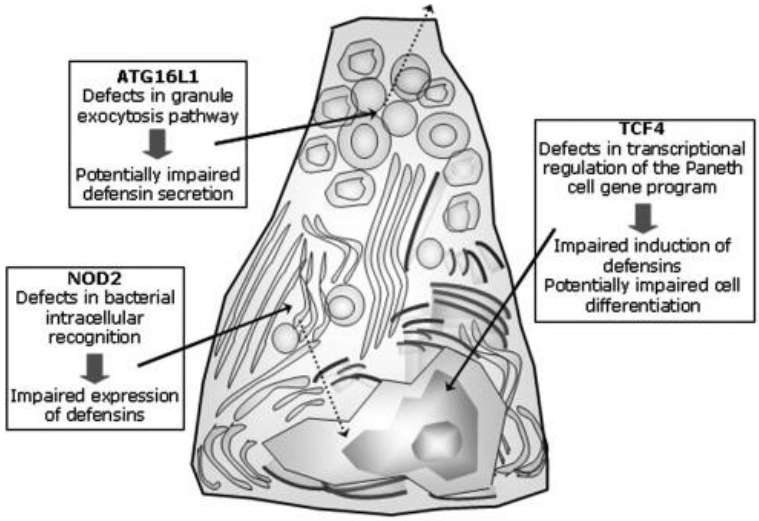


Figure 27: Possible rôle de mutations génétiques dans le déficit en défensines des cellules de Paneth[295]

Indépendamment du génotype NOD2, la voie de signalisation Wnt et plus précisément le facteur de transcription TCF4 joue un rôle important dans la sécrétion des α-défensines. Le TCF4 régule directement les gènes des défensines HD5 et HD6 et intervient dans la maturation et la différenciation des cellules de Paneth. L'expression du TCF4 est réduite dans les biopsies intestinales de patients présentant une MC iléale[296], ainsi que les défensines HD5 et HD6. Un polymorphisme de la région du promoteur de TCF4, le variant rs3814570, semble associé à la MC iléale mais non à la forme colique de MC ni à la RCH dans 3 cohortes de patients MICI[297], avec une plus forte association pour les formes sténosantes de MC. Enfin, des anomalies de la voie d'exocytose des granules des cellules de Paneth ont été décrites chez les patients homozygotes pour l'allèle T300A du gène ATG16 « autophagy related 16-like 1 » *(*ATG16L1*)*[298]. ATG16L1 est une protéine clé de l'autophagie. Le polymorphisme nucléotidique rs2241880 (Thr300Ala) a été associé à la MC, spécialement au phénotype iléal, mais pas à la RCH. Ces différents défauts semblent se traduire par un même trouble dans la défense anti-microbienne de l'hôte normalement fournie par ces cellules sécrétoires.

3.1.3 Augmentation de la perméabilité intestinale et auto-immunité

3.1.3.1 Modification du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est un terme maintenant utilisé pour qualifier la flore résidente ou commensale de la lumière intestinale. La flore intestinale normale de l'humain adulte,

représente quelque cent mille milliards de micro-organismes et plus de 400 espèces microbiennes. La flore bactérienne est constituée d'une part de souches qui ont colonisé le tractus digestif dès la naissance de l'individu et d'autre part, de souches qui envahissent le tube digestif au cours de l'ingestion d'aliments ou de boissons. La flore intestinale varie longitudinalement tout au long de l'intestin, mais aussi transversalement entre lumière et muqueuse intestinale[299]. Cette répartition dépend de la teneur du milieu en oxygène, des sécrétions du tube digestif supérieur, des nutriments disponibles et de la vitesse du transit (rapide de la bouche au caecum, plus lent ensuite). Le microbiote intestinal est composé à 99% de quatre phyla (grands groupes) bactériens : les Firmicutes, les Bacteroidetes, les Actinobacteries et les Proteobacteries (Fig.28). La flore intestinale est variable entre chaque individu en fonction du mode d'accouchement (naissance par voir vaginale ou césarienne), de son âge, son sexe, son régime alimentaire, le stress, son génotype et les médicaments (en particulier les antibiotiques) qu'il a pu prendre dans sa vie. Les différences inter individuelles existent mais on retrouve toujours chez chaque sujet une distribution similaire de bactéries[299].

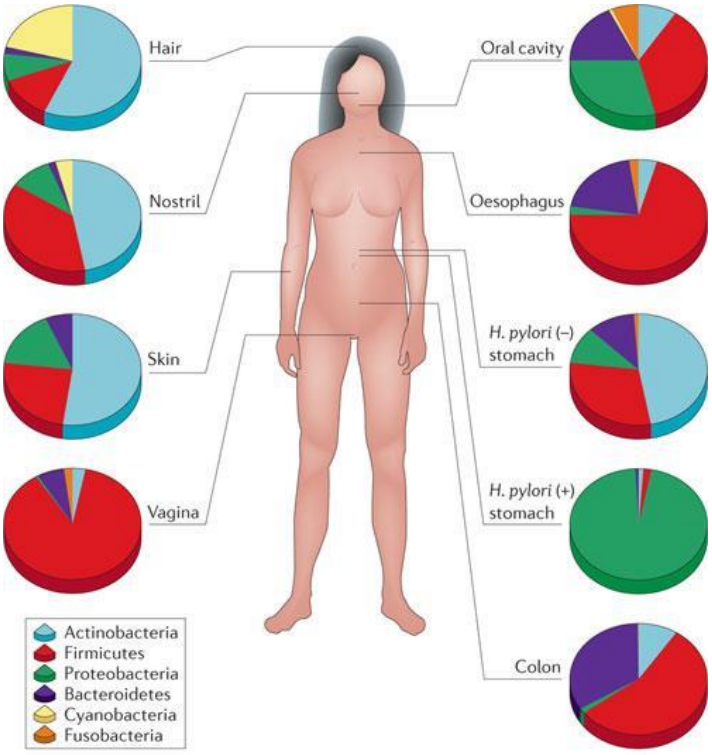


Figure 28: Répartition des phyla présentes dans le microbiote normal[300]

Les patients MC présentent 30% de bactéries inhabituelles comparées aux sujets sains, avec de fortes variations de composition entre les épisodes de poussées et de rémission de la maladie[301]. Une diminution globale de la biodiversité est observée[302], essentiellement aux dépens des Firmicutes (13 ribotypes contre 43 chez les patients sains)[303]. La décroissance du phylum Firmicutes va avec une augmentation concomitante de Proteobacteries et d'Actinobactéries. A l'intérieur du groupe Firmicutes, *Fecalibacterium prausnitzii* semble être particulièrement déficitaire. La baisse de cette bactérie serait associée à un risque plus important de récurrence post-opératoire d'une MC iléale. Des explorations complémentaires ont montré que *Fecalibacterium prausnitzii* présente des propriétés anti-inflammatoires, en

partie dues à la sécrétion de métabolites bloquant l'activation du NFκB et la sécrétion d'IL-8. Ces données ont été confirmées *in vivo* dans un modèle murin de colite induite par injection de 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) où ce germe avait un effet protecteur sur la colite, tant sur le plan clinique, histologique mais aussi sur le profil de cytokines sécrétées[304].

Les entérobactéries voient leur concentration augmenter dans la MC. Des souches d'*E.Coli*, qui n'ont pas les caractéristiques de virulence d'autres *E.coli* pathogènes, mais qui possèdent des propriétés d'adhésion aux entérocytes, ont été isolées et nommées AIEC (Adherent Invasive *E.coli*, souche référence LF82). Ces souches, très invasives, survivent et se multiplient dans les macrophages, sans induire de mort cellulaire. Les macrophages infectés sécrètent par contre des taux élevés de TNF. La prévalence des AIEC au niveau de lésions iléales dans la MC est de 36.4% contre 6% pour les patients sains contrôles.[305]

3.1.3.2 Interaction microbiote intestinal et immunité muqueuse

Les données actuelles suggèrent que la dérégulation des 2 réponses immunitaires, innée et adaptative, contribue ensemble à la réponse inflammatoire intestinale inappropriée dans les MICI. En plus de la barrière physique représentée par l'épithélium intestinal, des cellules immunitaires appartenant au système inné peuvent détecter la flore intestinale et répondre à des motifs structuraux conservés sur les microorganismes, les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs). Les cellules dendritiques, les macrophages mais aussi les cellules épithéliales et les myofibroblastes peuvent reconnaître ces PAMPs grâce à des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs). Les PRRs sont composés de récepteurs transmembranaires de type Toll (TLRs) et de récepteurs intracytoplasmiques de type NOD (NLRs), dont la stimulation résulte notamment en l'activation du facteur de transcription NFκB et la production de médiateurs pro-inflammatoires[306]. Bien que le rôle fonctionnel des mutations de NOD2 soit controversé dans la MC, des données suggèrent que ces mutations engendreraient une perte de fonction ayant pour conséquence une baisse de l'activation du NFκB réduisant la production d'agents anti-bactériens et permettant l'invasion de pathogènes microbiens. Un taux bas de TLR2 étant nécessaire pour maintenir la tolérance immunitaire, plusieurs mécanismes contribuent à une réduction de son expression : l'expression de facteurs de régulation négatifs comme Tollip et A20 ainsi que la production d'IL-10[307]. Ces mutations de NOD2 pourraient se traduire par une absence d'inhibition du TLR-2, retrouvé augmenté dans la MC, conduisant à l'activation des voies inflammatoires et à une réponse Th1 excessive[308]. Le variant NOD2 3020insC supprime en fait la transcription de l'IL-10 en bloquant la phosphorylation de la ribonucléoprotéine nucléaire hn-RNP A1 par la protéine kinase p38[309]. Cette production défectueuse en IL-10 chez les patients MC pourrait en plus engendrer une régulation insuffisante du système immunitaire. Le taux de TLR-4 se retrouve également surexprimé dans les MICI, avec des variants alléliques, D299G et aT399I, pouvant engendrer une hypersensibilité au LPS[307].

L'IL-23 est une cytokine majeure dans la coopération entre le système immunitaire innée et adaptatif et joue un rôle dans la réponse précoce aux pathogènes. En effet, en plus de son action sur les lymphocytes Th17, cette cytokine agit sur les cellules de l'immunité innée, en particulier les populations lymphocytaires non conventionnelles comme les lymphocytes Tγσ, NK invariants et les lymphocytes T muqueux invariants[310]. Des polymorphismes du récepteur

de l'IL-23 (IL-23R) ont été associés à la fois dans la MC et dans la RCH. Des lymphocytes innés CD3- CD56- sont retrouvés en plus grand nombre dans la muqueuse inflammatoire des patients MC et non dans la RCH. Ces cellules ont montré leur potentiel sécrétoire en IL-17A et IL-17F en réponse à l'IL-23[311]. Plus récemment, un sous type de lymphocytes innés, c-Kit-NKp44- (ou ILC1) a été caractérisé comme étant similaire au TH1. Ces cellules expriment le facteur de transcription T-bet et répondent à l'IL-12 en sécrétant de l'IFN-γ. La fréquence de ces ILC-1 est augmentée dans les tissus inflammatoires de patients MC par rapport au groupe contrôle[312]. L'accumulation de ces phénotypes particuliers de lymphocytes au niveau intestinal pourrait contribuer à l'inflammation par leur sécrétion en cytokine (IL-17 ou IFNγ) et leur action sur le recrutement d'autres cellules inflammatoires.

Les acteurs du système immunitaire adaptatif, hautement spécifiques à l'inverse du système inné, sont majoritairement représentés par les lymphocytes T, incluant les T CD4+ Th1, Th2 et Th17. Les lymphocytes Th1 qui sont induits par l'IL-12 produisent de grandes quantités d'IFNγ alors que les Th2 sécrètent de l'IL-4, IL-5 et de l'IL-13. Une réponse immunitaire Th1 anormale, déclenchée par des taux muqueux élevés en IL-8 et IL-12, est mise en évidence dans l'inflammation intestinale de la MC. Les macrophages de la *lamina propria* dans la MC ont en effet une capacité accrue de sécrétion d'IL-12 bioactive[313], et les lymphocytes T muqueux produisent des taux plus élevés d'IL-2 et d'IFNγ par rapport aux lymphocytes obtenus chez des patients RCH ou des contrôles. A l'inverse, dans la RCH, une production accrue d'IL-5 est reportée. Par conséquent, la MC avait été caractérisée par une réponse Th1 et la RCH par une réponse Th2 avec une production excessive d'IL-5 et IL-13[306]. Cependant, plusieurs données plus récentes font reconsidérer ce paradigme et la notion d'une maladie Th2 pour la RCH car des études réalisées sur culture *ex vivo* de biopsies intestinales n'ont pas retrouvées une surexpression de l'IL-13 dans la RCH[306]. Les lymphocytes Th17 forment un sous-groupe de lymphocytes pouvant produire de larges quantités d'IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22. Les Th17 sont induis par l'IL-6 et le TGF-β et leur expansion est favorisée par l'IL-23[314]. Il est décrit également les Th17/Th1 qui relâchent à la fois de l'IL-17A et de l'IFNγ[315]. Des taux importants de transcrits d'IL-17A ont été détectés dans la muqueuse MC et RCH avec une surexpression localisée dans la *lamina propria* des patients MICI. Cette surexpression, plus marquée dans la muqueuse inflammatoire que saine, concorde avec la présence plus importante de cellules Th17 et Th1/Th17 dans la *lamina propria* des patients MICI comparé aux sujets contrôles[316]. Les cytokines sécrétées par ces différents acteurs du système immunitaire sont aussi des médiateurs centraux des lésions de la muqueuse des patients MICI : en particulier l'IFNγ, pouvant induire l'apoptose des entérocytes, l'IL-17, recrutant les neutrophiles sur le site inflammatoire, l'IL-21, permettant la sécrétion des métalloprotéinases matricielles (MMPs) et de chimiokines attirant les lymphocytes T et enfin le TNF dont l'action centrale dans les MICI sera détaillée par la suite[306]. Les lymphocytes T régulateurs (Treg), caractérisés par l'expression de FOXP3, exercent leur fonction en produisant des cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGFβ) et en empêchant l'activation des lymphocytes T qui ont échappé à d'autres mécanismes de tolérance[317]. Ces LTreg sont déplétés dans le sang périphérique des patients présentant une phase active de MICI en comparaison avec des patients en rémission clinique ou un groupe contrôle[318]. A l'inverse, au niveau muqueux, les LTreg sont constamment augmentés dans les lésions actives de MICI par

rapport aux zones non inflammatoires. Cependant, cette augmentation des lymphocytes FOXP3 reste nettement inférieure au taux retrouvés dans la diverticulite, un état inflammatoire devant présenter une fonction immunorégulatrice intacte. La MICI active semble donc être caractérisée par une régulation insuffisante du système immunitaire, à savoir une baisse des LTreg périphériques et une augmentation insuffisante de ces cellules dans les lésions intestinales[319].

3.2 Immunisation anti-agents infectieux dans les MICI

L'augmentation de la perméabilité intestinale met en contact les agents infectieux situés normalement dans la lumière intestinale et le système immunitaire. Il en découle une immunisation contre ces pathogènes qui peut être mesurée et servir alors d'indicateurs pronostics ou diagnostics de la maladie. Certains anticorps dirigés contre cette flore bactérienne sont d'ores et déjà utilisés pour le diagnostic des MICI. Nous avons réalisé une synthèse de ces anticorps qui a fait l'objet d'une revue dans Autoimunty Reviews (Annexe 1).

3.2.1 Les Ac anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA)

Les ASCA sont dirigés contre des séquences de résidus mannanes exprimées par la levure *S.cerevisiae*. La perméabilité intestinale de l'intestin grêle est un phénomène survenant relativement tôt dans la pathogénie de la MC. La présence d'ASCA peut ainsi être détectée plusieurs années avant l'expression clinique de la maladie[320]. La recherche de ces Ac se fait par technique ELISA ou par immunodot. Les ASCA ont une prévalence de 28.5 à 65% dans la MC contre 0 à 19% dans la RCH[321–324], mais ils peuvent aussi être retrouvés dans d'autres pathologies telles que la maladie cœliaque avec une prévalence de l'ordre de 22%[325]. Les ASCA ont également été décrits comme étant un marqueur familial de prédisposition dans les MICI. En effet, ils sont plus fréquemment retrouvés chez des patients avec une MC ou RCH familiale que certaines formes sporadiques. Ils peuvent être aussi retrouvés chez 20-25% des apparentés sains au premier degré de patient atteint de MC[326]. D'autre part, les ASCA peuvent être associés à des présentations cliniques particulières telles qu'un âge jeune au moment du début de la maladie, une atteinte iléale ou iléocolique, et des formes agressives notamment les formes sténosantes et pénétrantes de la MC ainsi que la nécessité au recours à la chirurgie[321,327]. La recherche simultanée des ASCA et d'anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) améliore la spécificité dans la distinction entre MC, RCH et certaines formes de colites indéterminées. Ainsi, pour le diagnostic de la MC le profil $ASCA^+$ et $ANCA^-$ a une sensibilité de 52% et une spécificité de 91%[327].

3.2.2 Les Ac anti-antigènes microbiens

- Ac anti -*Escherichia coli* outer membrane porin C (anti-OmpC)

La porine C est située au niveau de la membrane externe d'*E. coli* et est liée de façon non covalente au peptidoglycane. Elle joue un rôle de canal pour certains ions et solutés hydrophiles. Les Ac anti-OmpC ont été identifiés dans les MICI pour la première fois chez des patients porteurs d'une RCH[328]. Ils peuvent être recherchés par technique ELISA. Réalisés isolément ils ont une prévalence de 24.7 à 55% chez les adultes atteints de MC[329,330].

Ils peuvent également être retrouvés chez 11 à 24.2% des patients RCH et chez des patients non porteurs d'une MICI (de l'ordre de 5%)[327,330]. Ces Ac permettent cependant d'améliorer la sensibilité diagnostic et ainsi d'identifier un petit nombre de MICI non détectées par d'autres tests[330]. Leur présence permet également d'identifier certains phénotypes de la MC comme une localisation iléale, des atteintes perforantes et la nécessité du recours à la chirurgie du grêle[331,332].

- Ac anti-séquence I2 de *Pseudomonas fluorescens*

La séquence I2 est d'origine microbienne codant pour un super antigène des lymphocytes T et a été isolée dans les années 2000 chez des patients MC. Elle est présente au niveau du génome de *P. fluorescens*. Les Ac dirigés contre cette séquence sont recherchés par technique ELISA et ont une prévalence de l'ordre de 54% dans la MC mais ils peuvent aussi être retrouvés dans la RCH et chez les sujets sains[333]. Leur présence est associée à des atteintes de type sténosantes de la MC et à la nécessité du recours à la chirurgie du grêle[331]. Elle serait également prédictive d'une réponse clinique à une chirurgie de dérivation au cours de la MC[334].

- Ac anti-flagelline CBir1

Les flagellines sont des constituants abondants de la flore microbienne intestinale ayant un rôle dans la mobilité bactérienne et pouvant également activer les récepteurs TLR5 exprimés par le système immunitaire inné de la muqueuse intestinale. Ces Ac sont dirigés contre l'Ag CBir1 situé sur la partie 13 amino-terminale de la flagelline de certaines bactéries à Gram positif appartenant à la famille des *Lachnospiraceae sp*. Il s'agit du premier Ag bactérien responsable de la réponse immune aberrante au cours de la MC[335]. Ces Ac peuvent être recherchés par technique ELISA et sont retrouvés plus fréquemment dans la MC avec une prévalence de 50 à 55% contre 6% dans la RCH et 8 à 14% chez les sujets non MICI. Ils sont associés indépendamment à une atteinte de l'intestin grêle pénétrante et sténosante. D'autre part, parmi les patients ayant des pANCA atypiques positifs, 40 à 44% présentaient également des Ac anti-CBir1 chez les patients MC contre seulement 4% chez les patients RCH et pANCA atypiques positifs[336]. Ces Ac anti-Ag microbiens sont associés à des phénotypes distincts de la MC et surtout à des atteintes compliquées de l'intestin. Cependant leur impact dans la discrimination des MICI est assez controversé de même que leur rôle pronostique. Récemment, d'autres anticorps spécifiques des motifs bactériens, les anti-glycans, ont également été décrits dans la littérature.

- Ac anti-glycans

Les glycans sont des oligosaccharides retrouvés principalement au niveau de la membrane de nombreuses bactéries et levures commensales ou pathogènes, de virus et de certaines cellules (érythrocytes, cellules immunitaires). Leur structure varie selon l'organisme considéré (Fig.29). En plus des ASCA dirigés contre les mannanes de *S.cerevisiae*, d'autres Ac anti-glycans ont été décrits récemment dans les MICI et comprennent : les Ac anti-mannobioside carbohydrate (Man(α,3)Manα) (AMCA), Ac anti-laminaribioside carbohydrate (Glc(β1,3)Glc(β))(ALCA), Ac anti-chitobioside carbohydrate (GlcNAc(β1,4)GlcNAc(β))

(ACCA), Ac anti-laminarine (Glc(β1,3))3n(Glc(β1,6))n carbohydrate (anti-L), et les Ac anti-chitine (GlcNAc(β1,4))n (anti-C) carbohydrate.

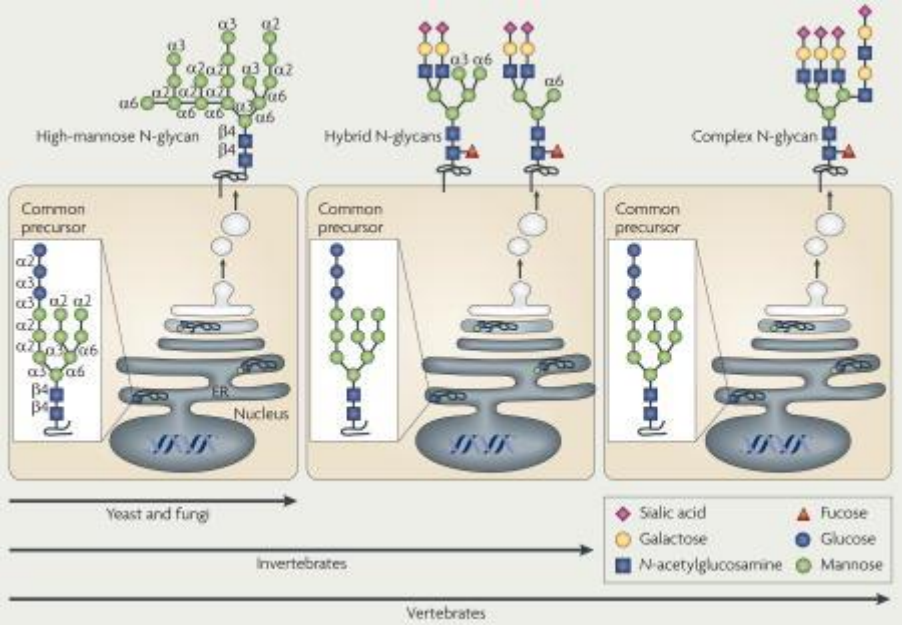


Figure 29: Structures des différents glycans selon les espèces[337].

En 2006, le criblage de plusieurs polysaccharides avec des sérums de patients atteints de MC a permis de mettre en évidence un profil d'Ac réagissant principalement avec trois glycans, les ACCA (IgA), les ALCA (IgG) et les AMCA (IgG). Les ALCA et ACCA ont été les premiers Ac anti-glycans à être évalués dans les MICI. La recherche de ces anticorps est possible par technique ELISA. En plus des ASCA, les ALCA et les ACCA ont montré leur rôle dans la discrimination entre MC et RCH. De plus, leur détection permet d'améliorer la sensibilité diagnostic et d'identifier un petit nombre de MICI non détecté par d'autres tests comme les ASCA. Ainsi, parmi les patients séronégatifs en ASCA, près de 44% sont positifs pour les ALCA ou les ACCA. La positivité pour au moins deux marqueurs parmi l'association ASCA, ALCA et ACCA permet d'augmenter la spécificité pour le diagnostic de MC[325]. Concernant l'association des Ac anti-glycans aux pANCA et aux ASCA dans le diagnostic différentiel entre MICI et sujets non MICI, c'est l'association entre pANCA, ASCA et ALCA qui permet la meilleure discrimination[325]. Les différents Ac anti-glycans ont chacun une prévalence presque similaire dans les MICI, allant de 8.7 à 28.1% dans la MC, contre 2.3 à 17.6% dans la RCH, et entre 2 à 12.4% chez les sujets sains[332,338,339]. La sensibilité de ces Ac dans le diagnostic de MC *vs* patients non MICI et RCH est plus faible que celle des ASCA, elle varie entre 8.7 à 20.7% pour les ACCA, entre 15 et 25.6% pour les ALCA, et de 12% jusqu'à 28% pour les AMCA, contre 47 à 66% pour les ASCA. Cependant leur spécificité est assez bonne allant de 80 à 100% pour diagnostiquer les patients MC *vs* les patients non MICI, et allant de 82.4 à 97% pour le diagnostic de MC *vs* RCH[325,327,332,338,339]. Concernant la présentation phénotypique de la maladie et notamment la localisation de la MC, une association a été retrouvée entre l'atteinte iléale et la présence d'ALCA et d'ACCA[325,332], ainsi qu'entre les Ac anti-L et l'atteinte iléo-colique[338]. Les AMCA semblent associés à une localisation péri-anale[338]. Des résultats sont cependant contradictoires selon les études

concernant ces associations[325,327,339]. Les ACCA et AMCA sont plus fréquemment associés à des formes compliquées de la MC[332]. Les Ac anti-L et anti-C semblent également être associés à une MC de type pénétrante[338]. Enfin, les ACCA comme les ASCA sont plus fréquemment associés à un recours nécessaire à la chirurgie abdominale[332,338]. Concernant le rôle prédictif de ces Ac sur la progression de la maladie et le risque de complications, la présence des AMCA, ACCA ou des Ac anti-L, ou la présence d'au moins 2 Ac parmi les ASCA, ALCA, AMCA, ACCA, anti-L ou anti-C est associée à une probabilité plus grande de progression vers les complications de la MC[339]. Plus le nombre d'Ac anti-glycans retrouvés chez une même patient est élevé, plus ils sont associés à une forme sévère[338]. En ce qui concerne la stabilité au cours du temps du statut des Ac anti-glycans (séropositif ou séronégatif), les résultats de différentes études sont contradictoires. Dans l'une d'elles, les Ac anti-glycans semblent rester stable dans le temps, tout comme les autres marqueurs tels que les ASCA, pANCA, Ac anti-OmpC et anti-I2 mais il semble y avoir tout de même des modifications de titres en Ac[339]. En revanche, dans une autre étude du même auteur, 14.8 à 23.5% des patients MC ont eu un changement de statut sérologique en Ac anti-glycans[340]. Il existe à ce jour très peu d'études concernant l'évolution du statut sérologique et du taux des Ac anti-glycans en lien avec le traitement de la maladie. Dans une étude concernant l'infliximab les ALCA, ACCA et AMCA sont restés stables après un traitement d'induction (évalué après 8 semaines)[327].

Le rôle du microbiote intestinal semble donc important dans la rupture de tolérance apparaissant dans les MICI. L'immunisation anti-bactérienne engendrée par le passage trans épithéliale de cette flore pourrait constituer un biomarqueur facilement mesurable dans le sang. L'intérêt que peut constituer la flore commensale est aussi rapporté dans une autre maladie chronique touchant les articulations qu'est la PR.

Chapitre 4 : Rôle du microbiote oral dans la physiopathologie de la PR

La polyarthrite rhumatoïde et la parodontopathie sont 2 maladies inflammatoires chroniques fréquentes touchant la population mondiale. De nombreuses études épidémiologiques ont fait part d'une association statistique entre ces 2 pathologies, qui présentent des facteurs de risque communs et une réponse du système immunitaire assez similaire.

4.1 Parodontopathie et polyarthrite rhumatoïde (PR)

La PR est une maladie auto-immune caractérisée par une inflammation chronique des articulations conduisant progressivement à une destruction et une déformation articulaire pouvant provoquer un handicap fonctionnel important. La PR est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques avec une prévalence estimée à 1% de la population et touche préférentiellement la femme (ratio 3/1) à partir de 50 ans[341]. La synovite inflammatoire est la lésion élémentaire responsable de la destruction du cartilage et de l'os adjacent. Cette inflammation est liée à la présence de nombreuses cellules du système immunitaire avec majoritairement des lymphocytes T et des macrophages[341] (Fig.30). Cependant, des lymphocytes B, des plasmocytes et des cellules dendritiques sont également retrouvés au sein de la synoviale ainsi qu'une néoformation vasculaire. Les cellules synoviales deviennent alors hyperplasiques et la membrane synoviale se développe, s'épaissit et forme des villosités[342]. Le tissu synovial inflammatoire et prolifératif, ou pannus, tend à recouvrir le cartilage et serait le siège de la production d'enzymes responsable de la destruction articulaire.

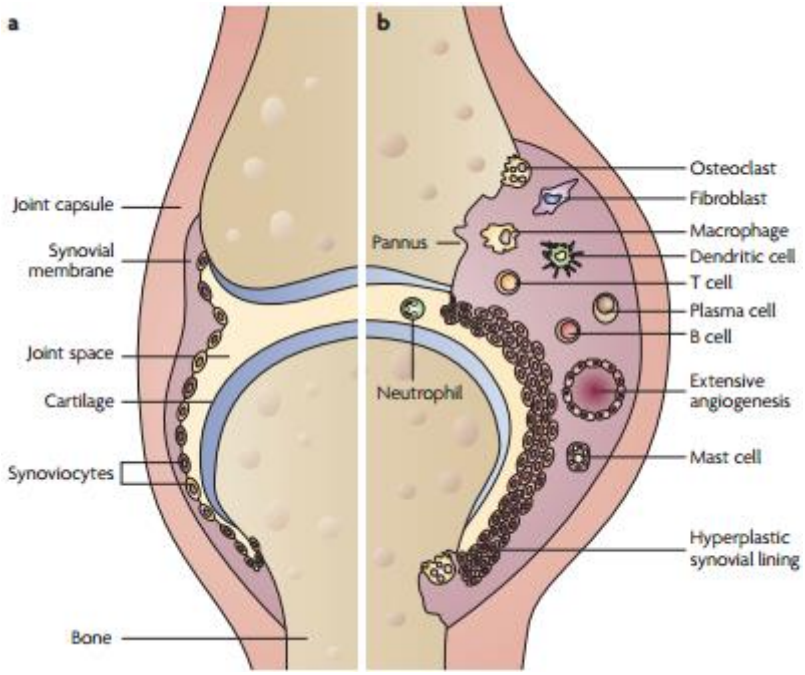


Figure 30: Représentation d'une articulation saine (a) et atteinte de polyarthrite rhumatoïde (b)[343].

La PR est une maladie multifactorielle impliquant des facteurs génétiques, hormonaux, environnementaux et immunologiques. Néanmoins, le mécanisme de déclenchement du processus pathologique reste inconnu. Certaines bactéries de la flore buccale, responsables de la parodontopathie, pourraient jouer le rôle déclenchant recherché.

4.1.1 Définition, diagnostic et épidémiologie de la parodontopathie

Le parodonte, du grec *para* qui signifie autour de, et *odontos* pour désigner la dent, représente le tissu de soutien de la dent. Il se compose du tissu gingival, d'os alvéolaire, de cément et du ligament alvéolo-dentaire. Les maladies parodontales ou parodontopathies sont décrites comme des infections bactériennes associées à une inflammation des tissus de soutien de la dent. Elles sont caractérisées par des symptômes et signes cliniques qui peuvent inclure une inflammation, des saignements gingivaux spontanés ou provoqués d'importance variable, la formation de poches en rapport avec des pertes d'attache et d'os alvéolaire, une mobilité dentaire et peuvent conduire à des pertes de dents[344] (Fig.31). L'évolution de la parodontite se déroule selon trois stades : durant le premier stade les signes cliniques se résument à un saignement, qui n'est parfois retrouvé que lors de l'introduction d'une sonde dans l'espace gingivo-dentaire pour mesurer la profondeur des poches parodontales. Quand la poche parodontale atteint 5mm ou plus (stade II), la désinsertion des attaches de la gencive autour du collet de la dent permet à la plaque dentaire, au tartre, aux aliments et surtout aux bactéries buccales (en particulier les anaérobies), de pénétrer dans ces espaces et d'y majorer l'inflammation. La gencive devient œdémateuse, saigne au contact, et apparait à la fois gonflée et rétractée. Le début de la lyse osseuse alvéolaire se précise alors. Le stade III est atteint quand la profondeur des poches dépasse 6mm, la résorption osseuse aboutissant alors souvent à la désinsertion du ligament alvéolo-dentaire, prélude à la mobilité puis à la chute de la dent[345].

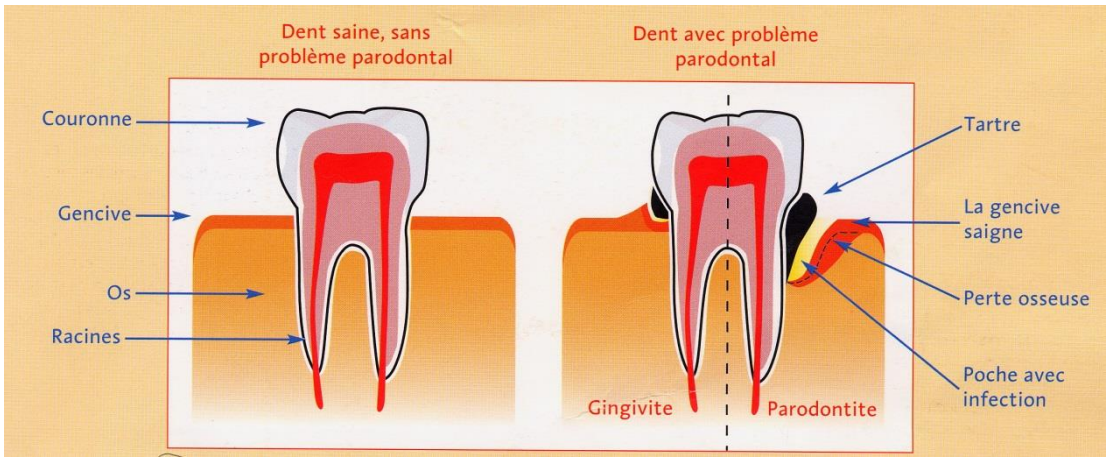


Figure 31: Schématisation d'un parodonte sain et d'une parodontite.[346]

Le diagnostic s'appuie d'abord et surtout sur les signes cliniques. En effet, elles sont initialement évoquées devant des signes inflammatoires du parodonte (rougeur, œdème). L'examen clinique parodontal doit évaluer la présence et la quantité de plaque bactérienne, la recherche d'un saignement au sondage, la mesure de la profondeur des poches, le niveau

d'attache clinique, évaluer la mobilité et/ou le déplacement dentaire et éventuellement l'augmentation de la température locale. La présence de perte d'attache est le signe pathognomonique de parodontite. Pour conforter ce diagnostic, l'imagerie peut être utilisée afin de préciser la perte osseuse alvéolaire. En général, les mesures radiographiques sous-évaluent l'étendue des pertes osseuses. Cependant, le bilan radiologique complet en téléradiographie intra-buccale (T.I.B) est recommandé pour le diagnostic et le suivi de la maladie parodontale lorsque le sondage parodontal permet de suspecter une perte osseuse.[344]

La maladie parodontale est la principale cause de perte dentaire après 35 ans. La majorité des études à travers le monde indique une prévalence de 10 à 15% pour les parodontites sévères définies par une perte d'attache de 6 mm et plus sur un ou plusieurs sites. Aux Etats-Unis, l'estimation de la prévalence de parodontite modérée (1 ou plusieurs sites ayant une perte d'attache de 3 mm et plus) était de 44% à 16 ans et de 80% de 18 à 64 ans[347]. Il s'agit donc d'un problème de santé publique du fait de leur prévalence et de leur potentielle gravité.

4.1.2 Facteur bactérien dans la maladie parodontale

La maladie parodontale est une maladie infectieuse de la cavité buccale dans lesquelles les biofilms buccaux jouent un rôle central. Le biofilm se définit comme une accumulation de micro-organismes, de différentes espèces, adhérant à une surface généralement en relation avec un environnement aqueux (Fig.32). Le biofilm parodontal possède deux localisations principales : supra ou sous-gingivale. La plaque supra-gingivale est facilement détectée au cours d'un examen clinique à l'aide d'une sonde ou par des colorants. Elle se compose majoritairement de bactéries aérobies responsables des caries. Le deuxième type est la plaque sous-gingivale, beaucoup plus difficilement évaluable cliniquement et qui n'est pas accessible au patient. Elle contient des bactéries anaérobies, plus virulentes, qui se développent à pH basique et à l'origine des maladies parodontales[348].

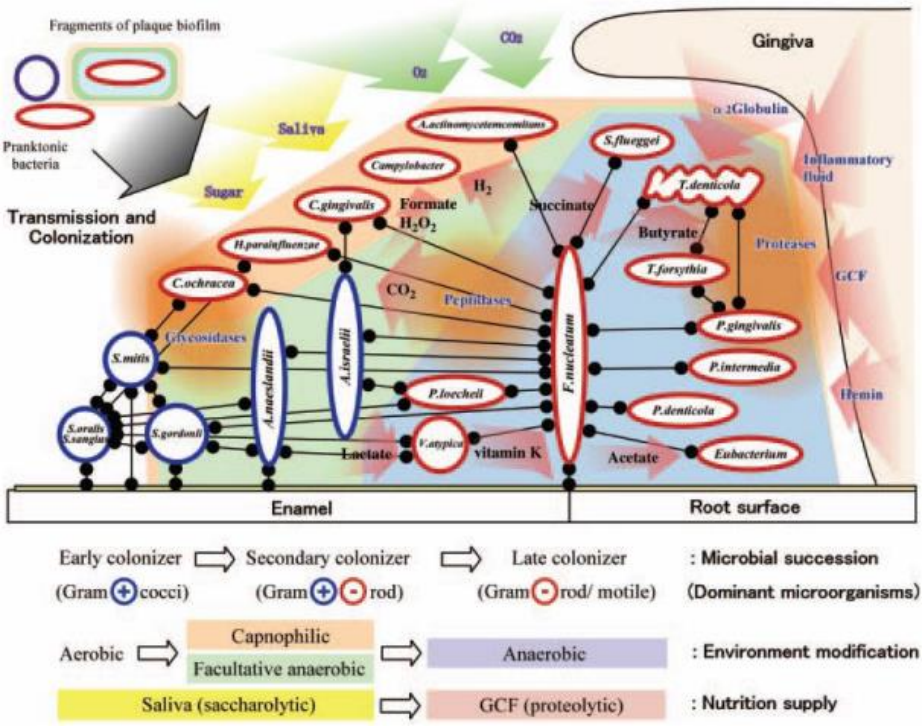


Figure 32: Organisation hiérarchique et complexité du biofilm parodontal pathologique[349]

Le biofilm parodontal se forme en plusieurs étapes. La présence de la pellicule exogène acquise, dite salivaire, composée de glycoprotéines, est la condition majeure à la constitution du biofilm dentaire puisqu'elle va faciliter l'attachement bactérien[350]. Il s'agit d'une couche acellulaire provenant de la salive ou du fluide créviculaire. Des bactéries colonisatrices primaires se fixent à cette pellicule recouvrant l'émail. Ces micro-organismes sont adsorbés premièrement d'une manière réversible. Cet attachement initial est promu par différents facteurs : la force hydrodynamique, le chimiotactisme, les forces électrostatiques et de Van der Waals. Ces bactéries sont saccharose-indépendantes, initialement planctoniques et proviennent de la flore salivaire. 80% des premières bactéries colonisatrices sont des streptocoques, notamment des streptocoques oraux (*Streptococcus oralis, mitis, salivarius* et *sanguinis*)[351]. Cette première phase est suivie d'une adhésion bactérienne irréversible à la PEA. L'adhésion dépend, entre autres, de la température de l'environnement et du pH du milieu dans lequel se trouvent les bactéries. Elles forment alors des liaisons de haute affinité utilisant des molécules de surface spécifiques comme les interactions adhésine/récepteur. Les bactéries disposent aussi d'un arsenal de fixation d'une grande richesse, composé de flagelles, de *curli* et de *pili* qui vont permettre leur adhérence aux différentes surfaces buccales et la co-agrégation avec d'autres bactéries[350].

Dans un second temps, les bactéries colonisatrices secondaires viennent recouvrir les bactéries pionnières de la colonisation. L'adhésion a lieu entre deux micro-organismes bactériens. On parle de co-adhésion ou co-agrégation. Parmi la deuxième vague de bactéries colonisatrices de la PEA, sont retrouvées essentiellement *Streptococcus mutans* et *Streptococcus sobrinus* mais aussi *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, PG, ou la famille des actinomyces, des lactobacilles et des tréponèmes[352]. La maturation du biofilm dentaire permet la formation d'une structure vivante spécifique, avec production de matrice extracellulaire, et mise en place d'échanges nutritifs entre les bactéries et microcolonies. La fraction acellulaire ou matrice est formée en partie de polysaccharides, de lipides et d'acides nucléiques. La composante cellulaire, majoritairement bactérienne, constitue cependant la fraction principale du biofilm (70%). De nombreux canaux sont retrouvés au sein de cette structure complexe, constituant les principales voies d'évacuation des produits de dégradation et des axes d'acheminement de nutriments au sein de la matrice d'exopolymères. Le biofilm offre une protection aux bactéries et permet également l'échange de gènes entre microorganismes leur conférant notamment une résistance à certains antibiotiques[350].

Les espèces bactériennes constituant le biofilm dentaire ont été regroupées en six complexes (Fig.33).

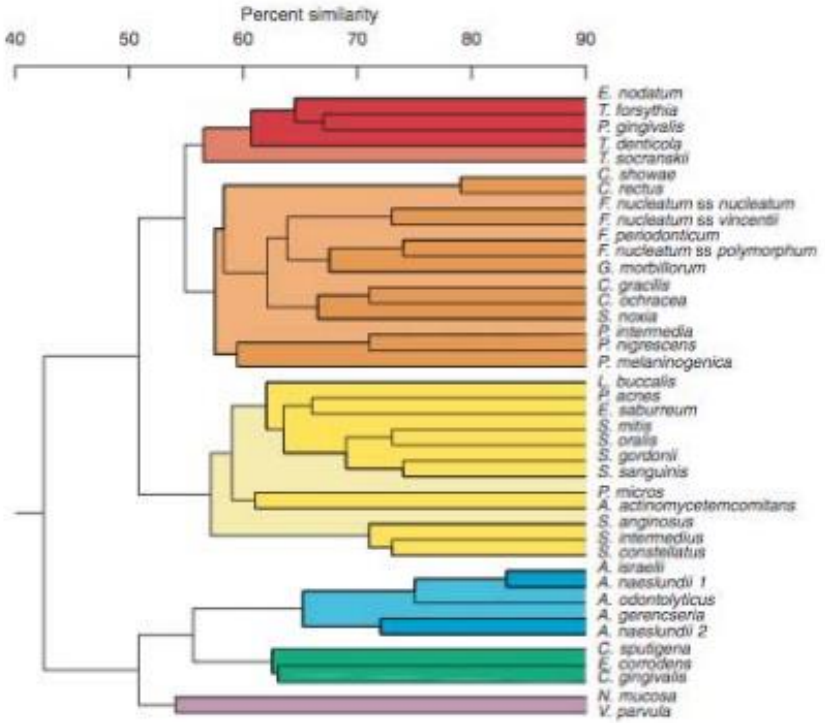


Figure 33: les complexes bactériens du biofilm parodontal[353].

Les échantillons de plaque sous-gingivale de personnes en bonne santé contiennent surtout les espèces Actinomyces (complexe bleu) et, en quantités inférieures, les espèces Streptococcus (complexe jaune) et Veillonella (complexe violet). Moins de 4% des bactéries totales identifiées font parties du complexe orange (Fusobacterium, Prevotella, Campylobacter rectus) ou du rouge (*PG*, *Tannerela forsythia*, *Treponema denticola (T. denticola)*), qui sont tous deux associés à la maladie parodontale. En effet, dans la plaque sous-gingivale de patients atteints de parodontite, les espèces dominantes étaient en effet les membres du complexe orange, avec aussi une augmentation significative de la prévalence de *PG*, *B. Forthysus* et *T. denticola* à la fois dans les plaques supra et sous-gingivale[354].

4.1.3 Parodontopathie et maladies systémiques

A l'heure actuelle, il est communément admis que l'état dentaire d'un patient est relié à sa santé générale et qu'un mauvais état bucco-dentaire peut prédisposer les patients au développement de certaines maladies systémiques. Plusieurs mécanismes selon lesquels les infections parodontales pourraient influencer la santé générale ont été décrits et pourraient passer par : une dissémination hématogène de pathogènes parodontaux avec action directe sur l'organe cible, une diffusion aérienne de ces pathogènes avec passage trans-trachéal et action directe également ou une propagation par voie sanguine de cytokines ou d'anticorps pouvant avoir un effet à distance[355].

4.1.3.1 Maladies cardiovasculaires

L'association entre la présence d'une maladie parodontale et le développement futur d'une maladie cardiovasculaire a été confirmée par une méta-analyse en 2003. Une augmentation du risque de 19% pour l'apparition de ce type de pathologie est observée en cas de parodontopathie, avec une majoration de ce risque relatif de 44% dans le groupe de patients

de moins de 65 ans[356]. L'ADN de pathogènes parodontaux comme *PG*, *T. forsythensis*, *T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans* et *C. rectus* ont été détectés dans des échantillons de plaques coronaires d'artères sténosées, dans les thrombus ou la paroi d'anévrysmes et dans les valves mitrales et aortiques[357,358]. Les taux de détection de *PG* notamment étaient corrélés à sa présence dans la plaque sous-gingivale[357]. Cette parodontopathie chronique se traduit par une élévation constante de l'inflammation systémique mise en évidence un taux légèrement élevé de CRP. Il est concevable que ce taux chroniquement élevé de CRP exacerbe les processus inflammatoires en cours dans les lésions d'athérosclérose, augmentant ainsi le risque d'événements cardiovasculaires et cérébrovasculaires. Un traitement des lésions parodontales a montré un bénéfice modeste dans la réduction de ce taux de CRP[359]. Outre l'inflammation, ces bactéries orales pourraient avoir une action directe sur les vaisseaux. Des données suggèrent que *PG*, *A. actinomycetemcomitans* et *P. intermedia* ont la capacité d'envahir les cellules de l'hôte et d'atteindre la circulation sanguine. Ces pathogènes peuvent alors infecter l'épithélium vasculaire et les plaques d'athérosclérose, causant une inflammation et une instabilité de la plaque. De plus, par leurs facteurs de virulence qui peuvent avoir un effet délétère sur le système vasculaire, ils pourraient engendrer une agrégation plaquettaire, une adhésion et la formation de cellules riches en lipides et le dépôt de cholestérol formant l'athérome[355].

4.1.3.2 Diabète

Le diabète et la maladie parodontale sont 2 maladies chroniques généralement considérées comme biologiquement liées. En effet, le diabète est l'un des facteurs de risque principaux de la parodontopathie, avec un risque 3 à 4 fois plus important de développer cette maladie chez les patients diabétiques par rapport aux non diabétiques. De plus, il existe une corrélation directe entre le niveau de contrôle de la glycémie et la sévérité de la parodontopathie[360], avec une perte d'attache dentaire plus importante à la fois pour le diabète de type 1 et 2. Des patients atteints de diabète de type 2 présentent en fait plus de sites de perte d'attache clinique. Au niveau de la perte d'os alvéolaire, le pourcentage de sites présentant une perte osseuse est de 44% chez les sujets diabétiques mal contrôlés et de 28% et 24% pour les patients bien contrôlés ou les sujets sains. Le risque et le degré de perte d'os alvéolaire est donc positivement corrélé à l'absence de contrôle du diabète[361]. Le diabète induirait une augmentation de la formation des ostéoclastes dans les zones inflammatoires, ainsi qu'une inflammation parodontale prolongée et favoriserait l'apoptose des cellules ostéoblastiques, réduisant ainsi le raccordement osseux[362]. A l'inverse, la présence d'une maladie parodontale chronique pourrait avoir un impact sur l'état métabolique du diabète. Comme décrit précédemment, la maladie parodontale induit une inflammation systémique. Cette inflammation augmente la résistance à l'insuline et rend le contrôle glycémique difficile pour les patients diabétiques[355]. Il est intéressant de noter que *PG* est détecté plus fréquemment chez les patients ayant un taux élevé d'HbA1c après traitement parodontal par rapport à ceux dont le taux d'HbA1c est diminué. De plus, les souches *PG* exprimant la fimbriae de type II sont uniquement détectées chez les sujets dont l'HbA1C est haute, alors que des améliorations de cette hémoglobine glyquée ne sont observées que chez les sujets qui ne sont pas porteurs de cette souche. Ces résultats suggèrent que les taux de glycémie chez les patients diabétiques

sont affectés par la persistance de *PG* dans les poches parodontales, en particulier les souches avec la fimbriae de type II[363].

4.1.3.3 Maladies auto-immunes

Outre la PR qui sera détaillée ultérieurement, une plus grande prévalence de parodontopathie a été relevée dans le lupus érythémateux disséminé[364] (LED), avec une fréquence décrite d'environ 60%[365] à 70%[366]. Sur une étude incluant 46 patients LED, la sévérité de la maladie était associée à une présence plus fréquente de perte dentaire et à une augmentation de l'inflammation gingivale[367]. Le risque de développer une maladie parodontale dans le LED pourrait être lié à la présence d'un polymorphisme au niveau du récepteur Fc des IgG, l'allèle FcgammaRIIa-R131[366]. De plus, le traitement de la parodontopathie semble avoir un effet bénéfique dans le contrôle du LED chez les patients sous traitement immunosuppresseur[368].

La spondylarthrite ankylosante (SA) est défini comme une maladie inflammatoire rhumatismale chronique affectant principalement le squelette axial, provoquant une inflammation de la colonne vertébral et des articulations sacro iliennes. Une méta analyse en 2014 a inclus 6 études cas-témoins afin d'évaluer le lien potentiel entre SA et parodontopathie. La prévalence de la maladie parodontale dans la SA était très variable selon l'étude considérée, avec un taux allant de 37.5% à 87.8%. Cette analyse montre cependant un risque important et statistiquement significatif de SA associé à la maladie parodontale[369]. La relation entre la présence d'une atteinte parodontale et la sévérité de la SA reste par contre controversée. Les taux d'anticorps anti-*PG* et *Prevotella intermedia* sont plus élevés chez les patients SA que chez des sujets sains. L'utilisation d'antibiotiques, la rifamycine ou la moxifloxacine, semble avoir également un effet bénéfique dans le traitement de la SA[370].

Certaines études ont montré une relation entre maladie parodontale et MICI ces dernières années, notamment pour la MC péri-anale[371,372]. Les patients MICI ont une prévalence, une gravité et une extension de la parodontopathie plus importante par rapport aux patients ne présentant pas ces maladies[373]. Les patients atteints de MC qui présentent des altérations sévères des tissus oraux étaient significativement plus souvent porteurs de l'allèle A rs361525 que l'allèle G au niveau du polymorphisme du TNF, avec une profondeur de sondage parodontale moyenne plus importante ainsi qu'une perte d'attachement clinique plus forte[374]. Aucun rôle de mutations de NOD2 (CARD15) n'a pu être mis en évidence dans les lésions parodontales[372]. Néanmoins, aucune donnée à l'heure actuelle ne permet de dire si cette infection parodontale a un rôle déclenchant dans les MICI. L'hypothèse de la MICI en tant que facteur de risque de parodontopathie reste principale.

4.1.3.4 Autres maladies systémiques

Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est la cause la plus fréquente de démence primaire dégénérative chez la personne âgée. L'accumulation de la protéine β-amyloïde et l'hyperphosphorylation de la protéine Tau sont pathognomoniques de cette pathologie. Néanmoins, la neuroinflammation est considérée comme un facteur impliqué dans l'apparition et la progression plus rapide de la maladie d'Alzheimer[375]. En analysant les données nationales NHANES III, Roble *et al* ont

montré que les participants de plus de 60 ans ayant des taux élevés d'anticorps sériques anti-*PG* présentaient des scores significativement plus faibles sur la mémoire et les tâches de calcul[376]. Des taux élevés de TNF et d'anticorps dirigés contre les bactéries parodontales ont été mesurés chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer par rapport au groupe contrôle[377]. De plus, ces anticorps sont retrouvés des années avant la déficience cognitive, suggérant l'implication de la parodontopathie dans le déclanchement et la progression de la maladie d'Alzheimer[378]. Récemment, la présence de LPS de *PG* a été mise en évidence dans du tissu cérébral post-mortem de 4 patients Alzheimer sur les 10 testés. Aucune évidence de ce LPS n'a été remarquée dans les 10 tissus contrôles[379]. Cette étude confirme la possibilité pour le LPS des bactéries parodontales d'accéder au cerveau des patients Alzheimer pendant la vie. Bien que le mécanisme soit encore mal connu, les macrophages pro-inflammatoires et les composants bactériens présents dans la parodontopathie chronique pourraient activer les récepteurs localisés sur la surface des leptoméninges, qui à son tour activeraient les microglies cérébrales et engendreraient la neuroinflammation. Cette notion de parodontopathie en tant que facteur de risque de maladie d'Alzheimer reste cependant encore hypothétique à l'heure actuelle et des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ce mécanisme[375].

Cancer

Des études épidémiologiques ont établi un lien potentiel entre la maladie parodontale et le risque de développement de certains cancers, notamment pancréatique, ORL et gastro-œsophagien. Les facteurs de risque majeurs pour les cancers ORL sont l'alcool et le tabac, les 2 étant associés à l'hygiène dentaire et donc susceptibles d'être des facteurs de confusion pour établir le lien avec les cancers ORL. Néanmoins, des études cas-témoins qui ont quantitativement examiné l'association entre la perte dentaire et les cancers ORL ont observé une augmentation du risque cancéreux de 2 à 3 fois après ajustement avec la consommation d'alcool et de tabac (Fig.34). Ces données ne précisent pas le site atteint (pharynx, larynx, cavité buccale…)[380]. Le cancer du pancréas a aussi été relié à la maladie parodontale sur 3 études, dont la plus récente en 2007 a été réalisée sur un suivi de cohorte de 51 529 hommes âgés de 40 à 75 ans pendant 16 ans. Sur 216 patients ayant développé un cancer du pancréas, un antécédent de parodontopathie était associé à un risque accru de cancer (RR= 1.64 95% CI = 1.19 à 2.26), avec un risque plus important chez les patients n'ayant jamais fumés[381]. Au niveau gastro-œsophagien, le plus haut risque était atteint pour les cancers gastriques (non cardia) établie sur un suivi de cohorte de 28 868 personnes pendant plus de 5 ans, avec un risque relatif moyen de 1.8 (95% CI = 1.1-3.0)[382].

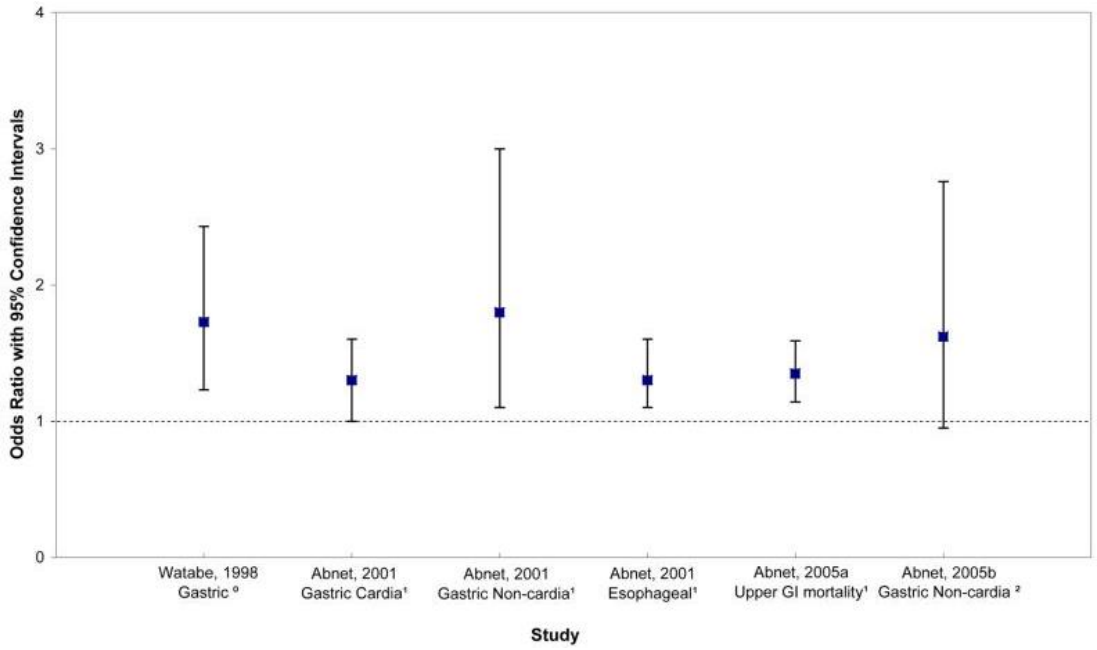


Figure 34: Evaluation du risque de cancer gastro-œsophagien relatif à la perte dentaire[380].

Les mécanismes impliqués dans la carcinogénèse pourraient être différents selon les sites. Les bactéries pourraient avoir un rôle plus direct dans la cancérogénèse ORL ou pulmonaire alors que pour les organes plus éloignés, l'inflammation ou la présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de nitrosamines pourraient jouer un rôle plus important[383]. En fait, différentes hypothèses pourraient expliquer ce lien : l'inflammation chronique engendrée par les pathogènes parodontaux pourrait promouvoir une croissance cellulaire anormale, la chronicité de la parodontopathie pourrait signer un défaut du système immunitaire marquant ainsi son incapacité à surveiller également la croissance tumorale ou à résoudre la réponse inflammatoire parodontale, la production de ROS pourrait induire des altérations génétiques, sans compter l'effet pathogène direct de ces bactéries qui pourraient induire une inflammation et des transformations cancérigènes au niveau local (à l'exemple de *H. pylori*)[383]. De manière générale, le risque cancéreux total induit par la parodontopathie reste modéré mais significatif. Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer cette association.

Risque obstétrical

Une hypotrophie (poids de naissance < 2500g) et une prématurité (naissance avant 37 semaines d'aménorrhée) sont 2 déterminants majeurs de morbidité et de mortalité chez le nouveau-né. Une analyse multivariée a montré que les mères ayant plus de 60% de sites présentant une perte d'attache clinique de 3 mm ou plus avaient 7 fois plus de risque de faire une complication lors de leur grossesse que les mères sans parodontopathie. Il s'agit d'un risque indépendant des facteurs de risque obstétriques connus comme le tabac, l'alcool, la drogue, les infections et les troubles nutritionnels[384]. Des différences entre les mères développant ou non une menace d'accouchement prématuré (MAP) ont été aussi relevées. Un mauvais état parodontal associé à une élévation des cytokines IL-8 et IL1β était plus fréquemment retrouvé en cas de MAP. Une corrélation inverse a été rapportée entre l'âge gestationnel à la naissance et les paramètres parodontaux et les taux de ces cytokines[385]. Des

pathogènes parodontaux, incluant *PG,* ont été détectés par PCR dans le liquide amniotique de femmes enceintes en MAP et dans le placenta de patientes en pré éclampsie[355]. Le mécanisme liant la parodontopathie et les naissances prématurées n'est pas encore prouvé mais pourrait passer par le relargage dans le sang circulant de molécules inflammatoires, par l'effet d'une bactériémie ou une réponse immunitaire fœto-maternelle contre les agents parodontaux.

4.1.4 Lien entre la parodontopathie et la PR

Au cours de ces 15 dernières années, un certain nombre de grandes études épidémiologiques ainsi que de plus faibles études de cohortes ou cas témoins ont été publiées montrant une association entre maladie parodontale et la PR[386]. Un facteur environnemental commun à ces 2 pathologies est le tabagisme, ce qui pourrait entraîner un biais de confusion dans ces études de corrélation. De ce fait, une évaluation de la parodontopathie chez 91 patients PR non-fumeurs a permis de confirmer la fréquence et la sévérité de la maladie parodontale dans ce groupe de patients par rapport à des sujets sains[387]. Cette association est également retrouvée dans les stades précoces de PR[388]. La parodontopathie est aussi liée à des PR plus sévères, c'est-à-dire présentant un plus grand nombre d'articulations enflées, un score d'activité représenté par le DAS 28 CRP plus haut, un score de SHARP pour l'évaluation radiologique de l'atteinte articulaire plus élevé, ainsi qu'à la présence et au taux d'anticorps anti-CCP et de facteurs rhumatoïdes[389]. La PR et la maladie parodontale partagent de nombreux points communs au niveau physiopathologique. Tout d'abord, un terrain génétique similaire a été observé entre ces 2 pathologies. L'examen des allèles DRB1*04 qui codent pour l'HLA DR4 chez des patients présentant une parodontopathie rapidement progressive indique une plus grande fréquence d'un sous type DRB1 que dans le groupe contrôle[390]. Le gène HLA DRB1 fait partie de l'épitope partagé dont l'importance dans le risque et la sévérité de la PR est démontré depuis une trentaine d'années[391]. Outre le système HLA, d'autres facteurs de risque génétiques communs ont été mis en évidence, notamment au niveau des polymorphismes de gènes codant pour des cytokines. Ainsi, la combinaison des allèles de l'IL-1A +4845 et de l'IL-1B +3954 est fortement associée à la fois à la PR et à la parodontopathie[392]. Ces résultats sont soutenus par une autre étude évaluant les polymorphismes de 16 gènes de cytokines et dont seul l'allèle +3954 de l'IL-1B est ressorti de manière significative[393]. Le récepteur TLR-2 est essentiel pour la reconnaissance du lipopolysaccharide (LPS) bactérien. L'expression génique du TLR-2 est plus importante dans les PBMC de patients atteints de parodontopathie sévère et de PR que dans les sujets sains[394]. Le TLR-2 est exprimé dans le tissu parodontal humain, avec une prépondérance de cellules exprimant ce récepteur située dans le tissu conjonctif sous-jacent l'épithélium de la poche parodontale[395]. Dans le tissu synovial de patients PR, les monocytes $CD16^+$ $TLR\text{-}2^+$ se situent préférentiellement dans la membrane synoviale[396]. Cette surexpression de l'IL-1B et du TLR-2 peut constituer un facteur de risque commun pour ces 2 pathologies inflammatoires. La méthylation de l'ADN est un des phénomènes épigénétiques principaux dans lequel certaines bases nucléotidiques peuvent être modifiées par l'addition d'un groupement méthyle. Cette méthylation joue un rôle majeur dans le contrôle de l'expression génique[397]. Le taux de méthylation du motif CpG à -74 bp dans la région du promoteur de l'IL-6 est plus bas chez les patients présentant une parodontopathie ou une PR que chez les sujets sains. Le taux sérique d'IL-6 et la production de cette cytokine par les PBMC est différente entre les individus avec ou sans la méthylation à -74bp. Cette étude

suggère que le statut hypométhylé de ce seul motif CpG dans la région promotrice de l'IL-6 peut aboutir à l'élévation des taux sériques d'IL-6, impliquant un rôle potentiel dans la physiopathologie de ces 2 maladies[398].

Chez les patients PR, l'expansion clonale prédominante de certaines familles de TCR Vβ a été observée dans le sang et le liquide synovial, notamment Vβ 6 et 22[399]. Ces répertoires Vβ peuvent être influencés par des bactéries parodontales ; des résultats différents sont retrouvés selon la bactérie et la souche étudiée[400]. Cette expansion oligoclonale pourrait être une caractéristique importante dans le PR mais les études actuelles ne sont pas consensuelles pour affirmer cette hypothèse.

Ces 2 maladies inflammatoires se manifestent en raison de la persistance de taux élevés de cytokines pro-inflammatoires, en particulier le TNF et l'IL-6, qui sont impliqués dans la destruction tissulaire[394]. Les lymphocytes TH17 et l'IL-17 sécrétée par ces cellules jouent également un rôle important dans la physiopathologie de la PR. Ces mêmes constituants ont été retrouvés au niveau des gencives inflammatoires des patients ayant une parodontopathie[401]. De même, l'IL-1 et l'IL-18 sont retrouvés au niveau du parodonte et de la synoviale inflammatoires[402]. Récemment, l'IL-33, dont l'expression avait déjà été relevée dans les cellules endothéliales de la synoviale de patients PR[403], est aussi surexprimée dans du tissu gingival de patients ayant une parodontopathie chronique par rapport à des sujets sains. L'IL-33 pourrait exacerber la perte osseuse en activant les voies de signalisation de RANKL, dans le contexte d'une infection bactérienne[404].

Un des enjeux qui découle de cette association serait l'amélioration d'une pathologie par le traitement de l'autre. Ainsi, une méta-analyse en 2014 a pu inclure 5 études qui relevaient l'effet d'un traitement parodontal sur des marqueurs cliniques et biochimiques de la PR (Fig.35). Il est important de noter que ces études comportaient un faible nombre de patients (de 10 à 26 dans le groupe traité) et que la période d'observation allait de 6 semaines à 6 mois, ce qui est considérée comme une durée assez courte. Tous les patients PR inclus dans le groupe traité ont reçu un traitement non chirurgical de leur parodontopathie, qui consistait en des instructions d'hygiène bucco-dentaire et des débridements sous-gingivaux réalisés sur plusieurs visites. Après traitement, la VS se retrouve significativement réduite, et une tendance pour une baisse du DAS28 et du taux de TNF est également notée[405].

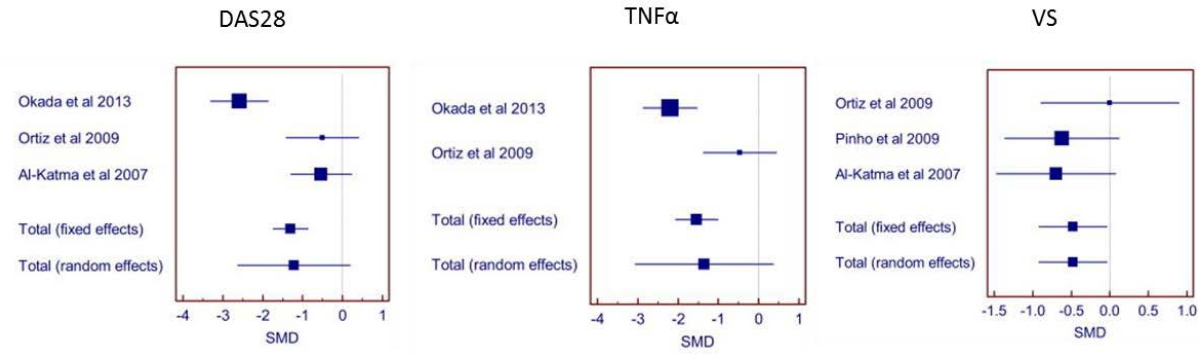


Figure 35 : Effet d'un traitement non-chirurgical sur l'activité de la PR (DAS28 et certains marqueurs inflammatoires (TNF, VS)[405]

Toujours au niveau thérapeutique, il a été montré que la maladie parodontale affectait l'efficacité des anti-TNF avec une absence d'amélioration du DAS28 et des marqueurs inflammatoires (CRP, VS) à 6 mois de traitement[406]. La persistance d'un état inflammatoire gingival pourrait donc entraver la réponse au traitement de la PR. La prise additionnelle d'un antibiotique, la doxycycline, en plus du méthotrexate a montré une supériorité dans la réponse clinique ACR 50 par rapport au méthotrexate seul[407]. De même, la roxithromycine[408] et la clarithromycine[409], 2 antibiotiques ciblant les anaérobies, ont montré une efficacité dans le traitement de la PR précoce active selon les critères de réponse ACR 20, 50 et 70. L'importance d'une antibiothérapie dans la PR reste cependant à analyser sur des études complémentaires.

Enfin, plusieurs groupes de recherche ont rapporté une augmentation du nombre et de la variété de l'ADN de bactéries parodontales et des anticorps ciblant ces bactéries dans le sérum et le liquide synovial de patients PR[410,411]. En effet, des anticorps de type IgG anti-*PG*, *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, et *Bacteroides forsythus* sont retrouvés plus élevés dans le sérum des patients PR que dans le groupe contrôle[412], indiquant un rôle bactérien potentiellement important dans la physiopathologie de la PR. Une bactérie en particulier, *PG*, pourrait avoir un rôle prépondérant par sa capacité à exprimer certains facteurs de virulence.

4.2 Rôle de *Porphyromonas gingivalis* dans l'induction de l'auto-immunité

Parmi les 500 espèces bactériennes vivant dans la cavité buccale, un complexe bactérien nommé « complexe rouge » composé de *PG*, *T. denticola* et *Tannerella forsythia* est fortement associé aux lésions parodontales sévères[413]. *PG* est un membre naturel du microbiote oral mais il a la capacité de devenir hautement destructeur en proliférant dans les lésions parodontales grâce à l'action de ses facteurs de virulence.

4.2.1 Caractéristiques du pathogène *PG*

4.2.1.1 Description morphologique et épidémiologique (Fig.36)

PG est une bactérie en bâtonnet gram négative, non mobile, pigmentée noire, ne pouvant pas métaboliser les carbohydrates comme source d'énergie et nécessitant des conditions de culture en anaérobiose stricte et la présence d'hème et de vitamine K dans son milieu nutritif.

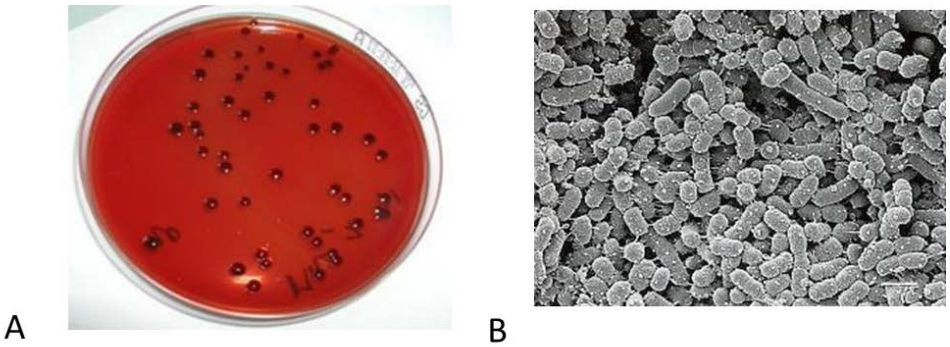


Figure 36: Morphologie de *PG* en culture sur gélose Colombia (A) et en microscopie électronique (B)

Il acquiert son énergie métabolique par la fermentation des acides aminés, une capacité décisive pour sa survie dans les poches parodontales profondes où la disponibilité du sucre est très rare[414]. Au laboratoire, son identification peut être obtenue par biologie moléculaire[415] ou par les caractéristiques suivantes : l'absence de fermentation des sucres, l'agglutination des érythrocytes, l'absence de production de catalase, la présence d'une enzyme pseudo-trypsine, la présence d'une N-acétyl-βD-glucosaminidase, et la production d'acide phénylacétique[416]. La pigmentation noire de *PG* observée sur gélose au sang est associée à l'agrégation de l'hème sur sa surface cellulaire. Cette bactérie est un colonisateur tardif du biofilm parodontal et se niche dans les parties profondes de ce biofilm, au contact du tissu gingival[414].

Les bactéries gram négatives sont généralement délimitées par 2 structures membraneuses (Fig.37). La membrane plasmatique interne, composée d'une bicouche de phospholipides, est une structure tri-lamellaire qui délimite le protoplasme bactérien. La membrane externe, qui est une structure tri-lamellaire également, se compose de protéines incluant des porines et récepteurs ainsi qu'une distribution asymétrique de lipides. Le feuillet externe est principalement composé de lipopolysaccharides (LPS) dirigés vers l'extérieur alors que le feuillet interne est composé de phospholipides et lipoprotéines. Le LPS d'une bactérie gram négative est séparé en 3 secteurs : le lipide-A, le noyau polysaccharide et les chaînes polysaccharides O se projetant vers l'extérieur. Ces 2 membranes sont séparées par une couche de gel appelée le périplasme contenant une couche mince de peptidoglycane[417]. Une partie de la membrane externe peur subir un processus de renflement et de pincement pouvant être à l'origine de vésicules (OMV). Ces vésicules contiennent des protéines de la membrane externe, des protéines périplasmatiques, des phospholipides, LPS et autres facteurs de virulence.

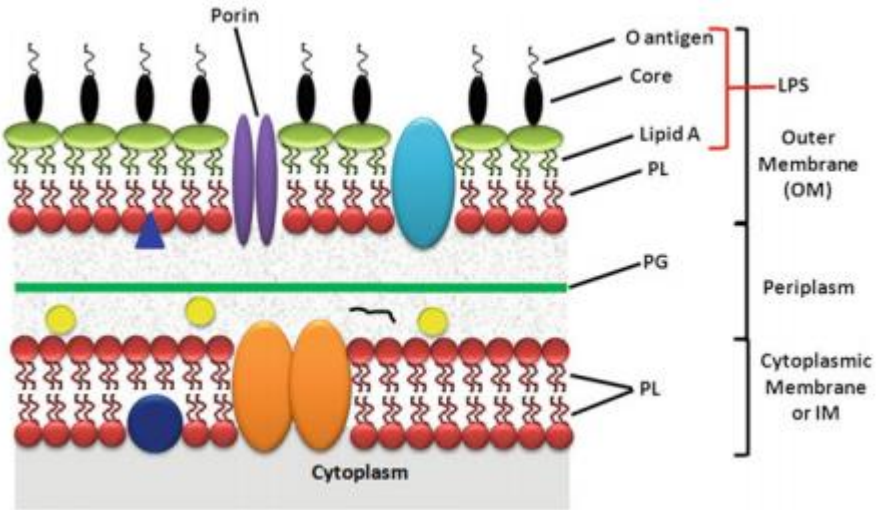


Figure 37: Représentation schématique de la paroi d'une bactérie gram négative[417].

Les *pili* ou *fimbriae* sont des termes interchangeables utilisés pour désigner des structures protéiques courtes, ressemblant à des cheveux, à la surface des bactéries. Ces *fimbriae* sont très fréquents chez les bactéries gram négatives.

Il existe une grande diversité de souches au sein de *PG*. A ce jour, 6 sérotypes ont été identifiés en se basant sur l'antigène K, un polysaccharide de la capsule, avec une prédominance des types K5 (12%) et K6 (23.2%). Le sérotype K1, représenté par la souche W83, a été retrouvé chez 3.7% des patients allemands atteints de parodontopathie[418]. Plusieurs souches ne pouvant pas être typées présentent cependant une capsule, suggérant l'existence de sérotypes K autres que K1 à K6. Dans une moindre mesure, certaines souches ne possédant pas de capsule et donc d'antigènes K ont la capacité de s'auto-agréger dans du PBS[419]. Outre la capsule, plusieurs génotypes de *PG* ont été caractérisés en fonction des *fimbriae*, des enzymes protéolytiques (gingipains), et des cystéines protéinases (arginine ou lysine spécifique). Ces différentes souches de *PG* influencent sa pathogénie, vraisemblablement par l'expression de facteurs de virulences spécifiques. En effet, les souches encapsulées induiraient majoritairement la formation d'abcès sévères, le fimbriae de type II serait associé aux maladies parodontales et des variations de la réponse inflammatoire ont été rapportées selon les souches avec des réactions plus fortes pour les *fimbriae* II, Ib, IV et V[418].

4.2.1.2 Facteurs de virulence

Lipopolysaccharide (LPS)

Comme toutes les espèces bactériennes gram-négatives, *PG* est enveloppé par du LPS, qui est un composant de la membrane externe reconnu par l'hôte. Le LPS de *PG* stimule les réponses pro-inflammatoires et induit une perte osseuse après injection dans la gencive de souris Balb/c, bien que cette résorption osseuse soit moins prononcée qu'avec *A. actinomycetemcomitans*[420]. *In vitro*, ce LPS permet la production des cytokines IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-18 et TNF par les monocytes. Néanmoins, le LPS de *PG* présente certaines caractéristiques particulières quand on considère son action sur la réponse immunitaire. En effet, en plus d'être un faible inducteur de cytokines par rapport au LPS d'autres bactéries gram-négatives, il peut également s'opposer à la production d'IL-1 des autres espèces bactériennes par les monocytes. Cet effet est surtout remarqué avec *C. rectus* dont la co-culture avec *PG* réduit sa capacité de sécrétion cytokinique de 70%[421]. Le LPS de *PG* inhibe l'activité de la phosphatase alcaline ainsi que la production de collagène type 1 alpha 1 et d'ostéocalcine dans les cellules souches du ligament parodontal. Ce LPS pourrait donc inhiber la différenciation ostéoblastique[422].

Au niveau structurel, le LPS de *PG* présente aussi des caractéristiques uniques en comparaison avec le LPS d'autres espèces bactériennes. Ainsi, il existe une diversité dans la structure de l'antigène O entre les souches de *PG* qui peut aboutir à des différences antigéniques[423] et une variabilité du lipide-A dans ses motifs d'acylation et sa capacité à activer certains récepteurs. En effet, alors que le lipide-A de la majorité des gram-négatif est un puissant activateur de réponses TLR-4, le lipide-A de *PG* est majoritairement un activateur TLR-2, pouvant même agir comme antagoniste du TLR-4[424]. Ce lipide-A peut avoir 2 formes principales d'acylation : une tétra-acylée et une penta-acylée. Ces 2 structures induisent une réponse de l'hôte opposée. Alors que la forme penta-acylée du lipide-A active le TLR-4, le lipide-A tétra-acylée agit comme un antagoniste du TLR-4. Ces changements d'acylation du lipide-A pourraient être dépendants des conditions micro-environnementales, en particulier la

disponibilité de l'hème[424]. Un second type de LPS a été identifié dans la souche W50 de *PG,* immunologiquement lié aux additions post-traductionnelles des enzymes Arg-gingipains[425].

Capsule

Un des facteurs de virulence majeurs de *PG* est sa capsule polysaccharidique, nommée également antigène K. Les souches encapsulées de ce germe sont plus invasives, causant des infections systémiques alors qu'en l'absence de capsule cette bactérie induit préférentiellement des abcès localisés. Cette capsule permet à *PG* d'être plus résistant à la phagocytose par les polynucléaires neutrophiles[424]. La capacité d'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales parodontales est influencée par la présence et le type de cet antigène K. En effet, les souches non encapsulées adhèrent significativement mieux que les variants encapsulés et l'antigène K-4 légèrement mieux que les autres types K restants[426]. Des différences existent aussi dans la capacité de ces souches à stimuler la production de chimiokines et de cytokines. Ainsi, le sérotype K-1 induit une sécrétion importante de chimiokine par les macrophages alors que les souches K-2 à K-7 sont moins stimulantes[427]. Bien que toutes les souches de *PG* provoquent la sécrétion de cytokines de la réponse Th1, les cellules dendritiques infectés par les bactéries K-1 et K2 expriment de plus hauts taux d'IL-1beta, IL-6, IL-12p35, IL-12p40, et d'IFN-gamma que les autres sérotypes K[428].

Fimbriae

PG possède de nombreux fimbriae, appendices fins et filamenteux, qui facilitent son adhésion aux protéines salivaires, à la matrice extracellulaire, aux cellules eucaryotes et aux bactéries de mêmes espèces ou non (Fig.38). Deux fimbriae distinctes peuvent se trouver à la surface de ce pathogène : les longs fimbriae (ou majeurs) sont individualisés en 6 types (I à V et Ib) suivant la variabilité du gène fimA et les courts (ou mineurs) sont codés par le gène mfA1[429].

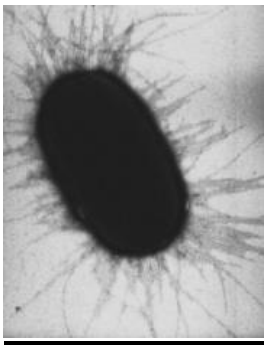


Figure 38: Figure 16: Visualisation des fimbriae de *PG*

La majorité des patients atteints de parodontopathie sont porteurs d'organismes fim A de type II suivi du type IV, avec une association entre le type II et les formes sévères de la maladie[430]. Alors que les fimbriae majeurs pourraient détenir un rôle important dans la colonisation et l'invasion de *PG*, les mineurs possèderaient un plus haut potentiel inflammatoire[424,430]. Les 2 types de fimbriae sont cependant capables d'induire la production de cytokines comme l'IL-1alpha, IL-1beta, IL-6, IL-8, TNF[431] et certaines métalloprotéinases matricielles comme la MMP-9[432]. Les fimbriae ont également un rôle dans l'induction de la destruction osseuse

retrouvée dans la parodontopathie. En effet, des souches de *PG* knock out concernant les gènes codant pour les fimbriae n'engendrent qu'une plus faible perte osseuse dans un modèle de rats infectés oralement par ces souches mutantes en comparaison aux souches wild type[433]. De plus, un vaccin muqueux dirigé contre la fibrilline, constituant majeur des fimbriae, a montré une efficacité dans la prévention de la perte osseuse alvéolaire chez le rat. Ainsi, l'administration orale d'épitopes Fim A de *PG* grâce à un vecteur bactérien (S. gordonii) aboutit à l'induction d'anticorps sériques (IgG et IgA) et salivaires (IgA) spécifiques et protecteurs[434]. Enfin, une caractéristique intéressante des fimbriae est de pouvoir intéragir avec le récepteur du complément 3 (CR3) après activation du TLR2, ce qui permet l'internalisation de *PG* dans les macrophages (Fig.39). Il en résulte une persistance intracellulaire de ce germe avec une réduction de la production de l'IL-12 et ainsi une diminution de la clairance bactérienne[435].

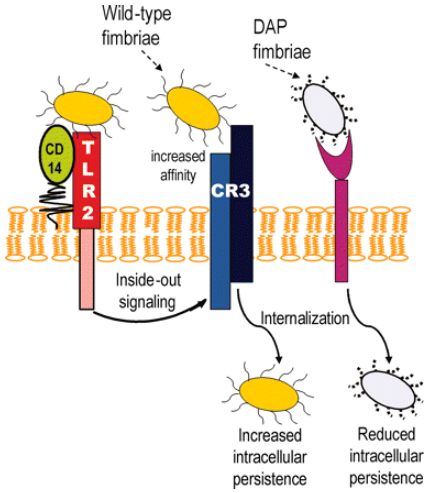


Figure 39: Mécanisme d'internalisation de *PG* par le récepteur CR3[435].

Enzymes bactériennes

Les gingipains sont des protéases synthétisées par *PG* à sa surface cellulaire mais aussi sous forme soluble. Elles comptent pour plus de 85% de l'activité protéolytique totale de *PG*. Les gingipains sont divisés en 2 catégories selon la spécificité de leur substrat : ceux agissant spécifiquement sur l'arginine (Arg-X) et ceux spécifiques de la lysine (Lys-X). Ces enzymes sont impliquées dans la survie et l'adhésion de la bactérie à l'hôte[436]. En effet, les gingipains Arg-X jouent un rôle important dans la formation des fimbriae par le clivage des pro-fimbrilline en fimbrilline. Ils ont aussi une activité de type trypsine et peuvent dégrader les composants de la matrice extra-cellulaire, y compris la fibronectine, la laminine, les cytokines, les immunoglobulines et les facteurs du complément[424]. Ces Arg-X pourraient aussi participer à la perte osseuse alvéolaire par l'induction de la formation des ostéoclastes[436]. En effet, des souris inoculées oralement avec des souches mutées de *PG* au niveau des gingipains présentent une baisse de la perte osseuse ainsi qu'une réponse immunitaire de type IgG3 plus faible en rapport avec la souche non mutée[437]. D'ailleurs, l'immunisation préalable de rats avec un complexe Arg-X / Lys-X / adjuvant incomplet de Freud permet de protéger l'animal de la perte osseuse, et de réduire la colonisation de *PG* au niveau parodontal[438].

Ces gingipains ont de multiples effets sur les composants moléculaires du système immunitaire, ayant pour conséquence leur dérégulation. Ainsi, ils clivent les récepteurs des lymphocytes T comme le CD4 et le CD8, empêchant ainsi la réponse immunitaire à médiation cellulaire[439]. Ils peuvent aussi stimuler l'expression des récepteurs activés par les protéases (PARs) au niveau des polynucléaires neutrophiles, des cellules épithéliales gingivales, des fibroblastes gingivaux et des lymphocytes T[424]. Ces récepteurs PARs, qui sont activés par clivage protéolytique, induisent des voies de signalisation intracellulaire associées à l'inflammation, comme la production de cytokines[440]. Chez les patients atteints de parodontopathie chronique, la présence de *PG* dans le fluide créviculaire est associée à une augmentation de l'expression du gène de PAR2, à une activité protéolytique plus élevée, à un profil cytokinique pro-inflammatoire avec une destruction clinique avancée[441]. Les gingipains peuvent stimuler la production d'IL-6 et d'IL-8 renforçant la réponse inflammatoire. A l'inverse, il a été montré que ces enzymes avaient la capacité d'inactiver par protéolyse certaines cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-5) mais aussi pro-inflammatoires (IL-12, IFNγ)[424]. En outre, ces protéinases produites par *PG* ont également la capacité de dégrader les β-défensines 1 et 2, ce qui pourrait conduire à une réponse immunitaire innée affaiblie[442]. Enfin, ces gingipains pourraient avoir une action particulière sur les facteurs du complément. Ainsi, les Arg-X peuvent dégrader la fraction C3, contribuant potentiellement à la baisse de l'opsonisation bactérienne. Ces mêmes enzymes peuvent également cliver la fraction C5, libérant alors la fraction C5a nécessaire au recrutement des polynucléaires neutrophiles. Cependant, les Lys-X peuvent inactiver le récepteur au C5a sur ces polynucléaires, effet qui peut nuire à leur recrutement[424]. Certaines caractéristiques liées à l'action de ces gingipains peuvent donc paraître contradictoires en regard du système immunitaire. Une hypothèse pourrait être émise pour expliquer ces variations : la concentration en gingipains est élevée près de la barrière épithéliale où réside le biofilm, provoquant la dégradation et dérégulation du système immunitaire afin de faciliter l'invasion bactérienne. Cette concentration étant plus faible dans le tissu conjonctival plus profond, ces enzymes stimuleraient alors l'inflammation au lieu de l'inhiber, induisant la destruction du tissu conjonctif et de l'os sous-jacent, signe distinctif de la parodontopathie.

PG est le seul organisme procaryote connu à ce jour pour exprimer une enzyme capable de citrulliner les protéines, la peptidylarginine déiminase (PPAD). Cette modification protéique engendre la production d'ions ammonium, ayant pour fonction de protéger les cellules bactériennes contre les effets néfastes d'un environnement acide qui peut être retrouvé au niveau buccal[443]. Cette PPAD est exprimée au niveau de la membrane bactérienne externe, comme les gingipains Arg-X. La délétion du gène de la PPAD résulte en une abrogation complète de la citrullination des protéines, mais il est important de noter que l'inactivation des gingipains Arg-X, mais non des Lys-X, entraîne également une diminution de cette citrullination. Ces 2 enzymes participent donc à cette modification protéique. *PG* génère ainsi rapidement des peptides de l'hôte et bactériens citrullinés grâce à 2 étapes : tout d'abord par un clivage protéolytique au niveau des liaisons peptidiques par les gingipains Arg-X, suivis par la citrullination des arginines sur les sites carboxy-terminaux par la PAD bactérienne[444]. Plusieurs études ont montré que la PPAD pouvait s'autocitrulliner et donc être probablement capable de citrulliner les résidus arginine internes[445]. Toutefois, ces données sont remises en questions par des résultats récents montrant que la PPAD purifiée à partir de surnageants de culture de *PG* n'est pas autocitrullinée, et que cette notion d'autocitrullination pourrait provenir d'un artefact des enzymes de clonage[446]. Cette citrullination bactérienne des protéines pourrait représenter un facteur important dans la physiopathologie de la PR.

4.2.2 Rupture de tolérance dans la PR

4.2.2.1 Rôle de la citrullination des protéines

La citrullination correspond à la modification post-traductionnelle des résidus arginine d'une protéine en citrulline (Fig.40). Cette conversion réduit la charge globale d'une protéine par la perte d'une charge positive. Cette réaction est catalysée par une famille d'enzymes, les peptidylarginine déiminases endogènes (PAD), dont l'activation dépend de la présence d'ions Ca2+.

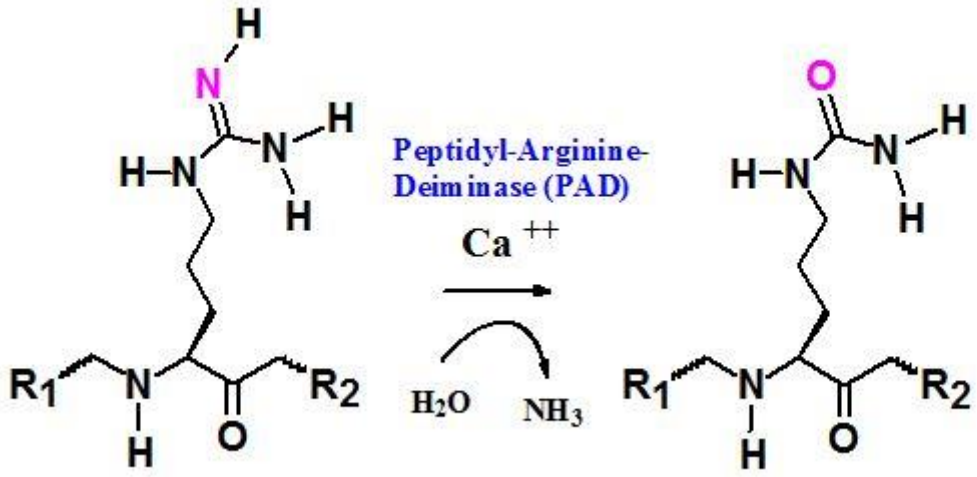


Figure 40: Action moléculaire de citrullination par la PAD[447].

L'arginine présente au sein des polypeptides est un acide aminé primordial pour l'intégrité structurelle d'une protéine. La citrullination modifie la structure tridimensionnelle de la protéine ainsi que sa fonction et sa demi-vie. Cette modification structurelle entraîne alors la possibilité de nouvelles interactions ou l'apparition de nouveaux épitopes différents de ceux que le soi tolère[448].

La citrullination des protéines est un phénomène physiologique. En effet, 5 isoformes de PAD ont été identifiées chez l'homme, avec une différence d'expression selon les tissus et par conséquent une fonction variable selon la localisation d'expression. Ainsi, la PAD1 est principalement exprimée dans l'épiderme et l'utérus. Au niveau de la différenciation terminale des kératinocytes, la modification de plusieurs protéines permet alors de créer une matrice résistante aux agressions[449]. La PAD 2 est retrouvée dans le muscle, le tissu nerveux central et certaines cellules hématopoïétiques. Cette enzyme citrulline les protéines de la myéline, essentiel pour la stabilité de la gaine de myéline et la plasticité du système nerveux central des nouveaux nés[450]. Certaines données obtenues en utilisant des lignées cellulaires de macrophages suggèrent que la PAD 2 interagit avec l'inhibiteur de la kinase IKKγ, supprimant l'activité du NFkB après stimulation par du LPS. Cela indique l'implication de la PAD 2 dans la défense immunitaire innée[451]. Toujours dans cette réponse immunitaire innée, les chimiokines citrullinées se sont révélées moins puissantes que les variants contenant de l'arginine, freinant l'extravasation des neutrophiles pendant l'inflammation aigue ou

chronique[452]. La PAD 3 est localisée dans les follicules pileux alors que la PAD 4, anciennement PAD 5, a été identifiée dans les polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, la rate et les glandes sécrétoires. La PAD 4 participe à la régulation des gènes, en augmentant notamment le suppresseur de tumeur p53 et donc agissant sur la tumérogénèse[453]. Des études ont montré une importance des PAD dans les processus apoptotiques[454]. Un des mécanismes de défense des neutrophiles est le piégeage et la destruction des bactéries grâce à la formation de structures chromatiniennes décondensées appelées NETs. La citrullination des histones catalysée par la PAD 4 est essentielle dans ce processus[455]. Enfin l'expression de la PAD 6 a été retrouvée au niveau des ovaires, des tissus testiculaires, l'intestin grêle, la rate, les poumons, le foie, les muscles squelettiques et les embryons de stade précoce. Son rôle physiologique est encore mal identifié[448].

Même si la citrullination des protéines a un rôle important dans le fonctionnement normal de multiples systèmes physiologiques, des anomalies de cette citrullination ont été rapportées dans plusieurs pathologies, notamment au niveau quantitatif. Ainsi, une diminution de la déamination de la kératine 1 a été observée dans le psoriasis. A l'inverse, une hypercitrullination des protéines de la myéline est rapportée dans la sclérose en plaques. Cet excès de citrullination pourrait être lié à une augmentation de l'expression des PAD 2 et PAD 4 ou à une hypométhylation du promoteur de PAD 2[449].L'augmentation des PAD 2 et PAD 4 a aussi été observée dans la synoviale de patients PR, avec une expression corrélée à l'intensité de l'inflammation[451].

4.2.2.2 Sources de citrullination dans la PR

Tabac

Plusieurs études épidémiologiques ont démontré que le tabagisme représentait un facteur de risque environnemental majeur dans les formes de PR positives en anticorps anti-CCP, notamment chez les patients portant une ou 2 copies de l'épitope SE. Dans une étude cas-témoins incluant des patients PR précoce, un antécédent de tabagisme était associé avec l'apparition des anti-CCP de manière dose-dépendante[456]. Des taux plus élevés d'anti-CCP sont retrouvés chez les patients PR exposés au tabac[457]. Les protéines citrullinées sont présentes en plus grande quantité dans le liquide broncho-alvéolaire des sujets sains tabagiques par rapport aux non-fumeurs, de même que la PAD 2 est surexprimée chez les fumeurs[458,459]. Le tabagisme pourrait donc renforcer la citrullination des protéines, mais le mécanisme sous-jacent nécessite encore d'être clarifié. De plus, une étude récente a retrouvé des preuves de citrullination de la vimentine, un auto-antigène majeur de la PR, dans le tissu pulmonaire de fumeurs et de non-fumeurs, avec une augmentation chez les patients présentant une bronchopathie chronique obstructive (BPCO). Cette augmentation semble plus liée à la BPCO qu'au tabagisme à proprement parlé, impliquant alors plutôt le facteur inflammatoire pulmonaire de la BPCO comme lien entre tabagisme et PR[460].

Infection

L'expression constitutive de peptides citrullinés indique que la citrullination endogène n'est probablement pas suffisante pour induire une rupture de tolérance du système immunitaire[460].

Les taux d'anticorps anti-*PG* sont plus élevés chez les patients PR et leur famille, avec une association entre cette immunisation et la présence des anticorps anti-peptides citrullinés, qui sont hautement spécifiques de la PR[461]. La citrullination possible par *PG* pourrait donc être importante dans l'étiologie de la PR. En effet, la PPAD, qui n'est pas génétiquement relié aux PAD eucaryotes, diffère des PAD humaines sur plusieurs plans : l'absence de nécessité d'ions Ca^{2+} au cours de la catalyse, l'homologie de séquence qui est limitée aux résidus clés du site actif conservés entre les différents membres de la superfamille des enzymes modifiant les guanidines, la capacité de citrulliner les résidus libres de L-Arginine et la préférence pour les substrats contenant une arginine C-terminal fournie par une enzyme supplémentaire de *PG* qui est la Arg-X gingipain[445]. Ainsi, les PADs de l'hôte utilisent les arginines situées au sein des chaînes polypeptidiques (endodéiminases) à l'inverse de la PPAD qui ne citrulline que les arginines C-terminal (exodéiminase). La PPAD est donc complémentaire de la PAD endogène et crée de nouveaux épitopes exogènes pour la réponse immunitaire, épitopes qui ont été associés à la progression de la PR[462]. Des taux sériques élevés d'anticorps anti-PPAD IgG ont été retrouvés chez des patients PR par rapport au groupe non PR[463], sans que ces anticorps soient associés à la sévérité de la maladie[446]. Ces taux d'anticorps anti-PPAD sont par contre plus bas chez les patients PR présentant une parodontopathie, suggérant un rôle protecteur potentiel de ces anticorps dans cette pathologie[446]. L'association des anticorps anti-PAD et les anticorps dirigés contre les peptides citrullinés est controversée à l'heure actuelle.

4.2.2.3 Rupture de tolérance du système immunitaire (Fig.41)

Les peptides citrullinés au niveau C-terminal générés par la PPAD peuvent être reconnus comme étranger par les lymphocytes T puisqu'ils ne sont pas produits par les PADs endogènes[445], et engendrer la production d'anticorps dirigés contre ces peptides.

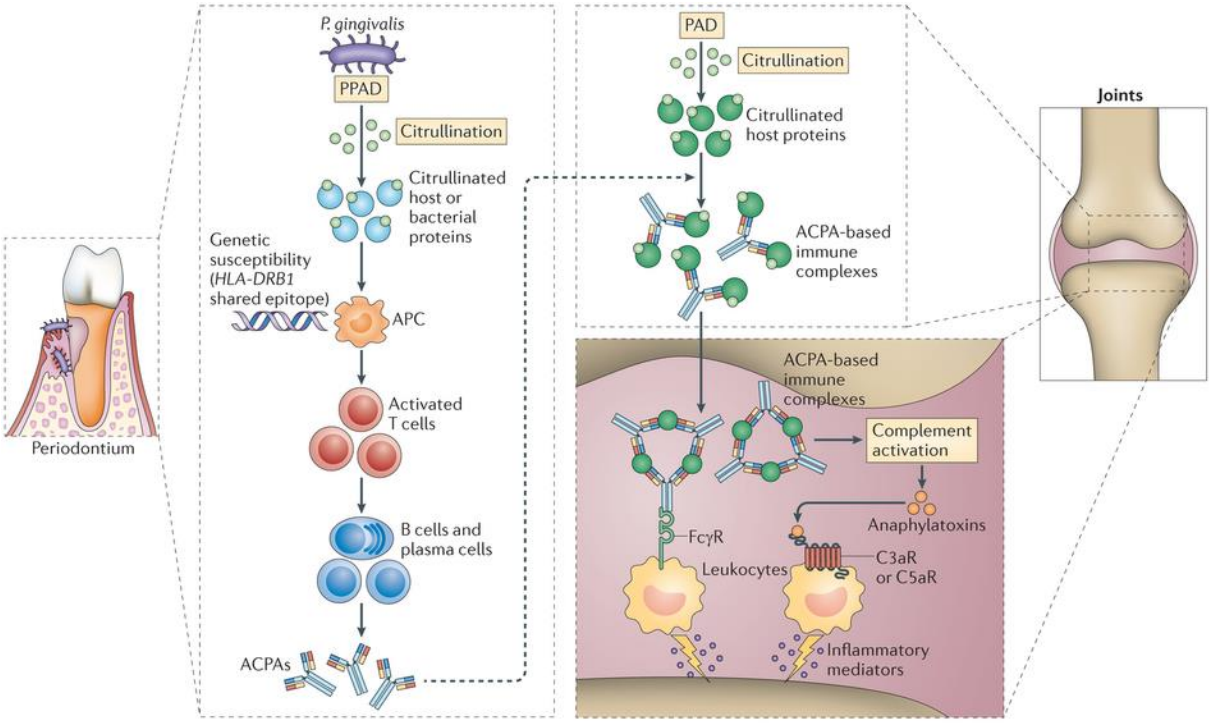


Figure 41: Mécanisme possible de rupture de tolérance dans la PR[464].

Anticorps anti-peptides citrullinés

Les ACPA ou anti-CCP sont des abréviations couramment utilisées pour se référer aux anticorps dirigés contre les protéines citrullinées qui sont mesurés grâce à de nombreux tests de laboratoire. Les ACPA peuvent réagir avec une variété de protéines citrullinées, comme la vimentine, le fibrinogène, l'énolase α, la fillagrine et le collagène de type II[465]. La plupart des tests actuels utilisent des peptides citrullinés cycliques comme cible antigénique, ce qui peut engendrer un faible pourcentage de résultats faussement négatifs[466]. Ces anticorps ont une très bonne spécificité et sensibilité pour le diagnostic de RA, de 96.7% et 87.8% respectivement[467]. Cette haute spécificité a conduit à l'incorporation de ce paramètre dans les critères de classification ACR 2010, classification qui peut être utilisée pour les stades précoces de PR[468]. Une positivité des ACPA prédit une maladie plus sévère, définie par une plus grande destruction osseuse et cartilagineuse[469]. Une augmentation de la mortalité est également rapportée en cas d'association avec les facteurs rhumatoïdes. Néanmoins, le taux d'anticorps en lui-même, chez les patients positifs, n'est pas corrélé à un excès de mortalité[470]. Chez les patients atteints d'arthrite indifférenciée précoce, la présence d'ACPA est un puissant facteur prédictif d'évolution vers une PR franche[471]. De plus, les ACPA sont retrouvés dans le sang jusqu'à 10 ans avant le début de la PR, à un moment où la synovite et la citrullination des protéines synoviales ne sont pas évidentes[472]. En stade pré-PR, les ACPA présentent déjà une diminution des motifs de galactosylation qui est retrouvée au niveau des IgG totales de patients présentant une PR active. Cette modification de la galactosylation des ACPA apparaît environ 3 mois avant le diagnostic et est parallèle à l'augmentation de l'inflammation systémique[473].

Mécanisme d'action potentiel de rupture de tolérance

La citrullination des protéines génère des peptides du soi altérés qui peuvent se lier et être présentés grâce au HLA-DRB1*1001 (DR1001) qui est un allèle de l'épitope partagé associé à la PR. Uniquement la présentation des peptides citrullinés engendre une activation des lymphocytes T CD4+[474]. Des lymphocytes B sont alors activés localement par les lymphocytes T CD4+, se transforment en plasmocytes pour produire des ACPA et participer au mécanisme lésionnel de la PR[341]. D'ailleurs, une immunothérapie dirigée contre les lymphocytes B s'est montrée efficace chez des patients PR ACPA+[475]. En effet, des complexes immuns à C1q sont observés dans le plasma de patients PR présentant également des ACPA, avec un tiers de ces complexes immuns qui contiennent du fibrinogène citrulliné. Des marquages immunohistochimiques ont montré une co-localisation du fibrinogène, de la fraction C3 du complément et des immunoglobulines dans le pannus synovial de patients PR. Ces résultats suggèrent que les complexes immuns contenant le fibrinogène se déposent ou se forment dans le tissu synovial, activent la cascade du complément, et participe alors à l'inflammation articulaire[476]. Ces ACPA peuvent aussi interagir avec le système immunitaire via le récepteur Fcγ exprimé sur les cellules immunitaires pour activer la réponse inflammatoire[477].

Bien que les ACPA contribuent à l'inflammation articulaire par la formation de complexes immuns et l'activation des récepteurs Fc, ils peuvent aussi agir plus directement par leur

fixation aux cibles citrullinés. Par exemple, les ACPA qui se lient à la vimentine citrullinée à la surface des ostéoclastes les activent et induisent alors une résorption osseuse[478] (Fig.42). Ce mécanisme pourrait éventuellement expliquer la perte osseuse observée chez les sujets positifs pour les ACPA mais ne présentant pas encore les signes cliniques de la PR[479].

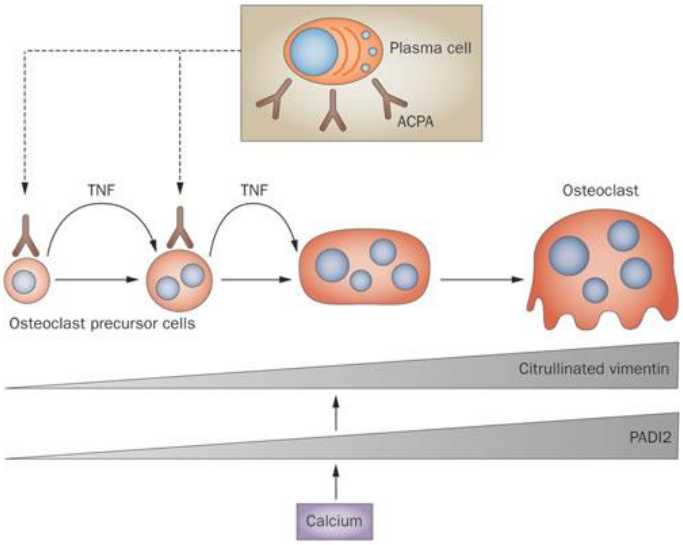


Figure 42: Action des ACPA sur le développement des ostéoclastes. PADI2 : petidyl-arginine deiminase type 2[480]

Les ACPA affectent aussi le phénomène de NETose des neutrophiles, processus augmenté dans la PR et pouvant être à l'origine d'un cycle d'activation de la réponse inflammatoire. En effet, les sérums de patients contenant de hauts taux d'ACPA ou de facteurs rhumatoïdes augmentent la NETose, de même que certaines cytokines pro-inflammatoires telles l'IL-17 ou le TNF. En retour, la NETose augmente significativement la réponse inflammatoire des fibroblastes de la synoviale des patients PR et les neutrophiles, durant ce processus de NETose, externalisent les autoantigènes citrullinés impliqués dans la PR[481].

En parallèle, l'hypothèse de mimétisme moléculaire entre protéines du soi et bactériennes ne peut pas être exclue dans le mécanisme de rupture de tolérance immunitaire. En effet, des anticorps dirigés contre un épitope immunodominant, le peptide α-enolase 1 citrulliné (CEP-1), ont été observés chez 37 à 62% des sérums de patients PR. Ce peptide présente une homologie de séquence de 82% avec l'énolase de *PG*. Les anticorps anti-CEP-1 réagissent à la fois avec l'énolase humaine et bactérienne[482]. De plus, l'α-énolase citrullinée a été retrouvée dans le liquide synovial de patients PR[449]. Ces données suggèrent un rôle potentiel du mimétisme moléculaire dans la physiopathologie de la PR.

Présentation du projet de recherche

Le développement des anticorps monoclonaux anti-TNF a permis d'élargir l'arsenal thérapeutique pouvant être proposé aux patients souffrant de maladies inflammatoires systémiques sévères. Leur utilisation a grandement amélioré l'évolution de ces pathologies, permettant l'obtention d'une rémission clinique plus longue, associée à une diminution des complications nécessitant une chirurgie ou une hospitalisation. Cependant, les essais cliniques réalisés dans l'optique de prouver l'efficacité et la tolérance de ces traitements ont montré qu'un certain nombre de patients ne répondait pas lors de l'induction thérapeutique ou présentait une perte de réponse clinique secondaire. Devant les risques inhérents au blocage du TNF ainsi que le cout de ces biothérapies issues du génie génétique, il serait préférable de pouvoir sélectionner les patients ayant une forte probabilité de réponse clinique. L'instauration d'une médecine personnalisée est à terme l'objectif pour tous les patients afin d'améliorer la performance des soins, éviter les traitements inutiles et améliorer leur qualité de vie. La découverte et la validation de nouveaux biomarqueurs sont intrinsèquement liées au développement de cette médecine personnalisée.

Mon travail de thèse a consisté dans l'étude de la pertinence de biomarqueurs sérologiques prédictifs de la perte de réponse aux anti-TNF. Parmi les 5 anti-TNF disponibles, l'infliximab et l'adalimumab sont les 2 molécules ayant été développées en premier et dont la prescription est répandue dans les 3 pathologies étudiées. L'évaluation des biomarqueurs se fera ainsi principalement chez des patients bénéficiant d'un de ces traitements. Les potentiels marqueurs biologiques de réponse clinique aux anti-TNF peuvent être multiples, génétiques ou protéiques, dosés dans le sang ou dans d'autres milieux biologiques. Le choix s'est porté sur des marqueurs sériques protéiques, les différents facteurs génétiques déjà mis en évidence n'ayant pas prouvé leur intérêt à ce jour.

La présentation de mon travail de thèse va se faire en deux parties distinctes.

Partie 1 : Le rôle de l'apparition d'une immunogénicité anti-médicament dans la perte de réponse aux anti-TNF est à l'heure actuelle bien reconnue. Les mécanismes d'action commencent à être élucidés. Afin de pouvoir utiliser ce marqueur biologique en pratique courante, il fallait confirmer son intérêt clinique et établir des seuils nécessaires à l'interprétation des résultats biologiques. Les maladies auto-immunes pouvant être traitées par les anti-TNF ont des caractéristiques cliniques et physiopathologiques bien différentes. Il est donc nécessaire d'établir des études spécifiques pour chaque cohorte de patients (MC, RCH et PR). Le choix de la technique employée est aussi primordial pour obtenir une sensibilité et une spécificité satisfaisant les exigences relatives à la prise en charge thérapeutique des patients. Certaines techniques permettant la recherche d'anticorps sont difficiles à mettre en place par des contraintes de réalisation du dosage. Les techniques de radioimmunoassay utilisant la radioactivité ou la chromatographie en phase liquide nécessitent un équipement particulier. De plus, les normes actuelles de qualité imposées au laboratoire de biologie

médicale conditionnent également le choix d'une technique qui sera réalisée en routine, sous respect bien évidemment d'une performance analytique prouvée. Ainsi, la concentration en anti-TNF et en anticorps anti-médicament a été dosée dans ma thèse suivant une technique ELISA, avec un kit commercialisé par la société Theradiag. En plus de la corrélation clinique de ces dosages, il nous a paru indispensable de vérifier sur le plan fonctionnel la concordance des taux retrouvés en ELISA. Pour cela, j'ai mis au point un test cellulaire basé sur une lignée cellulaire HEK-DUAL conçue pour la détection du TNF. Cette étude relative à l'immunogénicité des anti-TNF a permis la publication de 2 revues, 5 articles et 1 qui est en cours de soumission.

Partie 2 : J'ai ensuite souhaité explorer si une cause bactérienne potentielle pouvait influencer l'efficacité des anti-TNF puisque ces agents infectieux ont prouvé leur rôle dans la physiopathologie des maladies auto-immunes étudiées. La détection directe des agents pathogènes est possible par culture ou par utilisation de technique de biologie moléculaire. Néanmoins, le diagnostic direct peut être rendu difficile dans le cadre des MICI puisque les familles et espèces de bactéries contenues dans la flore intestinale sont multiples et de type anaérobie. De même pour PG, son identification nécessiterait un prélèvement spécifique des poches gingivales, ce qui n'est pas fait en pratique courante. Le diagnostic indirect de la présence de ces agents infectieux paraît donc plus approprié et se réalise grâce à la recherche d'anticorps anti-bactériens dans le sérum des patients. Dans les MICI, plusieurs anticorps anti-microbiens ont déjà été décrits et des méthodes de dosage spécifiques sont commercialisées. Dans la PR, l'accent a été mis sur la présence de PG, dont le rôle dans le déclenchement de la PR, bien que controversé à l'heure actuelle, a fait l'objet de nombreuses études. L'ELISA nécessaire à cette évaluation des anticorps IgG anti-PG reflétant une immunisation a dû être mise au point à l'aide de la fraction LPS ainsi qu'à l'aide d'un extrait bactérien.
Outre le versant clinique d'évaluation de biomarqueurs sériques dans la réponse thérapeutique aux anti-TNF, l'impact spécifique de PG dans la PR nous a paru intéressant à préciser *in vitro* et *in vivo* dans un modèle animal. Ces approches différentes ont pour but de clarifier 2 mécanismes d'action potentiel de PG dans la PR : l'action directe de PG sur des cellules d'intérêt par ses facteurs de virulence et son action plus indirect par sa capacité à induire la production des anti-CCP en citrullinant les protéines bactériennes et de l'hôte.

- La première approche *in vitro* consiste à analyser au niveau cellulaire les modifications d'expression génique à grande échelle engendrées par l'infection spécifique à PG. PG étant un germe retrouvé au niveau du parodonte mais dont l'ADN a été décrit dans le liquide synovial de patients PR, il nous a paru judicieux d'explorer les conséquences de cette infection au niveau des cellules gingivales, synoviales et des PBMCs. L'analyse transcriptomique peut alors être réalisée sur puces ADN Illumina en collaboration avec la plateforme ProfileXpert. Pour cette étude j'ai obtenu un financement hospitalier de type AOL ainsi que l'accord du CPP et de l'ANSM pour réaliser ce travail qui est en cours.
- La seconde approche *in vivo* correspond à la mise en place d'un modèle animal mimant l'hypothèse de la rupture de tolérance immunitaire secondaire au pouvoir de citrullination de PG. Les rats Lewis ont été sélectionnés pour ce modèle en raison de

leur capacité à développer une arthrite et des anticorps anti-CCP. La première étape a consisté à induire une parodontopathie à PG chez le rat en collaboration avec le Dr Vincent Blasco-Baqué (Toulouse). Le développement de l'arthrite a ensuite été suivi pendant plusieurs mois.

Cette étude a fait l'objet d'une revue, de 3 articles dont 2 en révision.

Ce travail est réalisé en partenariat avec le laboratoire de biologie intégrative du tissu osseux (LBTO) du Dr Vico pour son expertise dans les modèles animaux d'arthrite, la plateforme ProfileXpert spécialisée dans la génomique et la microgénomique à haut débit, le Dr Vincent Blasco-Baqué pour son expérience dans les modèles murins de parodontopathie, le laboratoire de bactériologie du Pr Pozzetto impliqué dans la détection d'agents pathogènes et le GIMAP (Groupe Immunité Muqueuse et Agents Pathogènes).

Partie 1 : Rôle de l'immunogénicité des anti-TNF dans la perte de réponse au traitement

L'immunogénicité est un risque associé à l'administration de toutes les molécules génétiquement modifiées. L'injection répétée de biothérapie plus ou moins humanisée peut générer des anticorps anti-médicaments (ADAs) qui peuvent être reponsables d'effets secondaires et de la perte de réponse au traitement. En effet, 25.3% des patients sous infliximab développent des ADAs, 14.1% dans le cas de l'adalimumab, 6.9% pour le certolizumab 3.8% pour le golimumab et enfin 1.2% pour l'étanercept. La présence de ces ADAs est alors associée à une réduction du taux de réponse clinique de l'ordre de 67% de manière générale. Dans la PR et la spondylarthrite ankylosante, les ADAs baissent la réponse thérapeutique de 27% et 18% respectivement, cette diminution étant tout de même statistiquement significative. Ces ADAs sont également responsable d'une augmentation de l'incidence des réactions à la perfusion ou au site d'injection[483].

Les ADAs peuvent avoir des cibles antigéniques différentes au niveau des antagonistes du TNF (Fig.43). Les anticorps anti-idiotypes sont dirigés contre des déterminants situés au niveau des régions hypervariables de la molécule, localisées au sein des fragments F(ab')2, qui lui confèrent sa spécificité antigénique. Toutes les molécules d'anti-TNF peuvent développer ce type d'anticorps. De même, des anticorps anti-allotypiques sont décrits et reconnaissent des différences dans les immunoglobulines dues à des allèles multiples de chaque gène C dans la population (polymorphisme génétique). Ils reconnaitront les immunoglobulines d'un isotype particulier seulement parmi certains individus d'une espèce[484]. Enfin, la présence résiduelle de régions murines, dans l'infliximab et le certolizumab, peut engendrer la synthèse d'anticorps anti-souris.

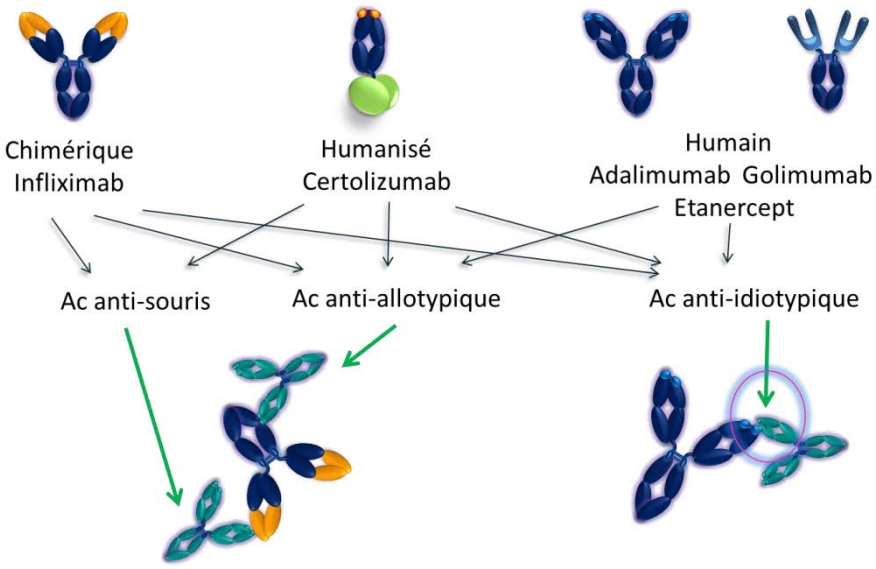


Figure 43: Cible des anticors anti-médicaments. ***Ac : anticorps***

La taille des complexes immuns formés par l'anti-TNF couplé aux ADAs peut être différente, reflétant la formation de dimères ou de tétramères. Les complexes immuns de taille importante sont rapidement éliminés par le foie alors que la clairance est plus faible pour les petits complexes immuns, permettant leur persistance dans la circulation sanguine pendant un temps plus prolongé. Le type de complexe immun conditionne ainsi la demi-vie du traitement et donc son efficacité thérapeutique[163].

Le développement des ADAs pourrait correspondre au facteur principal de perte de réponse aux anti-TNF dans les MICI, puisque la formation d'ADAs neutralisants accélère la clairance du traitement qui entraîne une concentration subthérapeutique en anti-TNF et à terme un échec thérapeutique. Cependant, une revue systématique de la littérature en 2009 ne montrait pas une évidence flagrante du rôle de ces ADAs dans la réponse clinique et de l'intêret à les monitorer en pratique clinique. Mais les variations importantes dans la méthodologie de détections de ces ADAs rendaient l'interprétation difficile à partir des différentes études[485].

En effet, plusieurs techniques ont été développées à ce jour pour doser les taux d'ADAs ; les principales étant représentées par l'ELISA, l' « homogeneous mobility shift assay » (HMSA), les tests cellulaires et le dosage radio-immunologique (RIA) (Fig.44).

L'ELISA est le test le plus couramment utilisé pour la recherche d'ADAs, avec 2 variations principales que sont l'ELISA sandwich et le « bridging » ELISA. Dans l'ELISA sandwich, les ADAs sont détectés dans le sérum des patients par leur capacité à se lier aux fragments Fab ou Fab2 du médicament anti-TNF immobilisés sur une plaque en plastique. Ce test est accessible et facile à utiliser. Cependant, il existe un risque de résultats faux positifs en cas de procédure de lavage insuffisant. Le « bridging » ELISA utilise des plaques coatées avec de l'anti-TNF (infliximab par exemple). Ce test est sensible et facile à mettre en œuvre également. Plusieurs inconvénients sont attachés à cet ELISA. En effet, il y a un risque de résultats faussement positifs qui peuvent provenir, par exemple, d'une cross-réaction avec le fragment Fc des facteurs rhumatoïdes, des anticorps anti-allotypiques et des anticorps de faible affinité, notamment les anticorps hétérophiles pouvant être présents dans le sérum des patients. Cette technique ne permet pas non plus la détection des ADAs de type IgG4, isotype qui domine après une immunisation prolongée. Les IgG4 monovalents pouvant être fonctionnels, ils ne peuvent pas former le pont nécessaire à leur détection par ce test. Un autre problème rencontré par ces ELISAs est l'interférence du taux de médicament dans la détéction des ADAs, responsable de faux négatifs. Ainsi, si l'anti-TNF est détéctable dans le sérum des patients, certains auteurs rendent le résultat des ADAs indéterminé[161]. Enfin, toutes les techniques en phase solide sont sensibles à la formation de néoépitope puisque les protéines thérapeutiques comme les anti-TNF, peuvent s'agréger sur les surfaces en plastique[486].

La technique HMSA utilise la chomatographie liquide à haute performance d'exclusion stérique (HPLC-SE) pour déterminer les taux sériques d'ADAs. Le HMSA a été développé en Amérique du Nord afin de remplacer l'ELISA. Cette méthode est basée sur l'incubation des échantillons sériques des patients avec de l'infliximab marqué par l'Alexa 488 afin d'émettre une fluorescence. Après incubation, les complexes immuns nouvellement formés présentent une masse moléculaire plus élevée que l'infliximab marqué seul et peuvent donc être séparés

et quantifiés par HPLC-SE selon la surface des pics[487]. L'avantage de cette technique est sa grande sensibilité, puisqu'elle permet aussi la détection de toutes les sous-classes d'IgG et des anticorps de faible affinité, pour une concentration très faible de l'ordre de 0.011 µg/ml. De plus, l'incorporation d'une étape acide pour dissocier les complexes IFX-ADAs naturellement présents dans le sérum des patients améliore considérablement la tolérance du test vis-à-vis de la présence de médicament. Elle permet alors une détection précise des ADAs en présence de taux sériques élevés d'anti-TNF jusqu'à 60 pg/ml[487]. Néanmoins, cette grande sensibilité s'accompagne également de la détection d'anticorps non neutralisants ou fonctionnellement inactifs.

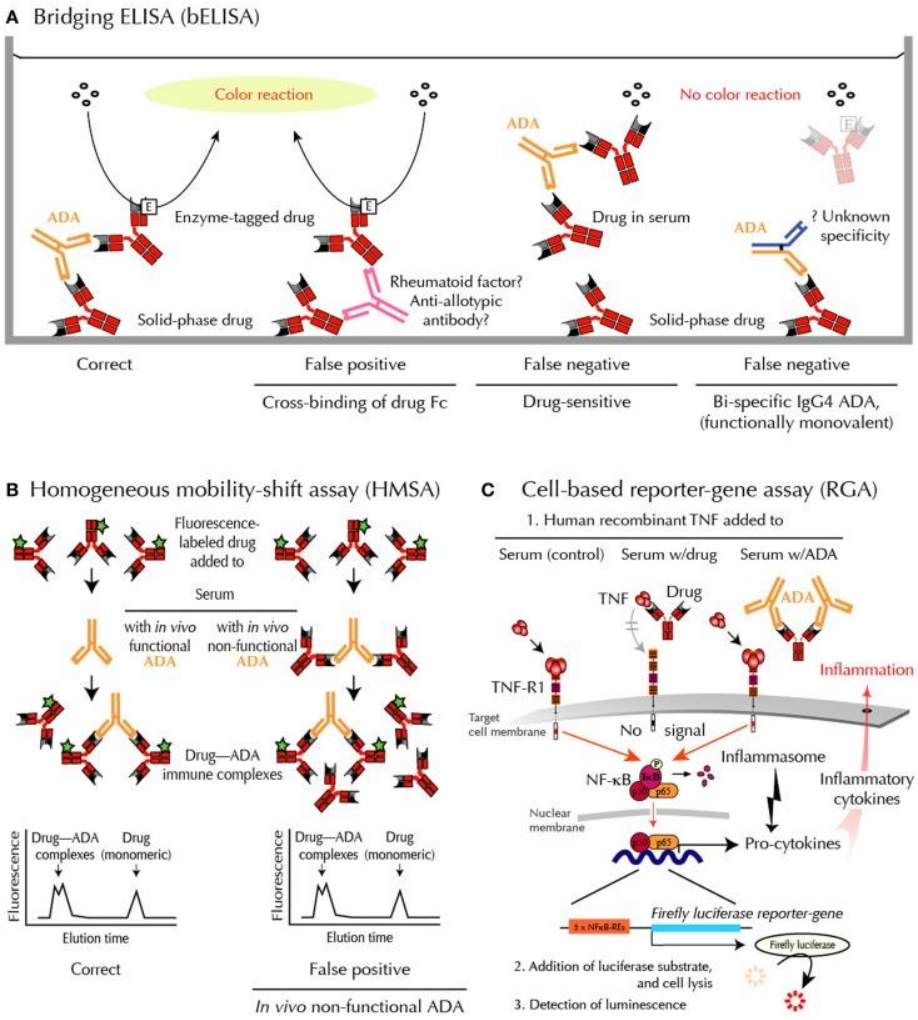


Figure 44: Représentation des techniques ELISA, HMSA, et cellulaires pour la détéction des ADAs et leurs inconvénients[161].

La technique RIA, utilisant un isotope radioactif comme marqueur, est considérée comme plus robuste en contexte clinique avec de plus faible taux de faux positifs ou de faux négatifs. Le dosage des ADAs est réalisé par l'incubation du sérum de patients avec de l'infliximab marqué à l'iode 125 (^{125}I). Comme l'infliximab est un anticorps IgG ne contenant que des chaines légères κ, un anticorps anti-chaîne λ peut permettre la distinction entre la forme libre d'^{125}I-Infliximab et sa forme complexées. En effet, l'anti-chaîne λ se lie aux ADAs et permet alors de faire précipiter les complexes ^{125}I-Infliximab et ADAs. L'activité radioactif du culot

est alors mesurée et la concentration en ADAs exprimée en unité arbitraire par ml[200]. Par contre, cette technique, très sensible, ne permet pas de décrire la fonctionnalité de ces anticorps anti-médicament. Elle présente de surcroît des inconvénients techniques (équipements, traitement des déchets radioactifs) limitant son utilisation dans la majorité des laboratoires de biologie médicale.

Afin de déterminer la fonctionalité des ADAs, des tests cellulaires ont été développés pour donner une évaluation fonctionnelle du médicament biologiquement actif neutralisé par les ADAs, mais seulement si ces ADAs ont une affinité suffisante envers un épitope de l'anti-TNF qui interfère à terme sur les voies de signalisation médiée par le TNF. Pour cela, une lignée cellulaire particulière doit être employée, permettant la détection spécifique du TNF. Par exemple, la lignée HEK-Dual TNF (Invivogen) provient d'une cellule embryonnaire humaine de rein à laquelle 2 gènes ont été ajoutés par transfection d'un plasmide codant pour 2 gènes rapporteurs qui sont sous le contrôle du promoteur de transcription NF-κB. Le TNF, en interagissant avec un de ses récepteurs, va activer le facteur de transcription NF-κB et permettre la sécrétion de luciférase et d'une phosphatase alcaline (SEAP) par activation des gènes rapporteurs. Les protéines ainsi produites pourront être détectées et quantifiées dans le surnageant des cultures cellulaires. Une autre caractéristique de cette lignée HEK-Dual TNF est son incapacité à répondre à l'IL-1β, cytokine aboutissant aussi normalement à l'activation du NF-κB, en raison d'une mutation dans la voie de signalisation de l'IL-1β. Cette lignée est donc spécifique du TNF[488]. Une autre lignée, la K562, permet en plus une normalisation des taux de luciférase induite par le TNF par rapport à l'expression de la renilla luciférase dont le gène raporteur est sous le contrôle d'un promoteur constitutif de ces mêmes cellules[489]. Cette normalisation par rapport à un étalon interne permet de s'affranchir de l'effet matrice, en compensant les effets non-spécifiques du sérum sur la transcrition ou la traduction. De plus, elle permet d'éviter les variations liées au nombre ou à la différence de viabilité des cellules, résultats en des coefficients de variations de répétabilité et de reproductibilité de moins de 10%[161,489]. Bien que ces tests fonctionnels soient moins sensibles pour la détection d'ADAs, ils se rapprocheraient des conditions physiologiques d'action des anti-TNF *in vivo*.

Dans ce projet de thèse, nous avons voulu confirmer l'intérêt d'un test ELISA commercial de dosage d'anti-TNF et d'ADAs (Theradiag) par des études prospectives, et de corréler les taux à leur bioactivité grâce à un test fonctionnel utilisant la lignée HEK-Dual TNF (Invivogen).

Les premières études ont porté sur des patients atteints de MICI dont la prise en charge a nécessité une mise sous anti-TNF. Les études se sont concentrées sur l'évaluation de l'infliximab, de l'adalimumab et de leurs anticorps anti-médicaments respectifs au cours du suivi prospectif de ces patients. Le but a été de corréler les taux d'anti-TNF et d'ADAs avec l'évolution clinique de ces patients pour définir des seuils prédictifs d'échappement thérapeutique et ainsi permettre l'élaboration d'algorythmes décisionnels.

La deuxième évaluation s'est réalisée sur une cohorte de patients PR traités par anti-TNF en association avec un autre traitement de fond de la PR (DMARDs) pendant 1 an. Le but a été d'étudier la cinétique d'apparition des ADA et l'impact du méthotrexate sur le taux d'infliximab et des anticorps anti-infliximab.

Résultats 1 : Immunogénicité et réponse clinique chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)

Introduction

L'objectif thérapeutique classique au cours des MICI, que ce soit la MC ou la RCH, est le contrôle des symptômes. Avec l'arrivée des biothérapies, ces dix dernières années ont vu l'émergence du concept de la cicatrisation muqueuse qui apparaît désormais comme le nouvel objectif à atteindre.

D'un point de vue physiopathologique, la cicatrisation muqueuse peut être définie comme la suppression des processus inflammatoires et le rétablissement de la barrière intestinale. En pratique, la cicatrisation muqueuse est essentiellement basée sur l'aspect macroscopique de la muqueuse à l'endoscopie. Il n'existe pas de standardisation concernant cette évaluation qui peut être l'objet de variations interindividuelles, et de seuils consensuels permettant d'affirmer la guérison muqueuse dans la MC ou la RCH. Toutefois, plusieurs scores endoscopiques d'activité de la maladie existent pour ces 2 maladies et peuvent être utilisés. Ainsi, pour la MC, les scores les plus fréquemment employés sont le « Crohn's disease endoscopic index severity » (CDEIS) ou le « simplified endoscopic score for Crohn disease » (SES-CD)[490]. Le CDEIS est un score assez compexe et détaillé qui prend en compte pour chacun des 5 segments visualisés (iélon, côlon droit, côlon transverse, côlon gauche et rectum) l'existence d'ulcérations superficielles et/ou creusantes qui sont cotées 0, 6, 12 points et la surface des lésions et des ulcérations sur chacun des segments qui est mesurée par une échelle visuelle analogique et cotée entre 0 et 10. Le score total est ensuite divisé par le nombre de segments explorés. Enfin, l'existence d'une ou plusieurs sténoses, qu'elles soient ulcérées ou non, est ajoutée afin d'obtenir le score total qui est compris entre 0 et 44 points. Le GETAID a proposé des valeurs seuils définissant la rémission endoscopique (CDEIS < 6), la rémission complète endoscopique (CDEIS < 4) et la réponse endoscopique par la baisse du CDEIS > 5 points[491]. A l'instar du CDEIS, le SES-CD, dit simplifié, prend en compte la taille des ulcérations, la surface ulcérée, la surface lésée et la présence de sténose. En revanche, l'existence d'ulcérations profondes n'est pas retenue dans le SES-CD. Les 2 scores sont bien sûr bien corrélés entre eux. Dans la RCH, plusieurs scores endoscopiques ont été développés sans qu'aucun n'ait été validé. La plupart prennent en compte les lésions élémentaires suivantes : mauvaise visualisation de la trame vasculaire, aspect granité de la muqueuse, muqueuse friable, saignement provoqué ou spontané, présence d'érosions et d'ulcères. Le score le plus utilisé à l'heure actuelle est le sous-score endoscopique du score de Mayo qui est gradé d'intensité croissante de 0 (muqueuse normale) à 3 (anomalies sévère, saignements spontanés, ulcérations). La cicatrisation muqueuse est définie dans les essais cliniques par un sous-score endoscopique 0 ou 1. Une limite de ce score réside dans sa grande variabilité liée à l'observateur, en particulier pour les stades 1 et 2. Une autre limite majeure du sous-score endoscopique Mayo est constituée par l'absence de prise en compte des signes endoscopiques de gravité de la RCH que sont les ulcérations profondes mettant à nu la musculeuse, les décollements muqueux et le sulcérations muqueuses en puits. Un nouveau score d'activité de la RCH, le « Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity » (UCEIS) est en cours de validation. Il prend en compte les 3 items les plus reproductibles que sont l'aspect de la trame

vasculaire, l'existence d'un saignement et d'érosion ou d'ulcération, en intégrant les ulcérations creusantes dans le score totale. La notion de friabilité, dont la reproductibilité est médiocre a donc été exclue de l'UCEIS[491].

L'intérêt croissant pour la cicatrisation muqueuse est secondaire aux études montrant l'amélioration du pronostic quand les patients atteignent cette rémission endoscopique, avec une réduction du risque de colectomie et d'hospitalisation[490]. Néanmoins, ces scores ne sont réalisables que par endoscopie et des techniques moins invasives sont nécessaires afin de limiter le recours à l'endoscopie. La caprotectine est une protéine de liaison au calcium et au zinc présente dans les granules des polynucléaires neutrophiles, mais qui est aussi synthétisée par les monocytes et les macrophages. La concentration fécale de la calprotectine est le reflet du degré d'infiltration inflammatoire de la muqueuse intestinale. La calprotectine fécale corrèle avec les scores endoscopiques et histologiques d'activité de la MC pour les formes coliques et iléocoliques, mais non pour les présentations iléales[492]. Cette corrélation est également retrouvée pour la RCH[493]. Une méta-analyse en 2012 a montré la capacité de la calprotectine fécale à prédire la rechute clinique dans les MICI, avec une sensibité et une spécificité de 78% et 73% respectivement, avec des taux similaires entre la MC et la RCH[494]. L'utilisation de la calprotectine fécale comme biomarqueur indirect de la cicatrisation muqueuse a été introduit dans les essais cliniques, avec un seuil recommandé de 250µg/g de selles pour prédire un CDEIS ≤ 3 avec 94% de sensibilité et 62% de spécificité dans la MC. La normalisation des taux des marqueurs fécaux a été aussi corrélée à la réponse endoscopique après optimisation thérapeutique chez 19 patients MC, alors que ces marqueurs restaient anormaux chez une majorité de patients non-répondeurs[495]. De plus, même chez des patients MICI présentant un score endoscopique très faible indiquant une cicatrisation muqueuse, un taux bas de calprotectine était associé à une rémission stable à 15 mois à l'inverse des patients ayant un taux plus élevés[496].

Dans ce travail, nous avons donc choisi d'évaluer la cicatrisation muqueuse par un dosage de calprotectine fécale pour les patients MC et par le score endoscopique de Mayo pour la RCH. Cette évaluation s'est faite en parallèle des dosages d'anti-TNF et d'ADAS, ainsi que de la mesure des scores cliniques « Crohn's Disease Activity Index » (CDAI) pour la MC et « Simple Clinical Colitis Activity Index » (SCCAI) pour la RCH qui sont réalisés en pratique clinique courante. L'ensemble de ces résultats a fait l'objet de 5 publications.

Articles

Inflammatory Bowel Diseases

Inflammatory Bowel Diseases

Therapeutic drug monitoring of infliximab and mucosal healing in inflammatory bowel disease: a prospective study

Journal:	*Inflammatory Bowel Disease*
Manuscript ID:	IBD-13-0184
Wiley - Manuscript type:	Original Research Articles - Clinical
Date Submitted by the Author:	17-Mar-2013
Complete List of Authors:	Paul, Stephane deltedesco, emilie; Gastroenterology marotte, hubert rinaudo, melanie moreau, amelie Phelip, Jean-Marc genin, christian; Gastroenterology Peyrin-Biroulet, Laurent ROBLIN, Xavier; Hôpital Nord, Department of Gastroenterology
Keywords:	Biomarkers < Clinical Areas, Biologic Therapies < Clinical Areas, Crohn's Disease: General Clinical < Clinical Areas, Pharmacology < Clinical Areas, Ulcerative Colitis: General Clinical < Clinical Areas

SCHOLARONE™
Manuscripts

John Wiley & Sons

Therapeutic drug monitoring of infliximab and mucosal healing in inflammatory bowel disease: a prospective study

Short title: Therapeutic drug monitoring of infliximab in IBD

10 Paul S[1], Del Tedesco E[2], MarotteH[3], Rinaudo-Gaujous M[1], Moreau A[1], Phelip JM[2], Genin C[1], Peyrin-Biroulet L[4] and Roblin X[2].

(1) Laboratoire d'Immunologie et d'Immunomonitoring, CHU de Saint-Etienne (France), (2) Service de Gastrologie-Entérologie-Hépatologie, CHU de Saint-Etienne (France), (3) Service de Rhumatologie, CHU de Saint-Etienne (France), (4) Service de gastroenterologie CHU Nancy.

Corresponding author: Dr.Roblin Xavier
Department of Gastroenterology,
CHU de Saint-Etienne
42023 Saint-Etienne (France)
E-mail: xavier.roblin@chu-st-etienne.fr

Abbreviations: Crohn's disease: CD; Ulcerative colitis: UC; Inflammatory bowel disease: IBD; MH: Mucosal Healing; infliximab: IFX; Antibodies to infliximab: ATI; anti-drug antibodies: ADA; Tumor necrosis factor: TNFα, Anti-Tumor Necrosis Factor (TNF): anti-TNF; Positive Predictive Value: PPV; Negative Predictive Value: NPV; Sensibility: Ss; Specificity: Sp.

Abstract

Background & Aims

Data on the value of therapeutic drug monitoring of infliximab (IFX) to predict mucosal healing (MH) in inflammatory bowel diseases (IBD) are scarce.

Methods

All consecutive IBD patients receiving ongoing IFX 5 mg/kg treatment and developing secondary failure to IFX were enrolled in a prospective study between June 2010 and May 2011. IFX trough levels, antibodies to IFX concentrations (ATI), CRP levels, and fecal calprotectin were measured before infliximab optimization and at week 8. A proctosigmoidoscopy was performed the day of first IFX optimization and at week 8 in all ulcerative colitis (UC) patients. MH was defined by fecal calprotectin < 250 µ g/g stools in Crohn's disease (CD) and by an endoscopic mayo score 0 or 1 in UC.

Results

We have included 52 IBD patients: 34 CD (mean CDAI: 300; mean CRP: 28+/- 10 mg/L; mean fecal calprotectin: 705+/-300 µg/g) and 18 UC patients (mean SCCAI: 7; mean MAYO endoscopic score: 3). Following IFX dose intensification, half of CD and UC patients achieved MH. Increase in infliximab trough levels (called "delta IFX", µg/mL) was associated with MH in both CD and UC (p=0.001). A "delta IFX" > 0.5µg/mL was associated with MH (sensitivity (se): 0.88, specificity (sp): 0.77; p=0.0001, AUROC: 0.89). On multivariate analysis, the only factor associated with MH after IFX optimization was a delta IFX > 0.5 µ g/mL (LikeliHood Ratio (LHR), =2.02, 95% CI,: 1.01-4.08; p=0.048) in IBD patients.

Conclusions

Therapeutic drug monitoring of IFX strongly predicts the likelihood of achieving mucosal healing following IFX dose intensification in both CD and UC.

Key words: Crohn's disease, ulcerative colitis, IFX trough levels, ATI, HACA, optimization, clinical response, mucosa healing.

Introduction

Anti-Tumor Necrosis Factor (TNF) agents (e.g., infliximab and adalimumab) have changed the way patients with inflammatory bowel disease (IBD) are treated. However, only one third of patients with IBD who are administered infliximab or adalimumab will be in clinical remission at one year [1]. In addition, secondary loss of response is relatively frequent with all anti-TNF agents [2, 3]. As our therapeutic armamentarium is still limited in patients with IBD refractory to standard medications, it is highly desirable to optimize both initial response and long term continuation of TNF antagonists [4]. One of the most well characterized factors associated with loss of response to these agents is the development of immunogenicity, whereby the production of neutralizing anti-drug antibodies (ADAs) accelerates drug clearance leading to subtherapeutic drug concentrations and, finally, to treatment failure [1,3,4].

In 2009, a systematic review concluded that there is no clear evidence that ATIs have an impact on efficacy nor a need to measure or prevent them in clinical practice and that circulating drug concentration may be a more relevant measure of immunogenicity[5]. Overall, data are scarce and conflicting in IBD, but most available data come from retrospective studies 6. Post-hoc analyses from placebo-controlled trials with TNF antagonists and some recent studies havesuggested that the pharmacokinetic/pharmacodynamics (PK/PD) relationship is correlated with clinical efficacy [7, 8]. Over the past years, mucosal healing has emerged as a major therapeutic goal in clinical trials in IBD. Accumulating evidence indicates that mucosal healing may change the natural course of the disease by decreasing the need for surgery and reducing hospitalization rates in both ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) [9]. The relationships between PK/PD data and mucosal healing are unknown in IBD.

We therefore conducted first a cross sectional and observational study to research a cut-off of trough residual level of infliximab associated with clinical remission and ATI levels associated with loss of response to IFX. In a second part, in a prospective and interventional study, we explored the clinical utility of therapeutic drug monitoring of infliximab and notably these isolated cut offs in predicting clinical remission and mucosal healing rates following infliximab dose intensification for flare-up in IBD patients.

Materials and Methods

Study population

Cohort 1 (N=103)

All consecutive IBD patients receiving scheduled IFX treatment at Saint-Etienne University Hospital were enrolled in a prospective observational study between June 2010 and May 2011. All IBD patients were treated with a scheduled IFX strategy (IFX infusion every 8 weeks at 5mg/kg) and presented a primary response to IFX defined by a clinical remission after induction treatment.

A total of 103 IBD patients were included in this prospective study. Standard operating procedures for infusions of IFX are used in our IBD unit. The infusion unit was staffed by the same nurses since several years and direct medical supervision was always available. Similarly to all patients treated in the Saint-Etienne IBD unit, all patients received a routine prophylactic pre-medication by intravenous corticosteroids (hydrocortisone 200mg) before IFX treatment.

All adult patients with an established diagnosis of CD or UC for at least 3 months were eligible for inclusion in the study (study 2012-007 CIC EC, accepted DGRI minister).
Exclusion criteria were: Patient refusal to enter the study, exclusive active perianal CD, IFX maintenance regimen at a dose above 5 mg/kg, and primary non-responders to IFX therapy.

Research of toxin of *Clostridium difficile* was negative in all included patients and all UC patients were also negative for CMV by PCR on inflamed tissues at time of inclusion as routinely done in our center.
At every IFX infusion, the Crohn's Disease Activity Index (CDAI) for CD patients [10-12] and the Simple Clinical Colitis Activity Index (SCCAI) for UC patients [13] were calculated.

Definitions:
Loss of response to IFX was defined as an active disease after primary response to at least the first four IFX infusions as judged by the physician. Active disease was defined by a CDAI score>220 associated with a CRP concentration>10 mg/L and fecal calprotectin level > 450 µ g /g stools for CD patients, and by a SCCAI ≥3 associated with an endoscopic Mayo score above 1 for UC and indeterminate colitis patients [14]. A clinical remission was defined by a CDAI < 150 for CD patients and by a SCCAI < 3for both UC and indeterminate colitis patients [15].

COHORT 2(n=52):

Between November 2010 and May 2011, 52 IBD patients requiring infliximab optimization for active disease with indirect (high fecal calprotectin level) or direct (endoscopic disease activity) signs of mucosal lesions (CDAI > 220 and calprotectin > 450 µg/g stools for CD, SCCAI > 3 and Mayo score endoscopic > 1 for UC) while receiving infliximab maintenance treatment with 5 mg/kg every 8 weeks for at least 6 months were prospectively followed. Of note, we included only CD patients with normal calprotectin level < 250 µg/g prior to study inclusion in order to reduce the number of patients with false positive results for fecal calprotectin. Only patients with stable concomitant medications during three months before infliximab optimization and who were primary responders to infliximab as judged by the physician were included in the analysis. Others exclusion criteria were: Patient refusal to enter the study (study 2012-007 CIC EC, accepted DGRI minister), exclusive active perianal CD, IFX maintenance regimen at a dose above 5 mg/kg, and primary non-responders to IFX therapy. Research of toxin of *Clostridium difficile* was negative in all included patients and all UC patients were also negative for CMV by PCR on inflamed tissues at time of inclusion as routinely done in our center.

All patients were optimized with IFX 10 mg/kg every 8 weeks. Clinical activity (CDAI dor CD, SCCAI for UC) and direct or indirect mucosal lesions (fecal calprotectin in CD and endoscopic mayo score) were reported for al included patients at W8.

A clinical remission was defined by a CDAI < 150 for CD patients and by a SCCAI < 3 for both UC and indeterminate colitis patients [15]. Mucosal healing (MH) was defined by fecal calprotectin < 250 µg/g stools in CD [16] and by an endoscopic mayo score 0 or 1 in UC. The endoscopist who performed the second sigmoidoscopic evaluation was blinded from the first result and the immunologic results.

Therapeutic drug monitoring of infliximab

Serum samples are routinely and systematically collected just before each IFX infusion for all IBD patients in our center blindly of clinical data and stored at -20°C.TNF, IFX and ATI concentrations were all measured using the Lisa-Tracker Premium Infliximab ELISA kit (BMD; France). This assay has been developed to reduce low affinity binding of immune complexes or interfering molecules such as the rheumatoid factor. The use of specific buffers for both binding and washing steps allows a very efficient capture of free molecules. IFX

trough levels were measured immediately before IFX infusion. Fecal calprotectin was measured in stools using the Quantum Blue Calprotectin assay (Buhlmann; Switzerland).

Statistical analysis

Continuous variables were expressed as mean and standard deviation and categorical variables were expressed as percentage. The χ^2 test and the Mann–Whitney test were used to compare categorical and quantitative variables. When considering trough levels of IFX and ATI, a receiver-operating characteristic (ROC) analysis was performed using clinical remission as a classification variable to calculate the sensitivity (Ss), specificity (Sp), likelihood ratio (LHR), and area under the ROC curve (AUROC) with the associated p value. In the intensification part, delta IFX was defined by IFX trough level after optimization minus IFX trough level before optimization. Ss, Sp, LHR, and AUROC were determined for clinical remission and mucosal healing. All reported p values were two-sided, and $p<0.05$ was considered statistically significant. A logistic regression analysis was performed to estimate Odds Ratio (OR) of mucosal healing and clinical remission. Statistical analysis was performed using IBM SPSS 20.0.0 (IBM, Somers, NY).

Results

Clinical remission rates according to therapeutic drug monitoring of infliximab (COHORT 1)

The baseline demographic and clinical characteristics of the 103 patients included between June and October 2010 in this cross-sectional study are reported in Table 1.

For CD (N=55), the mean age was 35.5 ± 12.2 years and sex ratio was 1. The mean disease duration was 7.5 ± 4.3 years and mean IFX therapy duration was 13.9 ± 8.4 months. Twenty patients (41%) were receiving concomitant thiopurine treatment. At study inclusion, 15 patients (28%) had active disease with a mean CDAI of 280 ± 35. The mean CRP level was 33 ± 33 mg/L. Eight patients (13%) had previous exposure to adalimumab.

For UC (N=48), the mean age was 42.4 ± 16.1 years, with a sex ratio M/F of 1.4. The mean disease duration was 8.4 ± 3.2 years and the mean duration of IFX therapy was 12.5 ± 9.5 months. Twenty-three patients (44%) were receiving concomitant thiopurine treatment.

Twenty-two patients (46%) had active luminal disease with a mean SCCAI of 8.2 ± 2.6. The mean CRP level was 25 ± 24 mg/L.

The mean IFX trough level was higher in CD patients in clinical remission (2.2 µg/mL vs. 0.8 µg/mL for patients with active disease; $p < 0.0001$) and in UC patients in clinical remission (1.9 vs. 0.9 µ g/mL; p=0.01) (Figure 1). A total of 34 (32.8%) IBD patients had detectable ATI when using a cut-off of 10 ng/mL (25.4% for CD and 41.5% for UC); this percentage increased to 65.3% when using a cut-off of 5 ng/mL (Supplementary Table 1).

ATI level was lower in IBD patients in clinical remission than in those with active disease (p=0.017; Supplementary Figure A). A cut-off of 200 ng/mL for ATI could discriminate responders to IFX from patients who lost response to IFX with a low sensitivity (22%) but a high specificity (93.5%; LHR=2.8; p=0.032; AUROC=0.61). Half of patients with detectable IFX trough levels had ATI levels above 10 ng/mL (62.5% for CD and 40% for UC; Supplementary Table 2).

Of note, TNFα concentration was not correlated with clinical activity in CD and UC patients (data not shown).

A threshold of 2 µg/mL for IFX trough level was strongly associated with the absence of clinical remission in both CD and UC patients (Ss=76%; Sp=82.3%; LHR=4.7; p=0.017; AUROC=0.68).

Rates of clinical remission were not influenced by concomitant use of immunomodulators (data not shown).

Impact of therapeutic drug monitoring of infliximab on clinical remission to dose intensification

(COHORT 2)

A total of 52 patients could be included (34 CD and 18 UC). The mean age was 34 years, with a sex ratio M/F of 0.8. About two-thirds of patients were receiving concomitant treatment with azathioprine. The characteristics of these 52 patients are summarized in Table 2.

Thirty IBD patients (58%) were in clinical remission eight weeks after IFX therapy optimization. IFX trough level before optimization was lower in IBD patients who responded to IFX optimization (1.4 vs. 2.9 µg/mL for those who did not respond to IFX optimization; p=0.62). Mean ATI levels did not differ between responders and non-responders to IFX dose

intensification (15 ng/mL for both groups). Mean ATI levels were higher in patients with IFX trough levels < 2µ g/mL than in those with IFX trough levels > 2µ g/mL before IFX optimization (48 ng/mL vs. 11ng/mL; p=0.91).

Only 12 out of 30 patients who responded to IFX optimization had detectable ATI levels before dose intensification (Supplementary Table 3).

Among the 33 IBD patients with an IFX trough level < 2 µg/mL before dose intensification, 26 out of 33 patients had ATI levels <200; 25 out of 26 (96%) patients achieved clinical remission at week 8 (Figure 2A).

ATI levels were undetectable in 20 patients and > 10 ng/mL but < 200 ng/mL in 25 patients. All 7 IBD patients with ATI levels > 200 ng/mL and IFX trough levels < 2 µg/mL did not respond to IFX optimization.

Among the 19 IBD patients with an IFX trough level > 2 µg/mL before dose intensification, only 6 patients (26.6%) were in clinical remission at week 8 (Figure 2A). Eleven out of 12 patients with IFX trough levels > 2 µ g/mL and ATI levels > 10 ng/mL did not respond to IFX optimization and four out of 6 patients with IFX trough levels > 2 µg/mL did not respond to IFX optimization despite undetectable ATI levels. A trough level of IFX < 2µ g/mL associated with ATI < 200 ng/mL was strongly predictive of clinical remission for both CD and UC (Ss=0.85 and 0.7; Sp=0.87 and 1; PPV=0.89 and 1; NPV=0.89 and 0.72, respectively).

IFX trough levels were also measured after dose intensification. An increase in IFX trough (considered as a positive Delta IFX) was strongly associated with clinical remission rates after IFX optimization (p=0.0001), with similar results for CD and UC (Figure 2B). Type of IBD did not influence the results (data not shown).

Percentages of clinical remission increased in parallel with delta IFX: the rate of clinical remission was 7% in IBD patients with a % of delta IFX under 0; 25% of clinical remission if % of delta IFX between 0 and 50%, 78% of clinical remission if % of delta IFX between 50 and 100%, and 84% of MH for values of delta IFX > 100%. None of the patients with a delta IFX > 100 and who achieved clinical remission at week 8 (N=14) had IFX trough levels > 2 µ g/mL before IFX dose intensification (Figure 2C).

Impact of the percentage of increase in infliximab trough levels on mucosal healing rates (COHORT 2)

Twenty-six out of 52 IBD patients achieved mucosal healing8 weeks after IFX optimization. Mean IFX trough levels before optimization were comparable in IBD patients with and

without MH (2.6 vs. 3.2 µ g/mL; p=0.6), with similar results for CD and UC. Mean ATI levels before optimization did not differ between patients with MH after optimization and those who did not achieve MH (22 vs. 35 ng/mL; p=0.11).

An increase in IFX trough levels after dose intensification (considered as a positive "delta IFX") was strongly associated with MH in IBD patients (p< 0.0001). Similar results were obtained for CD (p=0.0003) and UC (p=0.0027) (Figure 3A).The analysis of quartiles of "delta IFX" showed a parallel increase between IFX trough levels and MH rates (Figure 3B).

The median "delta IFX" was higher in IBD patients who achieved MH than in those who did not achieve MH (2.2 µg/mL vs. 0.2 µ g/mL, respectively; p < 0.001), with similar results for CD (+2.5 vs. -0.01, p=0.0003) and UC (+2.65 vs. -0.9, p=0.027) (Figure 3A).

ROC curve analysis identified 0.5µg/mL as the optimal cut-off for delta IFX to predict MH for IBD patients (N=52) (Figure 4A). These results were broadly similar for UC patients (N=18) with Ss=70%, Sp=100%, PPV=100% and NPV=72% (Figure 4A) and for CD patients (N=34), with Ss=94%, Sp=76%, PPV=80% and NPV=92%.

Impact of therapeutic drug monitoring of infliximab on mucosal healing rates (COHORT 2)

Among the 33 IBD patients with an IFX trough level < 2 µ g/mL before dose intensification, 22 out of 26 patients with ATI levels < 200 ng/mL (69%) achieved MH at week 8. All 7 IBD patients with ATI levels > 200 ng/mL and IFX trough levels < 2 µg/mL did not respond to IFX optimization. Among the 19 IBD patients with an IFX trough level > 2 µ g/mL before dose intensification, only 4 patients (21%) achieved MH at week 8. Eleven out of 12 patients (n=12) with IFX trough levels > 2 µg/mL and ATI levels > 10 ng/mL did not respond to IFX optimization (Figure 4B). A threshold of trough levels of IFX < 2µ g/mL associated with ATI < 200 ng/mL was strongly predictive of MH for CD (p=0.004) and UC patients (p=0.015) (Ss=88 and 80%; Sp=76 and 87%; PPV=78 and 88%; NPV=86 and 77% respectively).

Percentages of mucosal healing increased in parallel with delta IFX: the rate of MH was 0% in IBD patients with a % delta IFX under 0; 40% of MH if % delta IFX between 0 and 50%, 85% of MH if % delta IFX between 50 and 100%, and 77% of MH for values of delta IFX> 100%. None of the patients with a delta IFX > 100 and who achieved MH at week 8 (N=11) had IFX trough levels > 2 before IFX dose intensification.

Only two out 19 patients with trough levels > 2µ g/mL before optimization had an increase of 50-100% for delta IFX, with no delta IFX > 100%. Conversely, 19 out 26 patients with trough levels < 2µ g/mL before optimization had an increase > 50% for delta IFX (Figure 4C).

Baseline factors associated with clinical remission and mucosal healing following IFX dose intensification

(COHORT 2)

In univariate analysis, three factors were associated with clinical remission after optimization: IFX < 2µ g/mL before optimisation (p=0.03), a delta IFX > 0.5µ g/mL (p=0.02) and IFX < 2µ g/mL with ATI < 200ng/mL (p=0.03). In our results, ulcerative colitis was not significantly associated with clinical remission in univariate analysis (p=0.085) but this factor was included in our logistic regression.

In multivariate analysis, two factors were independently associated with clinical remission after optimization: IFX < 2µ g/mL before optimisation (LHR: 10.3; 95% CI: 1.24-82.6; p=0.031) and a delta IFX > 0.5µ g/mL (LHR: 2.34; 95% CI: 1.03-5.2; p=0.044). The type of IBD was not associated with clinical remission (UC : LHR= 0.87; p=0.82) (Figure 5A).

In univariate analysis, three factors were associated with MH after optimization: IFX < 2µ g/mL before optimisation (p=0.04), a delta IFX > 0.5µ g/mL (p=0.02) and IFX < 2µ g/mL with ATI < 200 ng/mL (p=0.05). In our results, ulcerative was not significantly associated with mucosal healing in univariate analysis (p=0.09) but this factor was included in our logistic regression.

In multivariate analysis, only a delta IFX > 0.5 µg/mL after optimisation was independently associated with MH (LHR: 2.02, 95%CI; 1.01-4.06; p=0.048). There was a trend for an association between IFX < 2 µ g/mL before optimisation and MH (LHR: 5.28; 95%CI: 0.82-34.3; p=0.08). The type of IBD was not associated with MH (UC : LHR : 3.1; p=0.267) (Figure 5B).

Discussion

This is the first prospective study investigating the clinical utility of therapeutic drug monitoring of infliximab following dose intensification in both CD and UC to predict clinical remissionand MH.

In a first cohort of IBD patients, we first demonstrated that both UC and CD patients in clinical remission had significantly higher IFX trough levels than those with active disease, thus confirming previous reports [17-23]. The clinical utility of therapeutic drug monitoring of IFX outside an acute setting was poorly known in UC [22].

Recently, in CD patients, the best cut-off value for IFX trough level was 3 µg/mL with a PPV (Positive Predictive Value) and a NPV (Negative Predictive Value) of 85% and 45%, respectively [24]. In 135 UC patients, AUROC was 0.6 for a cut-off of 7.19 µg/mL with a specificity and a sensitivity of respectively 80% and 57% for sustained benefit of IFX treatment [25]. In a study enrolling 44 CD patients, the optimal IFX trough level was 5 µg/mL [26]. The discrepancy between these studies could be partly explained by differences in methods used to measure IFX trough levels. By using ROC analysis, we could identify 2µg/mL as a threshold to discriminate between clinical remission and active disease in IBD.

We also found that ATI levels were associated with loss of response to IFX. The ELISA assay used in our study was able to assess ATI levels independently from IFX trough concentrations. This may partly explain the discrepancy between our results and previous reports [17, 19-23, 27, 28]. Importantly, by using ROC analysis, we have identified a value of 200 ng/mL as a threshold to discriminate between clinical remission and active disease in IBD patients. However, despite a high specificity (93.5%; LHR=2.8; p=0.032; AUROC=0.61), the sensitivity was relatively low (22%).

In a second cohort of IBD patients, we prospectively evaluated the impact of therapeutic drug monitoring of IFX on response to dose intensification in IBD patients who lost response to IFX. All patients with ATI levels > 200 ng/mL did not respond to IFX optimization, whereas all patients with IFX trough levels < 2 µg/mL and ATI levels < 200 ng/mL responded to IFX dose intensification.

Two recent studies provided conflicting results [17, 20]. However, no definite conclusions could be drawn from these studies due to their retrospective study design and the lack of evaluation of clinical disease activity using validated tools such as CDAI. In addition, cut-off values were determined by the manufacturers and the authors could not analyse the clinical utility of evaluating ATI levels in combination with IFX trough levels. Finally, some patients had inconclusive tests due to the method used for therapeutic drug of infliximab in both studies [17, 20].

Furthermore, we evaluated the kinetics of trough levels of IFX and ATI before and after optimization. IFX trough levels only increased among patients who responded to IFX dose intensification. Importantly, none of the 7 patients with ATI levels > 200 ng/mL and undetectable IFX trough levels before IFX optimization had a detectable IFX trough level after IFX dose intensification, indicating that these are neutralizing antibodies. In line with our findings, a recent study found that the success of clinical adjustment was correlated with a significant increase in IFX trough levels ($p < 0.01$), whereas no increase in IFX trough levels was observed in patients with no clinical response [29].

Most authors recommend switching IFX treatment to another biological agent in patients with high ATI and low IFX trough levels [17, 30]. In our study, IFX dose intensification in association with azathioprine treatment initiation in patients not receiving concomitant immunomodulators at study inclusion resulted in a decrease of ATI levels and an increase in IFX trough levels, with half of patients achieving clinical remission at week 8.

In multivariate analysis, two factors were independently associated with clinical remission after IFX optimization: IFX < 2µg/mL before drug optimization (LHR: 10.3; 95% CI: 1.24-82.6; p=0.031) and a delta IFX > 0.5µg/mL (LHR: 2.33; 95% CI: 1.03-5.2; p=0.044).

Data on MH and therapeutic monitoring of IFX are scarce in IBD. An association between IFX trough levels and MH has been reported in a cohort of 210 CD patients [31, 28].

Recently, a correlation between trough levels of certolizumab (CZP) and MH has been also reported in a post-hoc analysis of the MUSIC trial [32]. In a cohort of 45 patients, higher CDEIS remission was observed in upper CZP plasma concentration quartiles [32].

By using a prospective study, we demonstrated that an increase in IFX trough levels after dose intensification (considered as a positive "delta IFX") was strongly associated with MH in IBD patients ($p < 0.0001$). Similar results were obtained for CD and UC. Interestingly, there was a parallel increase between IFX trough levels and MH rates by analysing of quartiles of "delta IFX". The median "delta IFX" was higher in IBD patients who achieved MH than in those who did not achieve MH (2.2 µg/mL vs. 0.2 µg/mL, respectively; $p < 0.001$). ROC curve analysis identified 0.5µg/mL as the optimal cut-off for delta IFX to predict MH in IBD.

Similarly to clinical remission, all 7 IBD patients with ATI levels > 200 ng/mL and IFX trough levels < 2 µg/mL did not respond to IFX optimization. Consistently, a threshold of trough levels of IFX < 2µg/mL associated with ATI < 200 ng/mL was strongly predictive of MH in both CD and UC. Only two out 19 patients with trough levels > 2µg/mL before optimization had an increase of 50-100% for delta IFX, with no delta IFX > 100%.

In multivariate analysis, only a delta IFX > 0.5 µg/mL after drug optimization was independently associated with MH (LHR: 2.02, 95%CI; 1.01-4.06; p=0.048). Recently, Vande Casteele et al [33] reported the same impact of delta IFX in clinical response after optimisation. A delta IFX was greater in patients with a successful IFX dose adjustement (+ 2.5microg/mL) compared with patients with an unsuccessful IFX dosa adjustement (Delta IFX=0.0 microg/mL; p<0.0001).

Recently, Afif *et al.* proposed a treatment algorithm to manage patients based on the results of therapeutic drug monitoring of IFX [17]. This algorithm appears still valid according to our results.

Based on our results, we propose here a modified treatment algorithm for these patients taking into account both ATI and IFX trough levels (Figure 5C). Due to small sample size, our results need to be confirmed in studies including a higher number of patients.

The main strengths of our study are its prospective study design and the systematic evaluation of clinical disease activity using CDAI for CD and SCCAI for UC. Only fecal calprotectin was used to assess MH in CD, but recent reports indicate that it is a reliable measure of endoscopic activity [16]. Endoscopy was performed in all UC patients to assess mucosal lesions as routinely done in our center. Importantly, by using a prospective study, we could identify optimal cut-offs for ATI and IFX trough levels. Furthermore, we evaluated the clinical utility of measuring ATI levels in combination with IFX though levels in IBD patients on IFX. Finally, even though CD and UC were analysed together due to the relatively small number of patients, we could demonstrate by subgroup analysis that IBD type did not influence our results.

In conclusion, our data suggest that the measurement of ATI and IFX trough levels may be helpful to predict clinical remission and MH in both CD and UC and that therapeutic drug monitoring of IFX may guide decisions in clinical practice in these patients.

Table 1: Baseline characteristics of the 103 patients

Crohn's Disease	N=55	**Ulcerative Colitis**	N=48
Age (years) (mean ± SD)	35.5 ± 12.2		42.2 ± 14.1
Sex ratio M/F	1		1.4
Phenotype		Phenotype	
A2 (N, %)	45 (82)	E1	2 (4%)
A3 (N, %)	10 (18)	E2	20 (42%)
L1 (N, %)	22 (39.5)	E3	26 (53%)
L2 (N, %)	8 (14.5)		
L3 (N, %)	25 (45.8)		
B1 (N, %)	28 (52)		
B2 (N, %)	18 (33.3)		
B3 (N, %)	9 (18.7)		
P (N, %)	12 (20.8)		
Disease duration (years)	7.5 ± 4.3		8.4 ± 3.2
IFX therapy duration (Months)	13.9 ± 8.4		12.5 ± 9.5
Previous adalimumab use (N, %)	8 (13%)		0
Clinical remission at enrollment (N, %)	40 (72%)		26 (54%)
Concomitant thiopurine treatment	20 (41%)		23 (44%)
Active smoking (%)	65%		10%
Clinical disease activity (CDAI)	280 ±35	Clinical disease activity (SCCAI)	8.2 ± 2.6
Mean CRP level (mg/L)	33 ± 33		25 ± 24
Mean fecal calprotectin level (µ g/g stool)	780 ± 250	Endoscopic Mayo score	E2 : 9 E3 : 6

Table 2: Characteristics of the 52 patients before infliximab optimization

Variable	
Crohn's disease : N=34	L1 : 15, L2 : 8, L3 : 11 B1 : 20, B2 : 12, B3 : 8
Ulcerative colitis : N=18	E2 : 7, E3 : 11
Mayo score	II (8), III (10)
Mean age ± SD (years)	34.6 ±4.8
Sex ratio (M/F)	0.8
Mean disease duration (years)	4.8 ± 1.6
Mean duration of IFX therapy (months)	12 ± 6
Concurrent IS	63 %
Clinical disease activity	CDAI: 300 ±60 (n=34) SCCAI: 7 ± 2 (n=18)
CRP (mg/L)	27.1 ± 13.2
Fecal calprotectin (µg/g)	705 ± 386

Supplementary Table 1: Presence of ATI in IBD patients according to predefined cut-offs (N=103)

	Total number of patients	ATI > 10 ng/mL % (N)	ATI > 5 ng/mL % (N)
CD	55	25.4% (14)	65% (36)
UC	48	41.5% (20)	66% (32)
IBD	103	32.8% (34)	65.3% (67)

Supplementary Table 2: Percentage of patients with detectable ATI (using cut-off at 10 or 5 ng/mL) and detectable IFX trough levels (>0.1 µg/mL)

	ATI > 10 ng/mL % (N)	ATI > 5 ng/mL % (N)
CD	62.5% (9/14)	85.4% (31/36)
UC	40.0% (8/20)	62.8% (20/32)
IBD	50% (17/34)	75% (51/68)

Supplementary Table 3: Clinical remission rates at week 8 according to IFX trough levels and ATI levels before dose intensification

Response to optimization (N)	ATI < 10ng/mL	ATI > 10 ng/mL and < 200 ng/mL	ATI ≥ 200 ng/mL
IFX < 2 µ g/mL (N=33)	14/14	11/12	0/7
IFX > 2 µ g/mL (N=19)	4/6	1/13	0/0

Figure legends

Figure 1: Comparison of residual IFX trough levels between IBD patients in clinical remission and those with active disease (eg. patients who lost response to IFX) (**Figure 1a**: $p < 0.0001$, N=103): results in CD patients (**Figure 1b**: $p < 0.0001$, N=55) and in UC patients (**Figure 1c**: p=0.0112, N=48).

Figure 2: **(A)** Histogram representing the percentage of clinical remission in patients with IFX < 2µg/mL, IFX < 2µg/mL + ATI < 200 ng/mL or IFX > 2 µg/mL before optimisation. **(B)** Comparison of delta IFX after optimisation between IBD patients, Crohn's Disease (CD) or Ulcerative Colitis (UC) in patients achieved or not clinical remission (CR). **(C)** Percent of delta IFX values for the obtention of Clinical Remission (CR).

Figure 3: **(A)** Comparison of delta IFX between IBD patients, Crohn's Disease (CD) or Ulcerative Colitis (UC) with Mucosal Healing. **(B)** Quartiles of delta IFX values for the obtention of Mucosal Healing (MH).

Figure 4: **(A)** ROC curves for delta IFX in IBD patients (Mucosal Healing vs. no Mucosal Healing (MH)). PPV, NPV, Ss, Sp are also indicated on the graph as the statistical parameters of the ROC curves. **(B)** Histogram representing the % of Mucosal Healing in patients with IFX < 2µ g/mL, IFX < 2µ g/mL + ATI < 200 ng/mL or IFX > 2 µ g/mL before optimisation **(C)** Percent of Delta IFX values for the obtention of mucosal healing.

Figure 5: (A) Identification of associated factors with clinical remission after optimisation by a multivariate analysis. **(B)** Identification of associated factors with Mucosal Healing after optimisation by a multivariate analysis. **(C)** Proposed treatment algorithm based on the results of therapeutic drug monitoring of IFX (*: IS (immunosuppressive therapy)).

Supplementary Figure 1: Comparison of mean levels of ATI (ng/mL) between IBD patients in clincal remission and those with active disease (eg. patients who lost response to IFX). (

Specific author contributions:

The whole study was conceived and designed by S.P, and X.R. Statistical analysis were performed by H.M. All authors (S.P., E.D.T., H.M., M.R., A.M., L.C., C.G., J.M.P., and X.R.) were involved in the interpretation of results and discussion. S.P., L.P.B. and X.R. have drafted the manuscript, which was critically revised by all the authors (S.P., E.D.T., H.M,, M.R., A.M., L.C., C.G., J.M.P., L.P.B. and X.R.). All authors also approved the final version of the manuscript.

Funding: none

Competing interests:
For S.P., E.D.T., H.M., M.R., A.M., L.C., C.G., J.M.P.: No conflict of interest.

L.P.B., lecture and consulting fees from Merck, X.R., lecture and consulting fees from Merck.

References

1. Hanauer SB. The expanding role of biologic therapy for IBD. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2010;7:63-4.
2. Chaparro M, Burgueno P, Iglesias E et al. Infliximab salvage therapy after failure of ciclosporin in corticosteroid-refractory ulcerative colitis: a multicentre study. Aliment Pharmacol Ther 2012;35:275-83.
3. Hanauer SB, Kornbluth AA, Messick J et al. Clinical scenarios in IBD: optimizing the use of conventional and biologic agents. Inflamm Bowel Dis 2010;16 Suppl 1:S1-11.
4. Ordas I, Mould DR, Feagan BG et al. Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. Clin Pharmacol Ther 2012;91:635-46.
5. Cassinotti A, Travis S. Incidence and clinical significance of immunogenicity to infliximab in Crohn's disease: a critical systematic review. Inflamm Bowel Dis 2009;15:1264-75.
6. Steenholdt C, Al-Khalaf M, Brynskov J et al. Clinical implications of variations in anti-infliximab antibody levels in patients with inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2012.
7. Chaparro M, Guerra I, Munoz-Linares P et al. Systematic review: antibodies and anti-TNF-alpha levels in inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther 2012.
8. Hanauer SB, Wagner CL, Bala M et al. Incidence and importance of antibody responses to infliximab after maintenance or episodic treatment in Crohn's disease. Clin Gastroenterol Hepatol 2004;2:542-53.
9. Peyrin-Biroulet L, Ferrante M, Magro F et al. Results from the 2nd Scientific Workshop of the ECCO. I: Impact of mucosal healing on the course of inflammatory bowel disease. J Crohns Colitis 2011;5:477-83.
10. Elliott PR, Lennard-Jones JE, Hathway N. Simple index of Crohn's disease activity. Lancet 1980;1:876.
11. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. Lancet 1980;1:514.
12. Harvey RF, Bradshaw MJ. Measuring Crohn's disease activity. Lancet 1980;1:1134-5.
13. Walmsley RS, Ayres RC, Pounder RE et al. A simple clinical colitis activity index. Gut 1998;43:29-32.
14. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. N Engl J Med 1987;317:1625-9.
15. Van Assche G, Dignass A, Panes J et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. J Crohns Colitis 2010;4:7-27.
16. D'Haens G, Ferrante M, Vermeire S et al. Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2012;18:2218-24.
17. Afif W, Loftus EV, Jr., Faubion WA et al. Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 2010;105:1133-9.
18. Dastrich P, Kozeluhova, J., Bortlik, M et al. Infliximab but not adalimumab serum trough level is a useful predictor of deep remission in patients with Crohn's disease. Gut 2011;60.

19. Maser EA, Villela R, Silverberg MS et al. Association of trough serum infliximab to clinical outcome after scheduled maintenance treatment for Crohn's disease. Clin Gastroenterol Hepatol 2006;4:1248-54.
20. Pariente B, Pineton de Chambrun G, Krzysiek R et al. Trough levels and antibodies to infliximab may not predict response to intensification of infliximab therapy in patients with inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2012;18:1199-206.
21. Rutgeerts P, Vermeire S, Van Assche G. Predicting the response to infliximab from trough serum levels. Gut 2010;59:7-8.
22. Seow CH, Newman A, Irwin SP et al. Trough serum infliximab: a predictive factor of clinical outcome for infliximab treatment in acute ulcerative colitis. Gut 2010;59:49-54.
23. Steenholdt C, Bendtzen K, Brynskov J et al. Cut-off levels and diagnostic accuracy of infliximab trough levels and anti-infliximab antibodies in Crohn's disease. Scand J Gastroenterol 2011;46:310-8.
24. Bortlik M, Duricova, D., Malickova, K. . Infliximab trough levels may predict sustained response ton infliximab in patients with Crohn's disease: a single cohort study. J. Crohn's & Colitis 2012;6:S153.
25. Arias MVC, N. Drobne D. Importance of trough levels and antibodies on the long-term efficacy of infliximab therapy in ulcerative colitis. J. Crohn's & Colitis 2012;6:S5.
26. Lamblin C, Aubourg A., Ternant D et al. Concentration-effect relationship of infliximab in Crohn's disease: results of a cohort study. J. Crohn's & Colitis 2012;6:S142.
27. Feagan B, Singh S, Lockton S. Novel infliximab and antibody to infliximab assays are predictive of disease activity in patients with crohn's disease. Gastroenterology 2012;5:505.
28. Van Moerkeroke W, Ackaert C., Compernolle G. High infliximab trough levels are associated with mucosal healing in Crohn's disease. Gastroenterology 2010;5:S60.
29. Vermeire S, Gabriels F, Ballet V. The effect of dose escalation on trough levels in patients who lost response to infliximab. Gut 2010;59:A81.
30. Chaparro M, Panes J, Garcia V et al. Long-term durability of infliximab treatment in Crohn's disease and efficacy of dose "escalation" in patients losing response. J Clin Gastroenterol 2011;45:113-8.
31. Moarerckercke V. Patients with mucosal healing had the highest trough levels followed by those with partial healing. Patients without healing had the lowest median trough levels. Digestive Disease Week DDW2010. New Orleans, 2010.
32. Hebuterne X, Lemann M, Bouhnik Y et al. Endoscopic improvement of mucosal lesions in patients with moderate to severe ileocolonic Crohn's disease following treatment with certolizumab pegol. Gut. 2013;62:201-8.2012.
33. Vande Casteele N, Gils A, Singh S et al. Antibody response to infliximab and its impact on pharmacokinetics can be transient. Am J Gastroenterol online publication

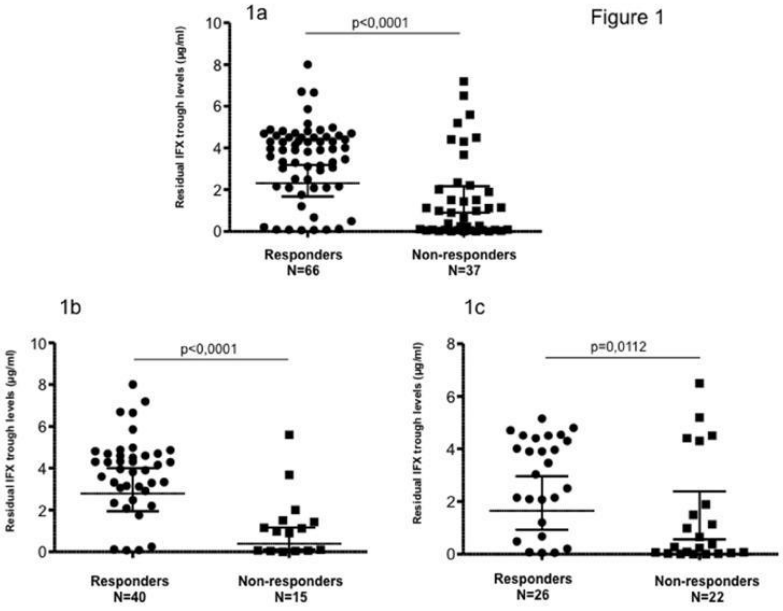


Figure 1

254x190mm (72 x 72 DPI)

Fig. 2A

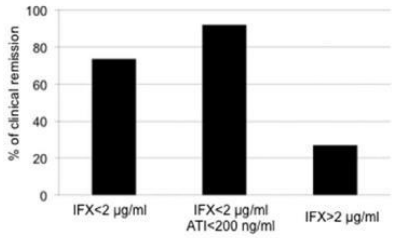


Fig. 2C

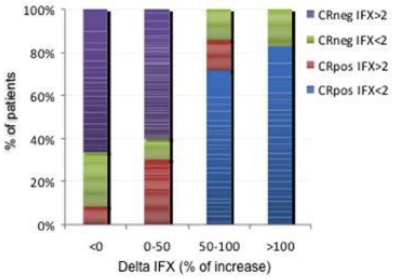
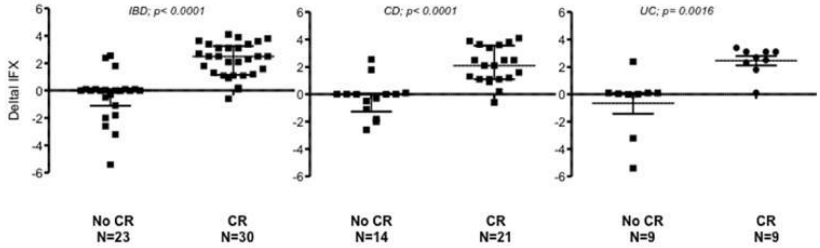


Fig. 2B



254x190mm (72 x 72 DPI)

Fig. 3A

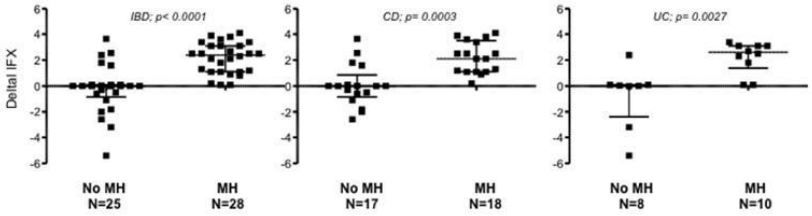
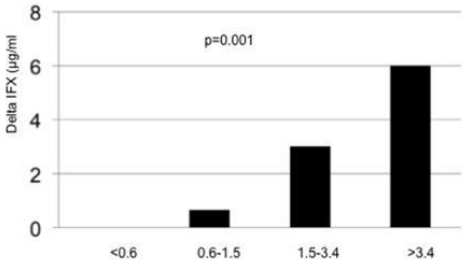
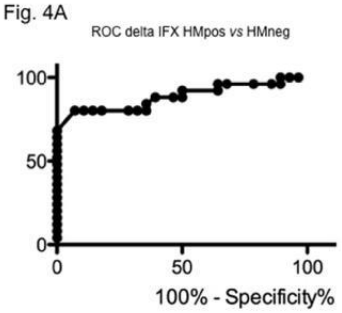


Fig. 3B



254x190mm (72 x 72 DPI)

Fig. 4A



Threshold IFX	SS	Sp	VPP	VPN	OR	CI95%
0.5	88.89	80	82.76	86.96	32.00	6.793 to 150.7
1	85.19	80	82.14	83.33	23.00	5.421 to 97.59
2	62.96	80	77.27	66.67	6.800	1.941 to 23.82

Area under the ROC curve	
Area	0,9123
Std. Error	0.04283
95% confidence interval	0.8283 to 0.9963
p value	< 0.0001

Fig. 4B

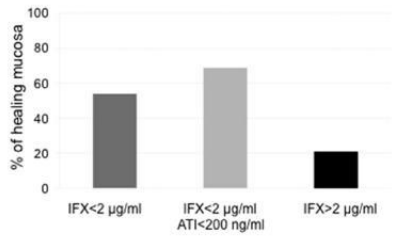
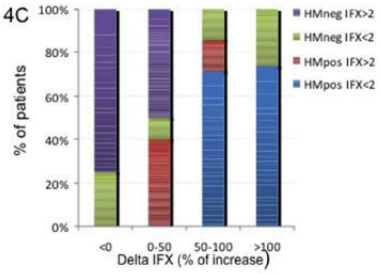


Fig. 4C



254x190mm (72 x 72 DPI)

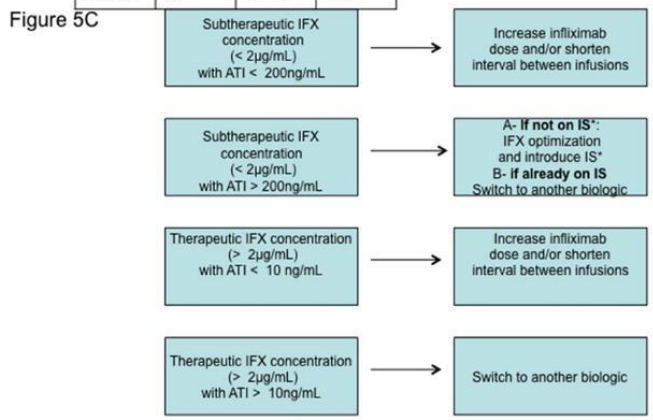
Figure 5A

Factors	LHR	95%CI	P
Delta IFX > 0,5	2,34	1,03-5,2	0,044
IFX < 2	10,3	1,24-82,6	0,031
UC	0,87	0,12-6,6	0,89
Sex F/M	1,2	0,6_2,5	0,61

Figure 5B

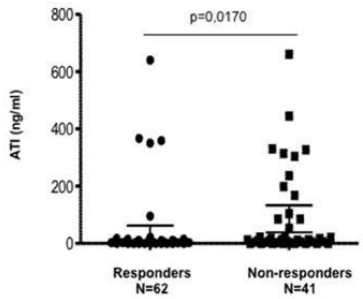
Factors	LHR	95% CI	p
Delta IFX > 0.5	2.02	1.01-4.06	0.048
IFX < 2	5.28	0.82-34.3	0.08
UC	3.1	0.41-23.6	0.267
Sex F/M	0.58	0.113-3.0	0.517

Figure 5C



254x190mm (72 x 72 DPI)

Suppl Fig 1A



254x190mm (72 x 72 DPI)

Clinical Gastroenterology and Hepatology 2014;12:80-84

Association Between Pharmacokinetics of Adalimumab and Mucosal Healing in Patients With Inflammatory Bowel Diseases

Xavier Roblin,[*] Hubert Marotte,[‡] Melanie Rinaudo,[§] Emilie Del Tedesco,[*] Amelie Moreau,[*] Jean Marc Phelip,[*] Christian Genin,[§] Laurent Peyrin–Biroulet,[‖] and Stephane Paul[*]

[*]Service de Gastrologie-Entérologie-Hépatologie, [‡]Service de Rhumatologie, [§]Laboratoire d'Immunologie et d'Immunomonitoring, University Hospital de Saint-Etienne; and [‖]Inserm U954 and Department of Gastroenterology, Nancy University Hospital, Henri Poincaré University, Nancy 1, France

BACKGROUND & AIMS: Little is known about the association between pharmacokinetic features of adalimumab and mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease (IBD).

METHODS: We conducted a cross-sectional study of 40 patients with Crohn's disease (CD) or ulcerative colitis (UC) who received adalimumab maintenance therapy and underwent endoscopic evaluation of disease activity and pharmacokinetic analysis (measurements of trough levels and antibodies against adalimumab). Patients in clinical remission were identified based on CD activity index scores less than 150 or Mayo scores less than 3 (for those with UC). Patients with mucosal healing were identified based on Mayo endoscopic scores less than 2 (for UC) or the disappearance of all ulcerations (for CD).

RESULTS: The median trough level of adalimumab was higher in patients in clinical remission (6.02 mg/mL) than in patients with active disease (3.2 mg/mL; P = 0.012). Trough levels of adalimumab were also higher in patients with mucosal healing (6.5 mg/mL) than in patients without (4.2 mg/mL; $P < .005$). These results did not vary with type of IBD. On multivariate analysis, trough levels of adalimumab (relative risk, 0.62; 95% confidence interval, 0.40–0.94; P = 0.026) and duration of adalimumab treatment (relative risk, 0.82; 95% confidence interval, 0.68–0.97; P = 0 .026) were associated independently with healing mucosa. An absence of mucosal healing was associated with trough levels of adalimumab less than 4.9 mg/mL (likelihood ratio, 4.3; sensitivity, 66%; specificity, 85%).

CONCLUSIONS: Trough levels of adalimumab are significantly higher in IBD patients who are in clinical remission and in those with mucosal healing. Detection of antibodies against adalimumab predicts a lack of mucosal healing.

Keywords: Anti-Adalimumab; Prognostic Factor; Response to Therapy; Outcome.

See related article, Feagin BG et al, on page 110 of *Gastroenterology*.

Adalimumab (ADA) is a fully human anti-tumor necrosis factor (TNF) that was Food and Drug Administration–approved for both Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC).[1,2] The impact of trough levels of ADA and the presence of antibodies against ADA (AAA) recently was investigated in patients with rheumatoid arthritis and psoriasis.[3,4] Among outpatients with rheumatoid arthritis in whom ADA was started more than 3 years ago, the development of antidrug antibodies was associated with lower ADA trough levels and a lower likelihood of minimal disease activity or clinical remission. In psoriasis patients, ADA trough levels were associated positively with clinical response and were significantly lower in patients with AAA.

Only one study has reported an association between ADA trough levels and clinical response in CD.[5] ADA trough levels were lower in patients who stopped ADA at week 24 than in those who continued anti-TNF treatment.[5] A retrospective study among 30 CD patients suggested that the presence of AAA was related to no response to ADA.[6] In the Ulcerative Colitis Long-term Remission and Maintenance With Adalimumab 2 trial,

Abbreviations used in this paper: AAA, antibodies against adalimumab; ADA, adalimumab; AUROC, area under the receiver-operating characteristic curve; CD, Crohn's disease; CDAI, Crohn's Disease Activity Index; CRP, C-reactive protein; IBD, inflammatory bowel disease; LHR, likelihood ratio; MH, mucosal healing; ROC, receiver-operating characteristic; TNF, tumor necrosis factor; UC, ulcerative colitis.

© 2014 by the AGA Institute
1542-3565/$36.00
http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2013.07.010

median through levels of ADA concentrations appeared to be higher in UC patients in clinical remission.[2]

Recently, mucosal healing (MH) has emerged as a major therapeutic goal in IBD. Some studies found an association between anti-TNF (infliximab and certolizumab) trough levels and MH in inflammatory bowel disease (IBD).[7–10] By contrast, the association between therapeutic drug monitoring of ADA and MH has never been investigated in IBD.

The aim of our cross-sectional study was therefore to investigate the impact of therapeutic drug monitoring of ADA on clinical remission and MH rates in both CD and UC.

Methods

Patients

We conducted a cross-sectional study including all patients with CD or UC receiving ADA maintenance therapy and undergoing routine endoscopy (evaluation of disease activity or screening for dysplasia). Evaluation of endoscopic disease activity (X.R. and E.D.T), and therapeutic drug monitoring of ADA between June 2011 and June 2012 were analyzed. This was a prospective observational study enrolling patients treated at Saint-Etienne University Hospital. The total Mayo score for UC and the Crohn's Disease Activity Index (CDAI) for CD are collected routinely and systematically at each clinical visit in our center.[11]

Endoscopies were performed by experienced endoscopists (X.R. or E.D.T.). Each endoscopy was performed within a maximum of 3 days before or after ADA injection. All endoscopists were blinded to clinical and biological data. Patient responders to ADA induction as judged by the physician were treated by maintenance strategy with ADA (every 2 weeks or every week). Clinical disease activity (CDAI for CD, Mayo score for UC) and C-reactive protein (CRP) level were measured the day of injection with ADA trough level measurement. All UC patients with proctitis were excluded from the analysis. All patients signed an informed consent form. Patients for whom the dose of immunomodulator was not stable for at least 3 months before endoscopy were excluded.

Clinical Score Definitions

For CD patients, clinical remission was defined by a CDAI less than 150 and, as previously described, MH was defined by the disappearance of all ulcerations on all ileocolonic segments visualized by the endoscopist.[12] For UC patients, clinical remission was defined as a total Mayo score less than 3 and MH was defined by an endoscopic Mayo score of 0 or 1.

Therapeutic Drug Monitoring of Adalimumab

Serum samples are routinely and systematically collected just before each ADA injection for all IBD patients in our center, blinded of clinical data, and stored at —20°C. TNF, ADA trough levels, and AAA concentrations were all measured using the Lisa-Tracker Premium Infliximab enzyme-linked immunosorbent assay kit (Theradiag, Marne la vallée, France). This assay has been developed to reduce low-affinity binding of immune complexes or interfering molecules such as the rheumatoid factor. The use of specific buffers for both binding and washing steps allows a very efficient capture of free molecules. ADA trough levels were measured immediately before ADA injection. Limits of detection were 0.1 mg/mL for ADA trough levels and 10 ng/mL for both TNF-a and AAA.

Statistical Analysis

Continuous variables were expressed as the mean and standard deviation and categoric variables were expressed as a percentage. The chi-square test and the Mann–Whitney test were used to compare categoric and quantitative variables. When considering trough levels of ADA and AAA, a receiver-operating characteristic (ROC) analysis was performed using clinical remission as a classification variable to calculate the sensitivity, specificity, likelihood ratio (LHR), and area under the ROC curve (AUROC) with the associated *P* value. Sensitivity, specificity, LHR, and AUROC were determined for clinical remission and MH. All reported *P* values were 2-sided, and a *P* value less than .05 was considered statistically significant. A logistic regression analysis was performed to estimate the odds ratio of MH and clinical remission. All variables with a *P* value less than .1 in the univariate analysis were included in the multivariate analysis. Statistical analysis was performed using IBM SPSS 20.0.0 (IBM, Somers, NY).

Results

A total of 40 IBD patients could be analyzed. Patient characteristics are reported in Table 1. The mean age of the patients was 42.7 years with a sex ratio (male:female) of 0.8. The mean ADA duration was 10.7 months and the median CRP level was 14 mg/mL (16 mg/mL (range, 7–18) for CD and 12 mg/mL (range, 3–20) for UC). A total of 22 patients had CD: 31% of them were in clinical remission (N ¼ 7) and 36% had MH (N ¼ 8). Eighteen patients had UC and 33% were in clinical remission (N ¼ 6), and 44% had MH (N ¼ 8). The median ADA trough level was 4.9 mg/mL (range, 1.6–6 mg/mL). Nine of the 40 patients had AAA up to 10 ng/mL (22.5%).

Impact of Therapeutic Drug Monitoring of Infliximab on Mucosal Healing

The characteristics of patients with and without MH are presented in Table 2. The median disease duration was shorter in the group with MH (3.0 vs 4.7 y in patients without MH, respectively; *P* ¼ .05). Patients were also younger (36 vs 47 years in patients without MH,

Table 1. Patient Characteristics

N	40
Mean age, *y* (SD)	42.7 (T13.5)
Sex ratio, male/female	0.8
CD, n	22
Phenotype	L1, 13; L2, 4; and L3, 5 B1, 15; B2, 4; and B3, 4
UC, n	18
Phenotype	E3, 14; E2, 4
Mean disease duration, *y* (SD)	4.2 (T2.8)
Immunosuppressive treatment, n (%)	5 (12.5)
Clinical remission, n (%)	13 (33)
MH, n (%)	16 (40)
CRP level, *mg/mL*	14 (3–45)
Mean ADA duration, *mo* (SD)	10.7 (T6.4)
Dose injections, n	(40 mg/14 d) ¼ 24; (40 mg/wk) ¼18
Median ADA trough levels, *mg/mL*	4.9 (1.6–6)
AAA > 10 ng/mL, n (%)	9 (22.5)

respectively; *P* ¼ .04). The median CRP level was significantly lower (2.1 vs 21.2 mg/mL) and the duration of ADA treatment was longer in the presence of MH (14.0 vs 9.2 mo; *P* ¼ .019). The median ADA trough levels were significantly higher in cases of MH (6.5 vs 4.2 mg/mL in those without MH; *P* < .005) (Figure 1*A*). Results were not influenced by IBD type (*P* ¼ .21) (Figure 2). AAA levels were lower in cases of MH, but this did not reach statistical significance (6.5 vs 14.1 ng/mL, respectively; *P* ¼ .06). Among the 9 patients with AAA levels greater than 10 ng/mL, only 1 patient had MH. MH rates increased significantly according to quartiles of trough levels of ADA (14%, 42%, 60%, and 66%; *P* ¼ .001) (Figure 1*B*).

ROC analysis was used to identify the optimal cut-off value for ADA trough levels for predicting MH (AUROC, 0.77; *P* ¼.005) (Figure 3). Absence of MH was associated with ADA trough levels less than 4.9 mg/mL (LHR, 4.3; sensitivity, 66%; specificity, 85%; positive predictive value, 88%; negative predictive value, 51%). Results of univariate analysis are reported in Supplementary Table 1. In multivariate analysis (Table 3), ADA trough levels (LHR, 0.62; 95% confidence interval, 0.41–0.94; *P* ¼ .026) and the duration of ADA (LHR, 0.82; 95% confidence interval, 0.68–0.97; *P* ¼.026) were the only 2 independent factors associated with MH. On univariate analysis, the type of IBD (*P* ¼.21) and the ADA dose (*P* ¼ .9) were not associated with MH.

Table 2. Characteristics of Patients With and Without MH

	MH	No MH
Age, *y*	36 (24–50)	47 (35–55)
Duration of disease, *y*	3 (1.2–4.8)	4.7 (3–6.6)
Duration of ADA, *mo*	14.0 (9–18)	9.2 (6–12.3)
CRP level, *mg/mL*	2.1 (1–7.2)	21.2 (8–45)
Trough levels of ADA, *mg/mL*	6.5 (4–9.5)	4.2 (3–5.9)
AAA, *ng/mL*	6.5 (3–22)	14.1 (7–32)

NOTE. Median values and ranges are shown.

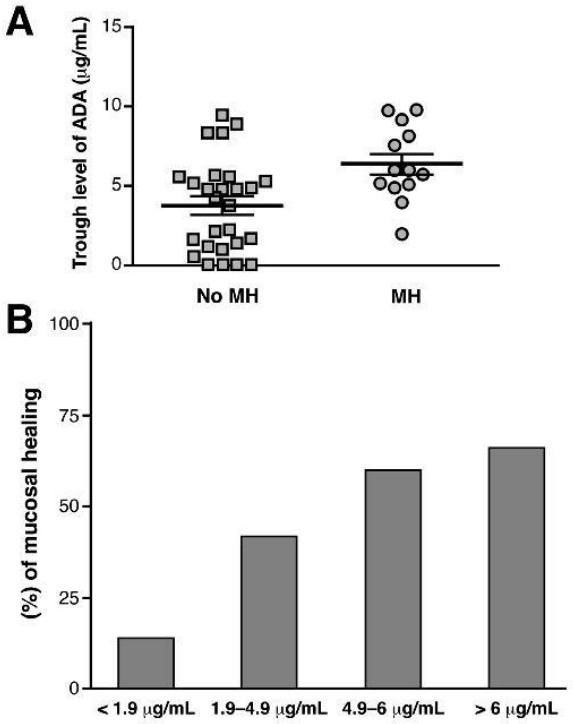


Figure 1. (*A*) Comparison of ADA trough levels between IBD patients with MH and those without MH (*P* < .005). (*B*) Quartiles of ADA trough levels for the obtention of MH (*P* ¼ .001).

Impact of Therapeutic Drug Monitoring of Adalimumab on Clinical Remission

The characteristics of IBD patients in clinical remission or with active disease are shown in Supplementary Table 2. Patients in clinical remission were younger and had longer ADA therapy duration. CRP levels were significantly lower in IBD patients in clinical remission (*P* < .005). ADA trough levels were significantly higher in patients in clinical remission (6.02 vs 3.2 mg/mL in those with active disease,

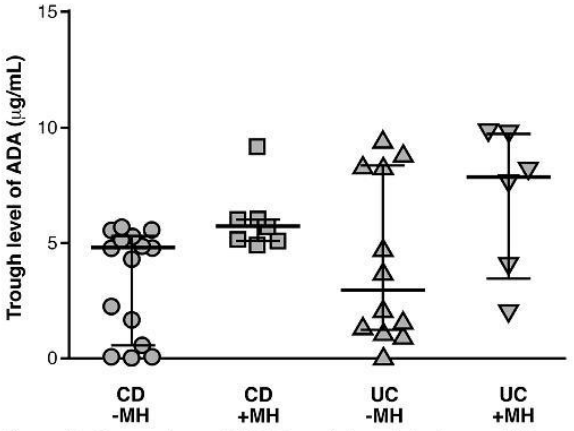


Figure 2. Comparison of ADA trough levels between IBD patients with MH and those without MH in CD and UC (*P* ¼ .04).

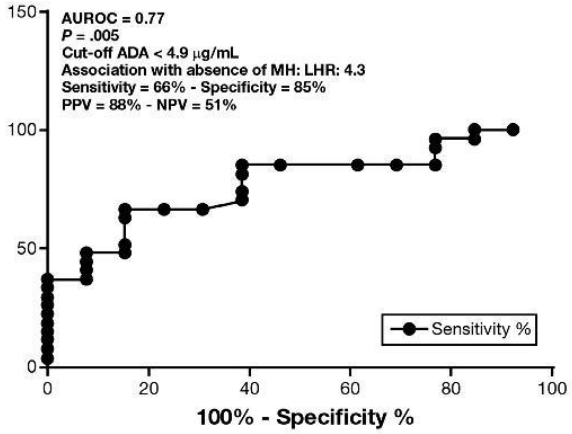


Figure 3. ROC curves for trough levels of ADA in IBD patients (MH vs no MH). NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

respectively; P ¼ .012) (Supplementary Figure 1*A*). AAA levels were increased in patients with active disease, but the difference did not reach statistical significance (13.5 vs 9.8 ng/mL in IBD patients in clinical remission, respectively). Nine patients had AAA levels greater than 10 ng/mL and only 1 patient was in clinical remission.

These results were not influenced by the type of IBD (P ¼ .9) and dose of ADA (P ¼ .09). The analysis of quartiles showed a strong correlation between trough levels of ADA and clinical remission rates (P ¼ .001) (Supplementary Figure 1*B*).

The ROC curve was used to identify the optimal cut- off value for ADA trough levels for predicting clinical remission (AUROC, 0.73; P ¼ .011) (Supplementary Figure 2). A cut-off value of 4.85 mg/mL for ADA trough levels was associated with clinical remission (LHR, 2.5; sensitivity, 81%; specificity, 67%; positive predictive value, 84%; negative predictive value, 57%). Results of univariate analysis are reported in Supplementary Table 3. In univariate analysis, type of IBD (P ¼ .9) was not associated with clinical remission. In multivariate analysis, trough levels of ADA, AAA greater than 10 ng/mL, duration of ADA treatment and ADA dose, but not CRP level, were associated indepen- dently with clinical remission (Supplementary Table 4).

Discussion

This study investigated the association between mucosal healing and therapeutic drug monitoring of ADA in patients with IBD. There is growing evidence that therapeutic drug monitoring of anti-TNF agents (infliximab, ADA) is associated with clinical outcomes.

Table 3. Multivariate Analysis for MH in IBD Patients

MH	LHR	Confidence interval	P
Residual trough level of ADA	0.62	0.41–0.94	.026
Duration of ADA treatment	0.82	0.68–0.97	.026
CRP level <5 mg/L	1.9	0.8–4.39	.1

In a recent meta-analysis, the presence of antibodies to infliximab was associated with a significantly higher risk of loss of clinical response to infliximab and lower serum infliximab levels in patients with IBD.[13]

In a referral-center–based cohort of 168 patients with CD treated with ADA, drug discontinuation was related directly to low ADA trough serum concentration, which was observed more frequently in patients who developed AAA.[5] West et al[6] showed that rates of clinical remission were 77% (23 of 30) in the absence of AAA vs 20% (1 of 5) in case of detectable antibodies in a retrospective study enrolling 30 CD patients. The presence of AAA was correlated strongly with the absence of response to ADA (P ¼ .006).[6] In a retrospective study involving 121 ADA-treated CD patients, of the 161 samples obtained, 94 were at trough.[14] ADA levels greater than 5 mg/mL were predictive of normal CRP levels. AAA only did not predict normal CRP or clinical remission, but all patients with trough AAA levels greater than 5 mg/mL had an increased CRP level. On multivariate regression, correlation between drug levels, CRP level, and clinical response was preserved at AAA levels less than 5 mg/mL, but not above these levels.[14] We could not evaluate the variability of ADA trough levels because this was a cross-sectional study. A recent article showed that median ADA concentrations were significantly higher in patients who achieved clinical remission than those who did not at week 4 of the Clinical Assessment of Adalimumab Safety and Efficacy Studied as Induction Therapy in Crohn's Disease I trial (8.10 vs 5.05 mg/mL, respectively; $P < .05$). Interestingly, at all time points, ADA concentrations showed considerable variability and overlap between patients with and without remission.[15]

The UC long-term remission and maintenance with ADA (Ulcerative Colitis Long-term Remission and Maintenance With Adalimumab 2) trial was a randomized, double-blind, placebo-controlled trial evaluating the efficacy of ADA in induction and maintenance of clinical remission in 494 patients with moderate-to-severe UC who received concurrent treatment with oral corticosteroids or immunosuppressants.[2] In this trial, residual ADA trough levels were higher in case of clinical response at weeks 8 and 52, but no statistical analysis was available.[2] In our study, we could confirm that therapeutic drug monitoring of ADA was associated with clinical remission in IBD patients. The analysis of quartiles showed a strong correlation between ADA trough levels and clinical remission. Importantly, we have identified a cut-off value of 4.85 mg/mL for ADA trough levels, which could predict clinical remission as previously described for CRP normalization.[14] Furthermore, only 1 of 9 IBD patients with AAA levels greater than 10 ng/mL was in clinical remission, thus confirming previous reports on the negative impact of immunogenicity on therapeutic drug monitoring of anti-TNF agents. This

correlation was lost among patients with AAA greater than 5 mg/mL, suggesting a neutralizing effect of AAA.[14]

MH has emerged as a new therapeutic goal in IBD. In contrast to infliximab, the impact of therapeutic drug monitoring of ADA on MH rates was unknown in both CD and UC.[16] We showed that median ADA trough levels were significantly higher in patients who achieved MH. This was confirmed by the analysis of quartiles and a multivariate analysis of factors independently associated with MH. Interestingly, the optimal cut-off value of ADA trough levels for predicting MH was broadly similar to that observed for clinical remission (4.9 vs 4.85 mg/mL, respectively). Similarly to clinical remission, only 1 of 9 IBD patients with AAA levels greater than 10 ng/mL had MH in our study.

The main strengths of our study were the systematic evaluation of clinical disease activity using the CDAI for CD and the Mayo score for UC; in addition, endoscopy was performed in all patients to assess mucosal lesions as routinely performed in our center. Importantly, we could identify optimal cut-off values for ADA trough levels. Finally, even though CD and UC were analyzed together owing to the relatively small number of patients, we could show by subgroup analysis that IBD type did not influence our results. Of note, only 10% of our patients were treated with combination therapy. Hence, the impact of concomitant immunomodulator use could not be analyzed in our study. A weakness of this study was the small number of included patients. The small sample size of our study increased the probability of a false-negative association from being underpowered. The low number of patients included and the number of factors considered in the multivariate analysis (2 for MH and 4 for clinical remission) also can lead to false-positive results. However, only 2 factors are considered in the multivariate analysis of the MH, which greatly reduces false-positive results.

In conclusion, our findings suggest that ADA trough levels are associated significantly with both clinical remission and MH rates in IBD patients. Importantly, we identified 4.85 to 4.9 mg/mL as the optimal cut-off value for predicting these outcomes. Furthermore, immunogenicity negatively influences the outcome of ADA treatment in IBD patients. These results await confirmation by large prospective studies.

Supplementary Material

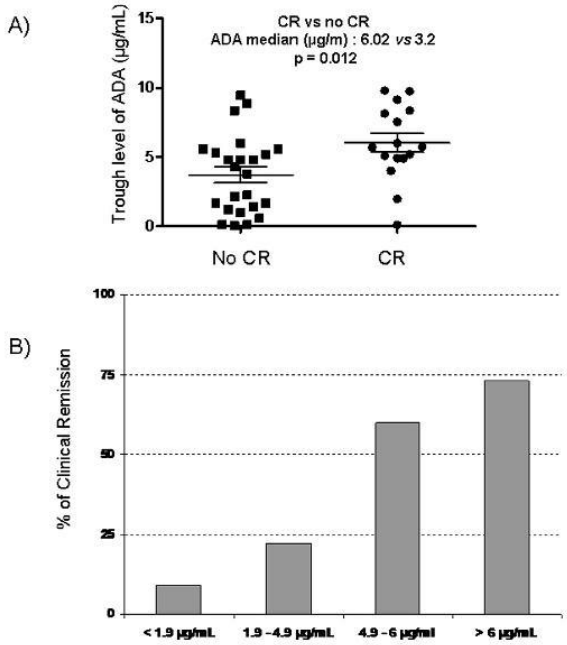
Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of *Clinical Gastroenterology and Hepatology* at www.cghjournal.org, and at http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2013.07.010.

References

1. Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P, et al. Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial. Gastroenterology 2007; 132:52–65.
2. Sandborn WJ, van Assche G, Reinisch W, et al. Adalimumab induces and maintains clinical remission in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. Gastroenterology 2012; 142:257–265 e1–e3.
3. Bartelds GM, Krieckaert CL, Nurmohamed MT, et al. Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. JAMA 2011;305:1460–1468.
4. Takahashi H, Tsuji H, Ishida-Yamamoto A, et al. Plasma trough levels of adalimumab and infliximab in terms of clinical efficacy during the treatment of psoriasis. J Dermatol 2013;40:39–42.
5. Karmiris K, Paintaud G, Noman M, et al. Influence of trough serum levels and immunogenicity on long-term outcome of adalimumab therapy in Crohn's disease. Gastroenterology 2009;137:1628–1640.
6. West RL, Zelinkova Z, Wolbink GJ, et al. Immunogenicity negatively influences the outcome of adalimumab treatment in Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther 2008;28:1122–1126.
7. Hebuterne X, Lemann M, Bouhnik Y, et al. Endoscopic improvement of mucosal lesions in patients with moderate to severe ileocolonic Crohn's disease following treatment with certolizumab pegol. Gut 2013;62:201–208.
8. Maser EA, Villela R, Silverberg MS, et al. Association of trough serum infliximab to clinical outcome after scheduled maintenance treatment for Crohn's disease. Clin Gastroenterol Hepatol 2006;4:1248–1254.
9. Seow CH, Newman A, Irwin SP, et al. Trough serum infliximab: a predictive factor of clinical outcome for infliximab treatment in acute ulcerative colitis. Gut 2010;59:49–54.
10. Van Moerkeroke W, Ackaert C, Compernolle G. High infliximab trough levels are associated with mucosal healing in Crohn's disease. Gastroenterology 2010;5:S60.
11. Frenz MB, Dunckley P, Camporota L, et al. Comparison between prospective and retrospective evaluation of Crohn's disease activity index. Am J Gastroenterol 2005;100:1117–1120.
12. Rutgeerts P, Van Assche G, Sandborn WJ, et al. Adalimumab induces and maintains mucosal healing in patients with Crohn's disease: data from the EXTEND trial. Gastroenterology 2012; 142:1102–1111 e2.
13. Nanda KS, Cheifetz AS, Moss AC. Impact of antibodies to infliximab on clinical outcomes and serum infliximab levels in patients with inflammatory bowel disease (IBD): a meta-analysis. Am J Gastroenterol 2013;108:40–47; quiz 48.
14. Mazor Y, Koplov K, Ben Huret D. Evaluating adalimumab drug and antibody levels as predictors of clinical and laboratory response in Crohn's disease patients. J Crohn's Colitis 2013; 7(suppl 1):S217.
15. Chiu YL, Rubin DT, Vermeire S, et al. Serum adalimumab concentration and clinical remission in patients with Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 2013;19:1112–1122.
16. Nanda KS, Cheifetz AS, Moss AC. Impact of antibodies to infliximab on clinical outcomes and serum infliximab levels in patients with inflammatory bowel disease (IBD): a meta-analysis. Am J Gastroenterol 2013;108:40–47; quiz 48.

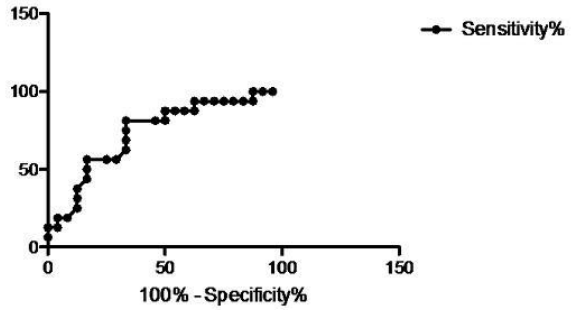
Reprint requests
Address requests for reprints to: Xavier Roblin, MD, Department of Gastroenterology, CHU de Saint-Etienne, 42023 Saint-Etienne, France. e-mail: xavier.roblin@chu-st-etienne.fr; fax: 0033477828452.

Conflicts of interest
These authors disclose the following: Laurent Peyrin–Biroulet has received lecture and consulting fees from Abbvie and MSD, and Xavier Roblin has received lecture and consulting fees from Merck. The remaining authors disclose no conflicts.



Supplementary Figure 1. (*A*) Comparison of ADA trough levels between IBD patients in clinical remission (CR) and those with active disease (*P* ¼ .012). (*B*) Quartiles of ADA values for the obtention of clinical remission (*P* ¼ .001).

AUROC = 0,73; p = 0.011
Cut-off ADA > 4.85 µg/mL
Association with CR: LHR: 2.5
Sensitivity = 81% - Specificity = 67%
PPV = 84% - NPV = 57%



Supplementary Figure 2. ROC curves for trough levels of ADA in IBD patients (CR vs no CR). CR, clinical remission; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

Supplementary Table 1. Univariate Analysis for MH in IBD Patients

Parameters	*P*
Age	.038
Sex ratio, female/male	.3
UC	.21
Duration of ADA	.019
Duration of disease	.05
Dosing of ADA	.9
Trough level of ADA	.0059
AAA >10 ng/mL	.06

Supplementary Table 2. Patient Characteristics Based on Obtaining Clinical Remission

	Clinical remission	No clinical remission
Age, *y*	37 (26–49)	47 (36–58)
Duration of disease, *y*	3.2 (1.8–6.1)	5.1 (3.7–7.6)
Duration of ADA, *mo*	14.1 (7–18)	9 (6–11.2)
CRP level, *mg/mL*	3.5 (1–8)	19 (3–45)
Trough levels of ADA, *mg/mL*	6.02 (3–9.5)	3.2 (2–6.8)
AAA, *ng/mL*	9 (4–15)	13 (6–18)

NOTE. Median values and ranges are shown.

Supplementary Table 3. Univariate Analysis for Clinical Remission in IBD Patients

Parameters	*P*
Age	.04
Sex ratio, female/male	.9
UC	.9
Duration of treatment with ADA	.04
Duration of disease	.2
Dosing of ADA	.09
Trough levels of ADA	.012
AAA >10 ng/mL	.03
CRP level >5 mg/mL	.0004

Supplementary Table 4. Multivariate Analysis for Clinical Remission in IBD Patients

Clinical remission	LHR	Confidence interval	*P*
Residual trough level of ADA	0.38	0.19–0.72	.006
AAA >10 ng/mL	0.91	0.85–0.98	.012
Duration of ADA	0.73	0.55–0.92	.02
ADA dose	1.18	1.03–1.36	.018
CRP level <5 mg/mL	1.5	0.7–3.2	.2

nature publishing group ORIGINAL CONTRIBUTIONS 1

Development of an Algorithm Incorporating Pharmacokinetics of Adalimumab in Inflammatory Bowel Diseases

Xavier Roblin, MD, PhD[1], M. Rinaudo, MD[2], E. Del Tedesco, MD[1], J.M. Phelip, MD, PhD[1], C. Genin, MD, PhD[2], L. Peyrin-Biroulet, MD, PhD[3] and S. Paul, PhD[2]

OBJECTIVES: **Several decision algorithms based on the measurement of infliximab (IFX) trough levels and antibodies to IFX have been proposed. Whether such algorithms can be extrapolated to the pharmacokinetics of adalimumab (ADA) has yet to be determined.**

METHODS: **A prospective study included all consecutive patients with inflammatory bowel disease (IBD) having a disease flare while being on ADA 40mg every 2 weeks were included. All patients were primary responders to ADA therapy and were anti-tumor necrosis factor (TNF) naive. ADA trough levels and antibodies against ADA (AAA) were measured blinded to clinical data (Elisa LISA-Tracker, Theradiag). All patients were optimized with ADA 40mg weekly. Four months later, in the absence of clinical remission (CR; Crohn's disease activity index <150 for Crohn's disease (CD), and Mayo score <2 for ulcerative colitis), patients were treated with IFX therapy. Patients were divided into three groups based on ADA trough levels and based on previous studies: group A, ADA>4.9μg/ml; group B, ADA<4.9μg/ml and undetectable levels of AAA (<10ng/ml); and group C, ADA<4.9μg/ml and AAA>10ng/ml.**

RESULTS: **A total of 82 patients were included (55% CD; mean age=43 years, disease duration=7.4 years, duration of ADA therapy=17 months). After optimization of ADA treatment, 29.2% of patients achieved CR in group A (N=41), 67% in group B (N=24), and 12% in group C (N=17; P<0.01 between groups A/B and B/C). C-reactive protein level at the time of relapse, disease duration, duration of ADA therapy, and IBD type was not predictive of CR after ADA optimization by univariate analysis. The response to ADA optimization was significantly more durable in group B (15 months) than in groups A and C (4 and 5 months, respectively). Fifty-two patients who failed following ADA optimization (63%) were treated with IFX, and 30.6% of them achieved CR. CR rates following IFX initiation were 6.9%, 25%, and 80% in groups A, B, and C, respectively (P<0.01 between groups C/A and between groups C/B). Duration of response to IFX was significantly higher in group C than in groups A and B (14 vs. 3 and 5 months, respectively, P<0.01).**

CONCLUSIONS: **The presence of low ADA trough levels without AAA is strongly predictive of clinical response in 67% of cases after ADA optimization. Conversely, low ADA levels with detectable AAA are associated with ADA failure, and switching to IFX should be considered. ADA trough levels >4.9μg/ml are associated with failure of two anti-TNF agents (ADA and IFX) in 90% of cases, and switching to another drug class should be considered.**

SUPPLEMENTARY MATERIAL is linked to the online version of the paper at http://www.nature.com/ajg

Am J Gastroenterol 2014; 00:000–000; doi:10.1038/ajg.2014.146

[1]Service de Gastrologie-Entérologie-Hépatologie, CHU de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France; [2]Laboratoire d'Immunologie et d'Immunomonitoring CHU de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France; [3]Inserm U954 and Department of Gastroenterology, Nancy University Hospital, Henri Poincaré University, Nancy 1, France.
Correspondence: Xavier Roblin, MD, PhD, Department of Gastroenterology, CHU de Saint-Etienne, 42023 Saint-Etienne, France.
E-mail: xavier.roblin@chu-st-etienne.fr
Received 9 December 2013; accepted 30 April 2014

© 2014 by the American College of Gastroenterology

INTRODUCTION

Adalimumab (ADA, a fully human anti-tumor necrosis factor (TNF) alpha monoclonal antibody), has been approved for the treatment of both Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) refractory to standard medications. Similar to infliximab (IFX) (1,2), loss of response to ADA is relatively frequent in patients with inflammatory bowel diseases (IBDs) (3,4). In these patients, it is recommended to optimize ADA therapy by shortening the interval to 40 mg weekly.

One of the most well-characterized factors associated with loss of response to these agents is the development of immunogenicity, whereby the production of neutralizing antidrug antibodies accelerates drug clearance leading to subtherapeutic drug concentrations and, finally, to treatment failure (5).

Recent studies found an association between pharmacokinetics of ADA and clinical remission (CR) and mucosal healing rates (6).

We could demonstrate that therapeutic drug monitoring of IFX strongly predicts the likelihood of achieving mucosal healing following IFX dose intensification in both CD and UC (7).

Along with previous studies, an algorithm incorporating pharmacokinetics of IFX in IBD was developed (8). Patients with therapeutic IFX drug levels and active disease are unlikely to respond to ongoing anti-TNF therapy, and non-anti-TNF agents should be considered. Patients who have previously responded to IFX who develop subtherapeutic drug levels in association with high antibodies to IFX usually respond to another anti-TNF agent and not to dose intensification. Conversely, when these patients develop subtherapeutic drug levels without evidence of immunogenicity, they benefit from dose intensification (9). Whether such an algorithm can be extrapolated to ADA has yet to be determined.

The aim of this prospective study was therefore to explore the clinical utility of therapeutic drug monitoring of ADA in predicting CR rates following ADA dose intensification for loss of response in IBD patients.

METHODS

This was a prospective observational study, conducted between January 2011 and June 2013. All consecutive adult patients with CD or UC followed up at Saint-Etienne University Hospital and treated with ADA maintenance therapy at a dose of 40 mg every other week who presented a clinical relapse were included. Patients were followed up every 2 months, and disease activity score was calculated at each visit (Crohn's disease activity index (CDAI) for CD and Partial Mayo clinical score for UC).

If a clinical relapse (CDAI > 220 for CD and Mayo Clinic > 5 for UC) was associated with elevated fecal calprotectin level > 450 μg/g stool for CD or the presence of an endoscopic Mayo score > 1 for UC, ADA therapy was optimized at a dose of 40 mg weekly. Before ADA optimization, blood samples were taken for the measurement of drug levels of adalimumab (residual trough levels of adalimumab (TRA)) and antibodies against ADA (AAA) levels. The analysis of these samples was made at the end of the study and was blinded to clinical and biological data.

For CD patients, CR was defined by a CDAI < 150 and fecal calprotectin level < 250 μg/g stool. For UC patients, CR was defined by a total Mayo score <3, and mucosal healing was defined by an endoscopic Mayo score of 0 or 1.

In case of clinical relapse according to the definitions reported above while on ADA 40 mg weekly, patients were switched to IFX (5 mg/kg at weeks 0, 2, 6, and every 8 weeks that was initiated 1 week after the last injection of ADA). According to our specific protocol, each IFX infusion was preceded by treatment with 200 mg of hydrocortisone. A new measurement of TRA and AAA was performed before the first infusion of IFX. At every IFX infusion, clinical disease activity was evaluated using CDAI or partial MAYO score. In case of clinical relapse, fecal calprotectin for CD and procto-sigmoidoscopy for UC were performed. The protocol was approved by our local ethics committee (2012-006).

If a patient was on combination therapy, the dose of the immunomodulator had to be stable throughout the study period, and all included patients were naïve to anti-TNF therapy and were primary responders to ADA.

All patients with perianal fistulizing CD or with UC proctitis were excluded from the analysis. All the patients were negative for *Clostridium difficile* at study inclusion.

Measurement of ADA drug levels and AAA

Serum samples are routinely and systematically collected just before ADA injection and stored at − 20 °C. TRA and AAA concentrations were all measured using the Lisa-Tracker Premium Adalimumab ELISA kit (Theradiag; Marne la vallée, France). This assay has been developed to reduce low-affinity binding of immune complexes or interfering molecules such as the rheumatoid factor. The use of specific buffers for both binding and washing steps allows a very efficient capture of free molecules. Fecal calprotectin was measured in stools using the Quantum Blue Calprotectin assay (Buhlmann, Basel, Switzerland).

Statistical analysis

Descriptive statistics were used to analyze baseline characteristics. Quantitative variables were described as means and standard deviation (s.d.), and proportions were expressed as percentages. All reported P values were two-sided, and $P < 0.05$ was considered statistically significant. Fisher's exact test, χ^2 test, and log-rank test for discontinuation were used for statistical analysis between groups. A logistic regression analysis was performed to estimate independent associated factors predictive of clinical response after optimization of ADA and switch to IFX. Statistical analysis was performed using IBM SPSS 20.0.0 (IBM, Somers, NY).

RESULTS

Of the 180 patients treated with ADA, 82 patients met the inclusion criteria and had clinical relapse while on ADA 40 mg every other week (55% CD (95% CI = 33–67), mean age = 43 years, disease duration= 7.4 years, treatment duration with ADA = 17 months). Patient characteristics are reported in **Table 1**.

Table 1. Patient characteristics at study inclusion

Number of patients	82
Age* (±s.d.)	43 (12)
Sex ratio M/F	1
Duration of disease* (years, ±s.d.)	7.4 (3.2)
ADA duration* (months, ±s.d.)	17 (9)
Immunosuppressive treatment (*N*, %)	10 (12%)
Mean CRP* (mg/l) (±s.d.)	23 (20)
CD (%)	46 (55%)
Phenotype	A1:2; A2:36; A3:8
	B1:32; B2:14; B3:16
	L1:25; L2:7; L3:13
	P:8
CDAI* at inclusion (±s.d.)	340 (110)
Fecal calprotectin* at inclusion (μg/g stool) (±s.d.)	840 (220)
UC	36 (45%)
Phenotype	E2:12; E3:24
Mayo score* (±s.d.)	9 (2)
Mayo endoscopic score*	Mayo 2=20; Mayo 3=16

ADA, adalimumab; CD, Crohn's disease; CDAI, Crohn's disease activity index; CRP, C-reactive protein; F, female; M, male; UC, ulcerative colitis.
*Mean.

For CD patients at study inclusion, the mean CDAI was 340 (±110) and the mean fecal calprotectin level was 840 μg/g of stools. For UC, the total Mayo score was 9 (±2), with an endoscopic score of 2 in 55% (95% CI=22–71) of cases.

Patients were divided into three groups according to the results of our recent study (6):

- Group A: TRA > 4.9 μg/ml (N = 41). Ten patients had AAA > 10 μg/ml and thirty-one patients were negative for AAA.
- Group B: TRA < 4.9 μg/ml and undetectable levels of AAA (< 10 ng/ml; N=24).
- Group C: TRA < 4.9 μg/ml and AAA > 10 ng/ml (N=17).

C-reactive protein levels were comparable between all three groups (25 mg/l for group A, 22 mg/l for group B, and 21 mg/l for group C (P = 0.56)). The percentage of CD was also comparable across the three groups: 57% (95% CI=39–60; N=23), 50% (95% CI=31–69; N=13), and 58% (95% CI=39–86; N=10) for groups A, B, and C, respectively (P = 0.67 between groups A and B and P=0.68 between groups B and C).

Results for each group after ADA therapy optimization and switch to IFX (**Supplementary Figure 1A** online) and for UC and CD (**Supplementary Figure 1B**) are presented as **Supplementary Material**.

Clinical response after ADA optimization

After ADA optimization, 36.5% (95% CI=24–49) of IBD patients (N = 30) remained in CR at 6 months (**Figure 1**). In group A, 29.2% (95% CI=15–43) of patients (N=12) showed a CR compared with 67% (95% CI = 45–82) in group B (N = 16) and only 12% (95% CI=0–28; N=2) in group C (P<0.01 between groups A and B and between B and C; **Figure 1a**). There was no difference in CR rates within group A according to AAA status.

The mean relapse-free survival (time between optimization and clinical relapse) was 5 months (±2 months) for group A, 15 months (±5 months) for group B, and 4 months (±3 months) for group C (P< 0.01 between groups A and B and between B and C; **Figure 1b**). At 1 year, none of the patients in the groups A and C were in CR. Conversely, 13 patients (52%, 95% CI=32–74) in group B maintained CR (P < 0.01 between groups A and B and between groups B and C; **Figure 1a**). A total of 15 patients in the group A (37%, 95% CI=15–57), 2 patients in group B (8%, 95% CI=0–18), and 10 in group C (58%; 95% CI=38–86) did not achieve CR after ADA optimization (P<0.01 between groups A and B and between groups B and C; **Figure 1c**). C-reactive protein at the time of clinical relapse, use of immunosuppressor, duration of disease or ADA treatment, and type of IBD were not predictive of CR after optimization by univariate analysis (**Table 2**).

Clinical response after switching to IFX among patients with ADA failure after 6 months

Fifty-two patients who failed ADA 40 mg weekly were switched to IFX (30 CD, mean age 38 years). Patient characteristics are reported in **Table 3**. Twenty-nine patients starting IFX belonged to group A (six with positive AAA), eight to group B, and fifteen to group C. C-reactive protein levels did not differ between groups: 21 mg/l in group A, 22 mg/l in group B, and 18 mg/l in group C (P = not significant). The percentage of CD was similar in the three groups: 62% (95% CI=40–75; N=18), 50% (95% CI=15–84; N=4), and 52% (95% CI=8–78; N=8) for groups A, B, and C, respectively. There was no difference in CR rates within group A according to AAA status (**Supplementary Figure S3**).

In all, 30.6% (95% CI=28–43; N=16) of patients were in CR with IFX at 6 months. CR rates were 6.9% (95% CI=0–14; N=2), 25% (95% CI=0–55; N=2), and 80% (95% CI=69–100; N=12) in groups A, B, and C, respectively (P<0.01 between groups A and C and between B and C; **Figure 2a**).

The mean relapse-free survival (time between the switch to IFX and clinical relapse) was 3 months (±2 months) for group A, 5 months (±3 months) for group B, and 14 months (±7 months) for group C (P<0.01 between groups A and C and between B and C; **Figure 2b**). At 1 year, no patients of the groups A and B were in CR. Conversely, 8 patients (55%, 95% CI=23–76) in group C remained in CR at 1 year (P < 0.01 between groups A and C and between groups B and C; **Figure 2a**). Finally, 20 patients in group A (68%, 95% CI=34–80), 4 patients in group B (50%, 95% CI=23–68), and 2 in group C (13%, 95% CI=0–35) did not achieve CR after IFX induction (P<0.01 between groups A and C and between B and C; **Supplementary Figure S4**).

© 2014 by the American College of Gastroenterology

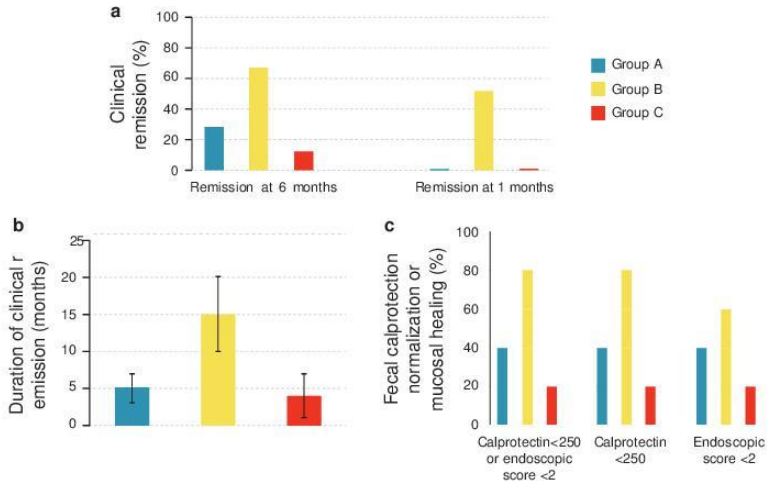


Figure 1. Clinical remission after adalimumab (ADA) optimization. (**a**) Rate of clinical remission at 6 months and 1 year in function of trough levels of adalimumab (TRA) and antibodies against adalimumab (AAA) levels at the time of ADA optimization ($P < 0.01$ between group B vs. A et C). (**b**) Median duration of clinical response at the optimization in function of TRA and AAA at the time of optimization ($P < 0.01$ between group B vs. A et C). (**c**) Evolution of calprotectin levels and endoscopic Mayo score at 6 months in accordance with TRA and AAA levels at the time of ADA optimization ($P < 0.001$ between group B vs. A et C).

Table 2. Predictors of clinical remission following ADA therapy optimization: univariate analysis

TRA >4.9 μg/ml	*P=0.04*
TRA <4.9 μg/ml and AAA >10 ng/ml	*P=0.02*
TRA <4.9 μg/ml and AAA <10 ng/ml	*P=0.02*
Type of IBD	*P=0.56*
CRP	*P=0.12*
IS associated	*P=0.15*
Duration of disease	*P=0.23*
Duration of ADA	*P=0.13*
Age	*P=0.43*
Sex	*P=0.89*

AAA, antibodies against adalimumab; ADA, adalimumab; CRP, C-reactive protein; IBD, inflammatory bowel disease, IS, immunosuppressor; TRA, trough levels of adalimumab.

In univariate analysis (**Tables 3** and **4**), only TRA and AAA were predictive of clinical response after switch to IFX. IBD type, C-reactive protein level at baseline, concomitant S, and duration of ADA therapy were not associated with clinical benefit after switching to IFX.

Biomarker and endoscopic remission after ADA optimization and switch to IFX

To include only objective signs of inflammation in the analysis as clinical symptoms may be subjective, particularly in CD, we focused on calprotectin levels and endoscopy. We defined biomarker remission by a fecal calprotectin level <250 μg/g stool for CD and endoscopic remission by an endoscopic Mayo score < 2. After ADA optimization, 42.6% (95% CI=26–50) of IBD patients (N = 30) remained in biomarker or endoscopic remission at 6 months. In group A, 34% (95% CI=3 9–48) of patients (N=14) showed a biomarker or endoscopic remission compared with 75% (95% CI=5 4–85) in group B (N=18) and only 17% (95% CI=0–33; N=2) in group C (P<0.001 between groups A and B and between B and C; **Figure 1c**). These results were comparable according to trough levels when biomarker remission and endoscopic remission were analyzed separately.

After switching to IFX, 36.5% (95% CI=29–45; N=19) were in biomarker or endoscopic remission with IFX at 6 months. Endoscopic or biomarker remission rates were 10.3% (95% CI=0–24; N=3), 35% (95% CI=4–71; N=3), and 87% (95% CI=79–100; N = 12) in groups A, B, and C, respectively (P < 0.001 between groups A and B, and P = 0.025 between B and C). These results were comparable according to trough levels when biomarker remission and endoscopic remission were analyzed separately (**Figure 2c**).

DISCUSSION

Managing loss of response to anti-TNF agents is a challenge in clinical practice. Whether pharmacokinetics of ADA can be used to predict response to drug optimization is unknown. In a cohort of CD patients, Karmiris *et al.* showed that patients who continued ADA beyond week 26 had significantly higher ADA TRA levels at week 4 and after week 4 compared with the group that stopped ADA (10). However, no threshold was reported in this landmark study. In a recent work including prospectively 40 IBD patients, we found a significant correlation between TRA and CR

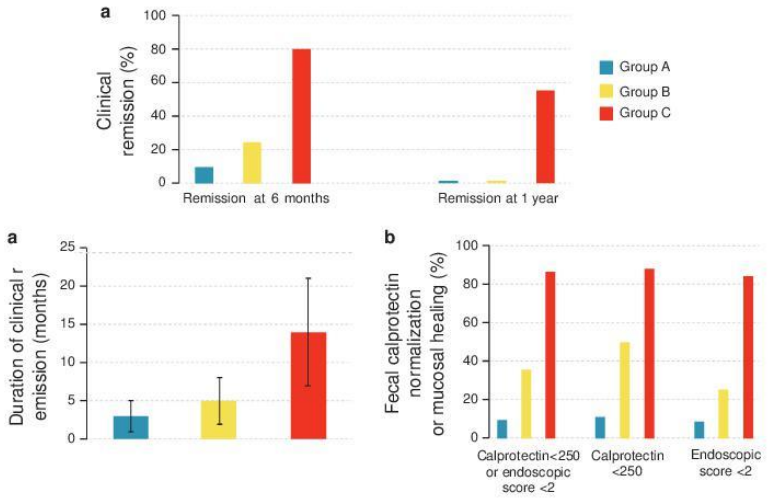


Figure 2. Clinical remission after switching to infliximab (IFX). (**a**) Rate of clinical remission at 6 months and 1 year in function of trough levels of adalimumab (TRA) and antibodies against adalimumab (AAA) levels at the time of switch ($P<0.01$ between group C vs. A et B). (**b**) Median duration of clinical response at the switch in function of TRA and AAA at the time of switch ($P<0.01$ between group C vs. A et B). (**c**) Evolution of calprotectin levels and endoscopic Mayo score at 6 months in accordance with TRA and AAA levels at the time of switch ($P<0.001$ between groups A and B, and $P=0.025$ between groups B and C).

Table 3. Characteristics of patients who switched to infliximab therapy

Number	52
Age* (±s.d.)	38 (15)
Sex ratio M/F	0.8
Duration of disease* (years, ±s.d.)	8.0 (3.8)
Duration of ADA* (months, ±s.d.)	23 (12)
Immunosuppressive treatment (%)	5 (9%)
Mean CRP* (mg/l) (±s.d.)	20 (15)
CD (%)	30 (58%)
Phenotype	A1:2; A2:22; A3:6
	B1:16; B2:8; B3:8
	L1:19; L2:6; L3:5
	P:6
CDAI* at inclusion (±s.d.)	260 (40)
Fecal calprotectin*at inclusion (µ/g stool) (±s.d.)	750 (250)
UC	22 (42%)
Phenotype	E2:9; E3:13
Mayo score* (±s.d.)	8 (2)
Mayoendoscopic score	Mayo 2:12; Mayo 3:8

ADA, adalimumab; CD, Crohn's disease; CDAI, Crohn's disease activity index; CRP, C-reactive protein; F, female; M, male; UC, ulcerative colitis.
*Mean.

and mucosal healing (6). In this study, a threshold of 4.9 µg/ml was associated with better outcomes using ROC analysis (6). Importantly, the cutoff value that was identified in three others studies ranged from 4.8 to 5.9 µg/ml (11–13). This cutoff is in line with our previous findings (6).

Recently, using data from pivotal trials on ADA, TRA levels were found to be higher among patients who responded to ADA therapy (14).

We could demonstrate that the group of patients with low TRA without AAA had better response to ADA dose intensification regarding both clinical response and duration of response as compared with IBD patients with high TRA and/or with low TRA and high AAA rates. These results are similar to those reported for IFX (8).

The poor response rate in the group with positive TRA is probably unrelated to TNF (ref). The low response to ADA optimization in the group with low TRA but high AAA is probably related to the absence of elevated levels of TRA after optimization related to Ab/Ag complex formation (5,9). West *et al.* aimed to assess whether AAAs affect ADA treatment outcome in patients with CD (15). In this retrospective study, patients with active CD and who had lost response or were intolerant to IFX were treated with ADA. The presence of AAA was related to nonresponse to ADA ($P=0.006$). Karmiris *et al.* found that ADA trough serum concentration increased after dose escalation from 4.8 (2.3–8.9) to 9.4 (1.2–16.4) µg/ml ($P=0.001$), and this increase correlated well with the clinical response to escalation (5.9 (1.9–8.3) µg/ml for responders vs. 0.0 (0.0–1.7) µg/ml for nonresponders, $P=0.0001$) (10).

We also showed that TRA and AAA levels influence the response to the switch to IFX therapy. Interestingly, Afif *et al.* obtained comparable results when switching from IFX to ADA (80% of clinical response) among patients with low IFX trough levels and high antibodies to IFX (8).

Our work has several strengths. First, it was a prospective study. Second, our results were blinded between clinicians and

© 2014 by the American College of Gastroenterology

Table 4. Predictors of clinical remission after switching to infliximab treatment: univariate analysis

TRA >4.9 μg/ml	*P=0.03*
TRA <4.9 μg/ml and AAA >10 ng/ml	*P=0.04*
TRA <4.9 μg/ml and AAA <10 ng/ml	*P=0.05*
Type of IBD	*P=0.67*
CRP	*P=0.09*
IS associated	*P=0.24*
Duration of disease	*P=0.6*
Duration of ADA	*P=0.13*
Age	*P=0.54*
Sex	*P=0.91*

AAA, antibodies against adalimumab; ADA, adalimumab; CRP, C-reactive protein; IBD, inflammatory bowel disease; IS, immunosuppressor; TRA, trough levels of adalimumab.

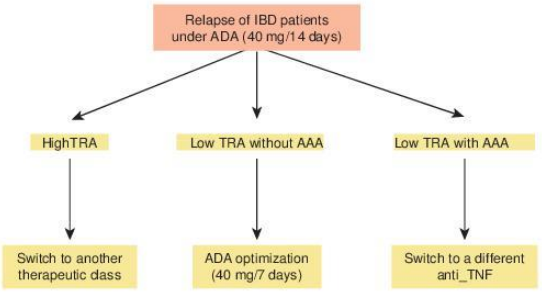


Figure 3. Therapeutic algorithm in function of TRA and antibodies against adalimumab (AAA) in patients with clinical relapse under adalimumab (ADA). IBD, inflammatory bowel disease; TNF, tumor necrosis factor; TRA, trough levels of adalimumab.

immunologists as data on TRA and AAA were only available at the end of the study.

Of note, we pooled CD and UC even though univariate analysis found that IBD type did not influence our results, confirming our previous work (6). As this was a prospective observational study, no calculation of sample size was made.

Interestingly, we could show that patients with clinical relapse under ADA therapy with high TRA usually do not respond either to ADA dose intensification or to a switch to IFX therapy, thus indicating that a non-TNF inhibitor should be initiated in these patients.

The concomitant use of immunosuppressor did not influence our results, but the small proportion of patients (12 %) on immunosuppressor does not allow us to accurately assess this parameter.

Taken together, when considering our findings, we propose a new therapeutic algorithm in case of loss of response to ADA 40 mg every other week (**Figure 3**).

In conclusion, as for IFX, TRA and AAA levels may have a strong impact on the management of IBD patients losing response while on ADA therapy. The presence of low ADA trough levels without AAA is strongly predictive of a favorable response to ADA optimization in 67% of cases. Conversely, a switch to IFX should be considered in patients with low ADA levels and detectable AAA. Finally, ADA trough levels above 4.9 μg/ml are associated with response to ADA dose intensification or switch to IFX therapy in only 10% of cases. Hence, switching to a different drug class, such as a non-TNF inhibitor, should be considered in this patient population.

CONFLICT OF INTEREST

Guarantor of the article: Xavier Roblin, MD, PhD.

Specific author contributions: The whole study was conceived and designed by S.P. and X.R. Statistical analyses were performed by X.R. All authors were involved in the interpretation of results and discussion. S.P., L.P.B., and X.R. have drafted the manuscript, which was critically revised by all the authors. All authors also approved the final version of the manuscript.

Financial support: None.

Potential competing interest: L.P.B. and X.R. have received lecture and consulting fees from Merck. X.R. had received lecture fees from Theradiag and Abbvie. The remaining authors declare no conflict of interest

Study Highlights

WHAT IS CURRENT KNOWLEDGE

- High trough levels of adalimumab (ADA) are associated with clinical response and mucosal healing in inflammatory bowel disease (IBD) patients.
- Antibodies against ADA are associated with clinical failure.
- To date, no algorithm is available for IBD patients on ADA therapy.

WHAT IS NEW HERE

- Trough levels of ADA in serum without antibodies against adalimuamb is strongly predictive of a favorable clinical response in 67% of cases after ADA optimization.
- Low trough levels of ADA with detectable antibodies are associated with ADA optimization failure, and switching to infliximab should be considered.
- High trough levels of ADA are associated with failure of two anti-TNF agents (ADA and infliximab) in 90% of cases with loss of response to ADA, and switching to another drug class should be considered.
- An algorithm incorporating pharmacokinetics of ADA may be considered in clinical practice in order to improve disease outcomes in IBD patients.

REFERENCES

1. Chaparro M, Burgueno P, Iglesias E *et al.* Infliximab salvage therapy after failure of ciclosporin in corticosteroid-refractory ulcerative colitis: a multicentre study. Aliment Pharmacol Ther 2012;35:275–83.
2. Gisbert JP, Panes J. Loss of response and requirement of infliximab dose intensification in Crohn's disease: a review. Am J Gastroenterol 2009;104:760–7.
3. Ben-Horin S, Mazor Y, Yanai H *et al.* The decline of anti-drug antibody titres after discontinuation of anti-TNFs: implications for predicting re-induction outcome in IBD. Aliment Pharmacol Ther 2012;35:714–22.

4. Billioud V, Sandborn WJ, Peyrin-Biroulet L. Loss of response and need for adalimumab dose intensification in Crohn's disease: a systematic review. Am J Gastroenterol 2011;106:674–84.
5. Ordas I, Mould DR, Feagan BG *et al.* Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. Clin Pharmacol Ther 2012;91:635–46.
6. Roblin X, Marotte H, Rinaudo M *et al.* Association between pharmacokinetics of adalimumab and mucosal healing in patients with inflammatory bowel diseases. Clin Gastroenterol Hepatol 2014;1:80–4.
7. Paul S, Del Tedesco E, Marotte H *et al.* Therapeutic drug monitoring of infliximab and mucosal healing in inflammatory bowel disease: a prospectivestudy. Inflamm Bowel Dis 2013;19:2568–76.
8. Afif W, Loftus EV Jr, Faubion WA *et al.* Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 2010;105: 1133–9.
9. Ordas I, Feagan BG, Sandborn WJ. Early use of immunosuppressives or TNF antagonists for the treatment of Crohn's disease: time for a change. Gut 2011;60:1754–63.
10. Karmiris K, Paintaud G, Noman M *et al.* Influence of trough serum levels and immunogenicity on long-term outcome of adalimumab therapy in Crohn's disease. Gastroenterology 2009;137:1628–40.
11. Mazor Y, Koplov K, Ben Huret D. Evaluating adalimumab drug and antibody levels as predictors of clinical and laboratory response in Crohn's disease patients. J Crohn's Colitis 2013;2013:P517.
12. Imaeda H, Takahashi K, Fujimoto T *et al.* Clinical utility of newly developed immunoassays for serum concentrations of adalimumab and anti-adalimumab antibodies in patients with Crohn's disease. J Gastroenterol 2014;49:100–9.
13. Velayos FS, Sheibani S, Lockton S *et al.* In: Hepatology Ga (ed). Prevalence of antibodies to adalimumab (ATA) and correlation between ATA and low serum drug concentration on CRP and clinical symptoms in a prospective sample of IBD patients. DDW: Orlando, 2013, pp. 4–5.
14. Chiu YL, Rubin DT, Vermeire S *et al.* Serum adalimumab concentration and clinical remission in patients with Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 2013;19:1112–22.
15. West RL, Zelinkova Z, Wolbink GJ *et al.* Immunogenicity negatively influences the outcome of adalimumab treatment in Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther 2008;28:1122–6.

© 2014 by the American College of Gastroenterology

REVIEW ARTICLE

Pharmacokinetics of Adalimumab in Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review and Meta-analysis

Stephane Paul, PhD, Amelie Carla Moreau, PhD,* Emilie Del Tedesco, MD,† Melanie Rinaudo, MD, PhD,* Jean-Marc Phelip, MD, PhD,† Christian Genin, MD, PhD,* Laurent Peyrin-Biroulet, MD, PhD,‡ and Xavier Roblin, MD, PhD†*

Background: The aim of this meta-analysis was to explore the magnitude of the association between pharmacokinetics of adalimumab and clinical response in patients with inflammatory bowel disease.

Methods: A literature search was performed up to December 2013. MEDLINE, EMBASE, Cochrane, and meeting abstracts were reviewed. Studies were included if they analyzed the association of trough levels of adalimumab (TRA) or antibodies against adalimumab (AAA) with clinical response in adult or pediatric inflammatory bowel disease. A Mantel–Haenszel pooled risk estimate provided a measure of the association.

Results: Fourteen studies enrolling 1941 patients with inflammatory bowel disease were included in the systematic review. Thirteen studies analyzed clinical outcomes according to TRA. In only 1 study, there was no correlation between high TRA and clinical response. Six of the 7 studies reported a negative correlation between AAA and clinical outcomes. Six studies enrolling 536 patients (Crohn's disease [CD] only) met the meta-analysis inclusion criteria. The pooled odds ratio (OR) for loss of clinical response to adalimumab in patients with CD (N ¼ 4) with positive AAAs was 10.15 (95% confidence interval [CI]: 3.90–26.40, P , 0.0001). Patients with CD with TRA over a predefined cutoff were more likely to be in clinical remission with an OR of 2.6 (95% CI: 1.79–3.77, P , 0.0001). The association was stronger if the analysis was limited to the adult population (N ¼ 3, OR: 7.05, 95% CI: 3.58–13.9, P , 0.0001).

Conclusions: The presence of AAA is associated with a higher risk of loss of clinical response to adalimumab, whereas high TRA is associated with greater clinical response rates in CD. More data are needed in ulcerative colitis.

(Inflamm Bowel Dis 2014;0:1–8)

Key Words: inflammatory bowel diseases, adalimumab trough levels, antibodies to adalimumab, therapeutic drug monitoring, clinical response

Three anti-tumor necrosis factor (TNF) agents, namely, infliximab, adalimumab, and certolizumab pegol, are approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of refractory luminal Crohn's disease (CD).[1] Infliximab, adalimumab, and golimumab are approved by FDA for the treatment of refractory ulcerative colitis (UC).[2–5]

Measuring antibodies against anti-TNF therapy and drug trough levels are increasingly used to improve disease outcomes in inflammatory bowel diseases (IBD).[6,7] In a meta-analysis including 13 studies and 1378 patients with IBD,[8] the presence of antibodies against infliximab (ATIs) was associated with a significantly higher risk of loss of clinical response to infliximab {relative risk of loss of response of 2.2 (95% confidence interval [CI]: 0.5–9.0, P ¼ 0.3)} and lower serum infliximab levels (TRI). In a second meta-analysis including 8 studies, the presence of ATIs was associated with a higher risk of acute infusion reactions, but not delayed hypersensitivity reactions, in patients with IBD.[9] Concomitant immunomodulators use reduced this risk.[9] Based on these findings, Ordas et al[10] concluded that incorporation of therapeutic drug monitoring into clinical practice may allow clinicians to optimize treatment by maintaining effective drug concentrations over time.

Adalimumab is a fully human anti-TNF. Recently, several studies investigated the association of pharmacokinetics of adalimumab with clinical benefits in IBD.[11–18] However, some studies were of small sample size, and some of them provided conflicting results.[11,12,19]

Our aim was first to review available evidence regarding the association between pharmacokinetics of adalimumab and clinical response in IBD before conducting a meta-analysis of studies fulfilling inclusion criteria.

METHODS

Study Selection

We conducted a comprehensive computerized search for English and non-English language publications listed in the electronic databases of MEDLINE (source PUBMED, 1966 to December 2013), the Cochrane Library (Issue 12, 2013), and

Received for publication February 1, 2014; Accepted XX, XXXX.

From the *Laboratoire d'Immunologie et d'Immunomonitoring, CHU de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France; †Service de Gastrologie-Entérologie-Hépatologie, CHU de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France; and ‡Department of Gastroenterology, Inserm U954, University Hospital of Nancy, Université de Lorraine, France.

L. Peyrin-Biroulet received Lecture and/or consulting fees from MSD, Abbvie, UCB-pharma, and X. Roblin received Lecture and consulting fees from Merck, Abbvie, and Theradiag. The remaining authors have no conflicts of interest to disclose.

Reprints: Xavier Roblin, MD, PhD, Department of Gastroenterology, CHU de Saint-Etienne, Saint-Etienne 42023, France (e-mail: xavier.roblin@chu-st-etienne.fr).

Copyright © 2014 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc.

DOI 10.1097/MIB.0000000000000037

Published online.

EMBASE (1980 to December 2013). We searched and combined the following terms: "drug monitoring, inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, adalimumab, drug level, antibodies, outcomes, treatment response, impact of drug level, impact of antibody formation."

We also hand-searched abstracts from the annual meetings of Digestive Disease Week and the United European Gastroenterology Week between 2005 and 2013, as well as references from review articles, meta-analysis studies, and published randomized controlled trials so as to identify additional articles. Authors of identified studies and pharmaceutical companies were also contacted to retrieve missing or unpublished data.

Studies were selected based on the title and/or the abstract by 2 researchers (A.C.M. and X.R.). The reviewers checked whether inclusion and exclusion criteria were met and, in the event of uncertainty, the full text of articles was retrieved and reviewed. To be included in the systematic review, the focus of the study had to be the reporting of clinical response under ADA. We included all studies (controlled trials, observational studies, and cohort studies) that reported antibodies against adalimumab (AAA) and/or trough levels of adalimumab (TRA) and clinical outcomes in patients with IBD who were treated with AU6 adalimumab. Where AAA was studied, the primary outcome measure was the loss of response, defined as relapse of clinical symptoms in patients who were in clinical remission from, or had responded to, ADA. No prespecified score was used to determine this outcome, as we expected there would be no universal definition of the outcome across the studies. Where TRA were studied, the primary outcome measure was clinical response.

Studies were excluded if they (1) were review articles, (2) the population presented was non-IBD patients, (3) did not measure either TRA or AAA, (4) did not report clinical outcomes, and (5) were studies using other anti-TNFs (infliximab or certolizumab). If there was any suspicion of a duplicate study, the most recent study with the largest cohort was considered for inclusion.

There were additional inclusion criteria for the meta-analysis. Studies were included if they reported clinical outcomes according to AAA status or TRA with a predefined cutoff, thus allowing the construction of 2 · 2 tables.

Outcome Assessment

Outcome measures were defined a priori. The efficacy end points were clinical remission, absence of flare-up, deep remission, or normalization of C-reactive protein (CRP). The definition AU7 of clinical activity varied across studies (Table 2).

Data Extraction

Data abstraction was carried out independently by 2 investigators (A.C.M. and X.R.) using standardized data collection forms. If needed, authors were contacted regarding specific questions relating to their study. The independent reviewers conferred after data extraction was complete, discrepancies were identified, and review of the relevant article with a third author (S.P.) led to consensus.

The following data were retrieved where possible: journal, year, author, number of patients in the study, method of selection of cohorts, drug regimen, assay type used to measure TRA and/or AAA, numbers of AAA-positive and AAA-negative patients, numbers of TRA over the cutoff and under the cutoff, methods of measurement of clinical outcomes, and reporting of outcomes used.

Assessment of quality of randomized controlled trials and observational studies was performed using The GRADE (Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation) criteria.[20] For observational studies, methodological quality was assessed by determining the eligibility criteria, degree of measurement of both exposure and outcome, control for confounders, and completeness of follow-up.[21]

Data Synthesis and Statistical Analysis

The primary goal of the meta-analysis was to assess the association between AAA or ADA trough levels and clinical remission in patients with IBD. Secondary objectives were to evaluate whether or not the association was influenced by differences in study design such as the presence of a selection and/or information bias. A Mantel–Haenszel pooled risk estimate provided a measure of that association.

Raw data from included studies (absolute numbers) were used to construct 2 · 2 contingency tables, and unadjusted pooled odd ratios (ORs) with 95% CIs were calculated using Review Manager (RevMan 5.1; Nordic Cochrane Centre, Copenhagen, Denmark) for dichotomous outcomes. Forest plots and funnels plots were generated using R version 3.0.2 (R, University of Auckland, Auckland, New Zealand). The Q test was used to assess for heterogeneity and I2 statistic to quantify the percentage of heterogeneity because of between-study variations; a value of P , 0.10 was considered statistically significant.[22] Any heterogeneity identified prompted subgroup analysis in an attempt to explain these findings. If needed, a random effects model by DerSimonian and Laird[23] was used to account for variations between studies and gives a more conservative pooled estimate in case where heterogeneity between studies could not be explained. A funnel plot was AU8 generated and checked for evidence of asymmetry, and therefore possible publication bias or other small study effects, using the Egger's test, a P value ,0.10 was regarded as significant.[24]

Sensitivity analyses were performed for all outcomes where 3 or more studies were included. Sensitivity analysis included sensitivity based on individual studies, sample size, drug regimen, length of the study, outcome measure, and drugs used in the control arm. Significance levels were set at a P value of ,0.05.

RESULTS

Systematic Review of the Association Between Pharmacokinetics of Adalimumab and Clinical Benefit

Database searches identified 499 references, and 14 articles were included in the systematic review (Fig. 1): 11 studies in CD, F1 2 in UC,[3,25] and 1 included both CD and UC patients[12] (Table 1). T1

AU1

Two studies included patients with pediatric CD.[13,26] Twelve studies included adult patients with IBD.[3,11,12,14–19,25,27,28]

Six studies evaluated disease activity in patients on adalimumab treatment according to TRA and AAA,[11,12,14–16,28] 7 studies analyzed disease activity according to TRA with no reported data on AAA,[3,13,17–19,25,26] and 1 study analyzed disease activity according to AAA without data on TRA.[27]

Four randomized controlled trials,[3,18,19,26] 4 prospective cross-sectional studies,[12,14–16] 5 observational studies,[11,13,17,25,28] and 1 retrospective study[17] were included in the systematic review. A quiescent disease was defined by clinical remission in 10 studies[11–16,18,19,25,28] by CRP normalization in 1 study,[14] by deep remission defined by a clinical remission and CRP normalization[17] in 1 study, and 1 study evaluated clinical response after ADA dose escalation.[25] One study analyzed the correlation between clinical response and AAA without data on TRA in CD.[27]

Pediatric Versus Adult Studies

Two pediatric studies (N ¼ 326) included only CD patients.[13,26] In both studies, there was an increased rate of remission and response among patients with TRA above the median concentration.[13,26] No data about AAA were reported in these 2 studies.[13,26] In the adult population (N ¼ 1615 IBD patients), there was a correlation between high TRA and clinical response in all 11 studies[3,11,12,14–18,25,28] except the study by Chiu et al[19] (Table 1).

AU9

Crohn's Disease Versus Ulcerative Colitis

Two studies included only UC patients[3,25] and 1 combined UC and CD patients.[12] All 3 studies found an association between TRA and clinical response, even though no statistical comparison was performed in the one by Sandborn et al[3] Ferrante et al[25] analyzed TRA after adalimumab dose escalation, and Roblin et al[12] analyzed the association between TRA and clinical remission by pooling UC and CD. Ten CD[11,13–19,26,28] studies looked at the association between TRA and clinical response. Only 1 study reported no increased rate of clinical response among CD patients with higher TRA.[19]

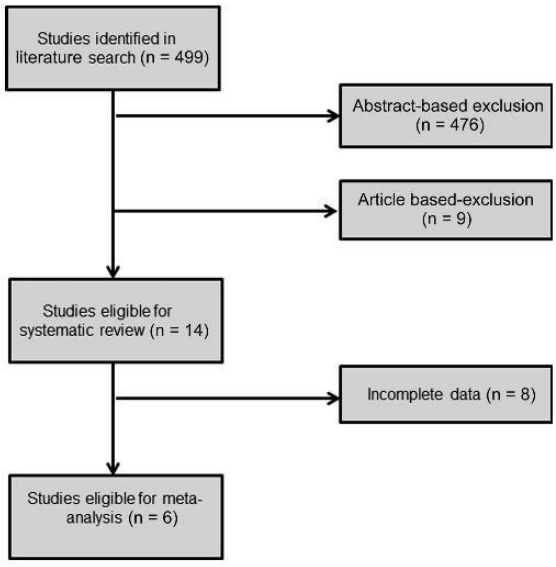


FIGURE 1. Flow chart of study selection.

Identification of an Optimal Cutoff for TRA for Predicting Clinical Remission

ROC curve was used to identify the optimal cutoff for TRA for predicting clinical remission in 7 studies.[11,12,14–16,18,19] A cut-off value was identified in 4 studies, ranging from 4.8 to 5.9 mg/mL.[12,14–16] For Karmiris et al,[11] patients who had TRA ,0.33 mg/mL at least once (sensitivity, 95%; positive predictive value, 81%) demonstrated significantly less sustained clinical benefit than patients never showing such low trough serum concentration (log-rank test; P , 0.01).

AU10

Impact of Concomitant Immunosuppressive Treatment

In 4 studies[11,12,18,19] where the authors analyzed the impact of concomitant immunosuppressive therapy on disease outcome, it did not affect treatment efficacy and did not influence TRA.[11,12,18,19] However, time to ADA dose escalation was longer under combination therapy (17 weeks versus 12 weeks; P ¼ 0.008).[8] Chiu et al[7] reported higher but not significantly different TRA at weeks 24 and 56 among patients on combination therapy.

AU11

Impact of Antibodies Against Adalimumab on Disease Outcomes

Nine studies investigated so far the percentage of positive AAA among ADA-treated IBD patients,[11,12,14–16,18,19,27,28] 7 studies[11,12,14–16,27,28] have been published as full-length papers and all of them included only adult patients. The percentage of positive AAA varied between 0.04% and 35%.[11,12,14–16,18,19,27,28] Differences between available assays and differing methodologies may explain these variations. Almost all studies reported a negative correlation between AAA levels and TRA.[11,12,14–16,27,28] Six of the 7 studies found a negative correlation between AAA and clinical outcomes (5 with clinical disease activity[11,12,15,16,27] and 2 with CRP levels).[14,15] These results were not confirmed in 1 study.[28] Concomitant immunosuppressive therapy did not affect treatment outcome and did not influence AAA formation.[11,12,16,27]

Meta-analysis of the Association Between Pharmacokinetics of Adalimumab and Clinical Benefit

Of the 14 studies selected and included in the systematic review, only 6 studies met the inclusion criteria and were included in the meta-analysis.[12–14,16,26,27]

Three studies evaluated both TRA and AAA,[12,14,16] 2 only TRA,[13,26] and 1 study only AAA.[27] Four of 6 studies[12,14,16,27] included adult patients and 2 enrolled only pediatric patients.[13,26] Half of the included studies were prospective trials,[12,13,26] and the other ones were of retrospective nature.[14,16,27] The primary

TABLE 1. Published Studies or Abstracts in Adults or Children on Adalimumab Trough Levels and Antibodies Against Adalimumab in CD and UC

AU21
AU22

Publications	Year	Study Design	Population	Regimen	Follow-up	Impact of TRA in Clinical Response
Karmiris et al	2009	Observational	168 CD	ADA induction: 160/80 (N ¼ 126), 80/40 (N ¼ 28); maintenance: 40 eow or ew	Median, 20.4 (11.7–30) mo	ADA cont. versus discont. TRA: W2, 10.4 versus 6.5 (P ¼ 0.02); W12, 9.3 versus 5.6 (P ¼ 0.02); W24, 9.9 versus 5.3 (P ¼ 0.04)
Hanauer et al (Classic 1 trial)	2006	Randomized, double-blind, placebo-controlled	299 CD	ADA: 40/20 80/40, 160/80	4W	TRA clinical remission versus no remission higher 8.1 versus 5.05 (P ¤ 0.05)
Chiu et al Classic 1/2	2013	Randomized, double-blind, placebo-controlled	276 CD	ADA: 40 eow; if flare: 40 ew	56W	Clinical remission versus no TRA: W4, 5.42 versus 4.98 (P ¤ 0.05); W24, 8.83 versus 5.82 (P ¤ 0.05); W56, 9.37 versus 7.84 (P is nonsignificant)
Mazor et al	2013	Cross-sectional	71 CD	Maintenance 40 mg eow	NR duration of ADA: 9.8 mo	Correlation TRA/CR
Roblin et al	2013	Cross-sectional	40 IBD (22 CD)	Induction: 160/80; maintenance: 40 eow; if flare: 40 ew	NR duration of ADA 10.7 mo	TRA higher in clinical remission versus no 6.02 versus 3.2 (P ¼ 0.012)
Imaeda et al	2013	Cross-sectional	40 CD	Maintenance	NR	Correlation TRA/CRP
Bodini et al	2012	Prospective open label	22 CD	Maintenance	2 yr	TRA higher without flare 6.7 versus 2.1 (P ¤ 0.01)
Velayos et al	2013	Cross-sectional	54 IBD (52 CD)	Maintenance	NR	TRA associated with no active disease versus active disease (P ¼ 0.01)
Dastrich et al	2011	Open label	48 CD patients	ADA 40 eow on maintenance	NR	Primary analysis deep remission TRA . 2 mg/mL; 84% with deep remission versus 70.8% without deep remission
Pradhan et al	2013	Open label (pediatric patients)	181 CD patients	ADA induction phase 160/80 or 80/40 based on body weight	4W	W4 response and remission rates were higher in patients with TRA above median
Sharma et al	2013	Double-blind maintenance phase (pediatric patients)	145 CD	High dose based on body weight 40 mg or 20 mg eow low dose: 20 mg or 10 mg eow	52W	Increase of rate of remission and response at W26 and 52 with TRA above the median concentration
Sandborn et al	2012	Randomized, double-blind, control study	517 UC	Adalimumab induction 160/80; maintenance: 40 mg eow versus placebo	W52	TRA at W8 and W52 higher in patients with clinical response under ADA
Ferrante et al	2011	Open label	50 UC	ADA induction 160/80; maintenance: 40 mg eow		TRA after escalation successful of escalation associated with increase of TRA (P ¼ 0.023)
West et al	2008	Retrospective study	30 CD	ADA induction 160/80; maintenance: 40 eow or ew	Median ¼ 318 d	NR

TABLE 1 (*Continued*)

Publications	Impact of Current IS	Threshold Value of TRA	Positive AAA (%)	Impact of AAA	Impact of Current IS
Karmiris et al	24% at baseline: no clinical impact or TRA impact time to dose escalation longer 17 versus 12W (P ¼ 0.008)	TRA , 0.33: less clinical benefit (Sen ¼ 95%, PPV ¼81%)	9.2	Almost all patients (91.6%) displaying AAA had very low TRA and need to stop adalimumab	Do not increase AAA development
Hanauer et al (Classic 1 trial)	31% during study	No TRA threshold AUROC for clinical remission 0.54–0.62	0.04	NR	NR
Chiu et al Classic 1/2	No clinical or TRA impact N ¼ 93, TRA higher with current IS (P - 0.5) W24: 8.01 versus 5.96 W56: 8.62 versus 6.51	No TRA threshold	2.6	NR	NR
Mazor et al		TRA cutoff for prediction of clinical remission 5.85 (Sen ¼ 68%, Spe ¼ 70%, LHR: 2.3)	30.5% 12.7% for AAA . 3 mg/mL-eq	AAA inversely correlated with TRA (r ¼0.4111, P , 0.001 AAA positively related with disease activity (P , 0.001)	No impact on AAA
Roblin et al	12.5% no clinical or pharmacological relevant	TRA cut-off for prediction of CR 4.85 mg/mL (Sen ¼ 81%, Spe ¼ 67%, LHR ¼ 2.5)	22.5	AAA associated with clinical remission (LHR: 0.91; P ¼ 0.012)	No impact on AAA
Imaeda et al		TRA cutoff for prediction of normal CRP, 5.9	35	Negative correlation with TRA and with CRP	NR
Bodini et al	NR	Not done	9	No impact on TRA and outcomes	NR
Velayos et al	NR	TRA cut-off associated with CRP - 5 (P ¼ 0.001)	22.3	Positive AAA associated with elevated CRP (P ¼ 0.002); correlated with more active disease (P ¼ 0.01)	NR
Dastrich et al	NR	NR	NR	NR	NR
Pradhan et al	NR	NR	NR	NR	NR
Sharma et al	NR	NR	NR	NR	NR
Sandborn et al	NR	NR	NR	NR	NR
Ferrante et al	NR	NR	NR	NR	NR
West et al	NR	NR	17	AAA associated to nonresponse to ADA (OR ¼ 13.1; P ¼ 0.006)	AAA less frequent (7.7%) when ADA is used in combotherapy, compared with monotherapy (20%), P - 0.5

outcome measure was clinical remission,[12,13,26] clinician's global assessment,[16,27] or biologic parameters such as CRP level.[14]

T2 Characteristics of the studies are summarized in Table 2. All included studies except 2 controlled trials[13,26] had a high risk of bias. We first selected an article presenting post hoc analysis from the CLASSIC I and II trials.[19] We contacted the authors to request further information, but could not gain access to the data, and this paper was thus excluded from our analysis.[19] As 5 of the 6 included studies did not involve patients with UC, only CD studies were included in the meta-analysis.

Adalimumab Trough Levels

Five studies were included in the overall analysis[12–14,16,26] enrolling 459 patients with CD. Patients with TRA over a predefined cutoff (4.85–5.9 mg/mL) were twice more likely to be in remission as compared with patients with TRA under this cutoff, with an OR of 2.6 (95% CI: 1.79–3.77, P , 0.0001). As heterogeneity existed between studies, 2 distinct meta-analyses were performed as the source of heterogeneity could be identified by separating studies evaluating adult patients[12,14,16] from those evaluating pediatric population[13,26] (N studies ¼ 3 and 2, F2 respectively; Fig. 2). The association was stronger if the analysis was limited to the adult population (n ¼ 133) as compared with pediatric studies (n ¼ 326). Visual inspection of funnel plot asymmetry showed no indication of publication bias. Both Begg's and Egger's tests were performed, the latter one indicated a tendency toward publication bias (P ¼ 0.33 and 0.10, respectively). This could be explained by the absence of small trials with inconclusive results. To check if our results were robust, a sensitivity analysis was performed, excluding each study individually to determine whether there was any effect on heterogeneity or an impact on ORs: the exclusion of each study individually did not significantly modified the pooled ORs (pooled ORs ranging from 2.13 to 3.30).

Adalimumab Antibodies

Four studies were included in the overall analysis,[12,14,16,27] enrolling 163 CD patients. No studies evaluated AAA impact on clinical remission in pediatric patients. Three studies used the same ELISA method of measurement,[12,14,16] the last one[27] used an old radioimmunoassay. The cutoff of AAA ranged from 1.12 to 3 mg/mL in these 4 studies. The pooled OR for loss of clinical response to adalimumab in CD patients with AAAs was 10.15 (95% CI: 3.90–26.40, P , 0.0001) when compared with patients without AAAs. There was no heterogeneity among F3 studies (Fig. 3; P ¼ 0.65). Visual inspection of funnel plot asymmetry showed no indication of publication bias. Both Begg's and Egger's tests were performed confirming the absence of publication bias (P ¼ 0.17 and 0.49, respectively). We next performed a sensitivity analysis excluding each study individually to determine whether there was any effect on heterogeneity or an impact on ORs. In all cases, the exclusion of each study individually did not modify the pooled ORs (pooled ORs ranging from 8.87 to 13.23).

AU23

TABLE 2. Characteristics of the Studies in the Meta-analysis

Study	Year	N	Population	Methodology	Remission Definition	Cut-off TRA (mg/mL)	TRA Assay Type	Cut-off AAA (mg/mL)	AAA Assay Type
West et al	2008	30	Adult	Retrospective	Clinician's assessment	/	/	Pos/neg	RIA
Imaeda et al	2014	40	Adult	Retrospective	CRP	5.9	ELISA	1.12	ELISA
Mazor et al	2013	71 (118 samples)	Adult	Retrospective	Clinician's assessment	5.85	ELISA	3	ELISA
Pradhan et al	2013	181	Pediatric	Prospetive	PCDAI	Median	NA	/	/
Roblin et al	2014	22	Adult	Prospective	CDAI	4.85	ELISA	3	ELISA
Sharma et al	2013	145	Pediatric	Prospective	PCDAI	Median	NA	/	/

AU24

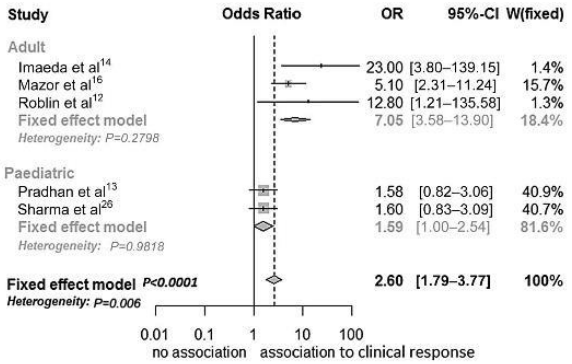


FIGURE 2. Forest plot of clinical response according to patients' TRA over a predefined cutoff (4.85–5.9 mg/mL).

DISCUSSION

Pharmacokinetics of anti-TNF therapy has important implications for patient management in IBD. Indeed, loss of response is frequent.[29,30] Four anti-TNF agents are approved by FDA for the treatment of refractory IBD, namely infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, and golimumab. Recently, some systematic reviews were published on the clinical utility of measuring infliximab trough levels and ATIs in IBD.

We conducted the first systematic review and meta-analysis on the association of pharmacokinetics of adalimumab and clinical benefit in IBD.

In our meta-analysis, the presence of AAA is associated with a significantly higher risk of loss of clinical response to adalimumab. High TRA are associated with clinical response in patients with CD. It is noteworthy that this association was stronger if the analysis was limited to the adult population with CD.

There are several strengths to this meta-analysis. First we conducted a systematic review to identify trials of interest. Furthermore, 489 patients were included. Finally, there is no publication bias, and source of heterogeneity in between-studies could be AU12 resolved by including only adult studies in a sensitivity analysis.

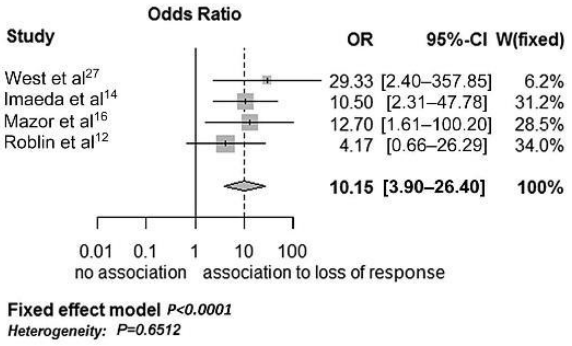


FIGURE 3. Forest plot of meta-analysis of "loss or response" according to patients' AAA status.

This meta-analysis has some limitations. First, high risk of bias was present in the majority of included studies as 3 of the 6 were retrospective studies[14,16,27] and only 2 controlled trials were conducted so far.[13,26] Published studies on this topic lack uniform reporting of outcomes and cutoff. Finally, our analysis was restricted to patients with CD as only 1 study[12] evaluated the impact of TRA and AAA on clinical response in UC. Overall, our results are comparable to data about the association of TRI and ATI and risk of loss of response to infliximab.

Our meta-analysis could not analyze the impact of concomitant immunosuppressive therapy on disease outcome under adalimumab and their influence on TRA and AAA. We reported, however, that in 4 studies[11,12,18,19] where the authors analyzed the impact of concomitant immunosuppressive therapy on disease outcome, it did not affect treatment efficacy and did not influence TRA.[11,12,18,19] However, time to ADA dose escalation was longer under combination therapy (17 weeks versus 12 weeks; $P = 0.008$).[11] Chiu et al[19] reported higher but not significantly different TRA at weeks 24 and 56 among patients on combination therapy. Randomized controlled trials addressing this issue are eagerly awaited.

Interestingly, a cut-off value was identified in 4 studies, ranging from 4.8 to 5.9 mg/mL, whatever the method of measurement (3 ELISA different methods[12,14,16] and 1 HMSA method).[15] This cut-off value was finally comparable between these studies. In 1 study,[11] patients with TRA ,0.33 mg/mL at least once during follow-up (sensitivity = 95%, positive predictive value = 81%) demonstrated significantly less sustained clinical benefit than those showing such low TRA (log-rank test; $P = 0.01$). However, these findings should be interpreted cautiously because of small sample size ($n = 16$).

Importantly, the percentage of positive AAA varied strongly across studies between 0.04% and 35%.[11,12,14–16,18,19,27,28] Differences between available assays, differing methodologies, and duration of follow-up may explain such discrepancy between studies. Almost all studies reported a negative correlation between AAA levels and TRA.[11,12,14–16,27,28] Data are scarce on the association between AAA and intolerance to ADA. Karmiris et al[11] concluded that side effect and injection site reaction were not explained by the presence of AAA. In a recent meta-analysis including 8 studies, the presence of ATIs was associated with a higher risk of acute infusion reactions, but not delayed hypersensitivity reactions, in patients with IBD.[9] Concomitant immunomodulators reduced this risk.[9] More date are needed for adalimumab before drawing definite conclusions.

In conclusion, similarly to infliximab, we could demonstrate that patients with TRA over a predefined cutoff were 2 times more likely to be in remission compared with patients with TRA under the cutoff, with an OR of 2.6. Moreover, the pooled OR of loss of clinical response to adalimumab in patients with AAAs was 10.15 when compared with patients without AAAs in CD. Data are scarce in UC. Randomized controlled trials are AU13 awaited to further explore the clinical utility of measuring pharmacokinetics of adalimumab in IBD. AU14

REFERENCES

1. Peyrin-Biroulet L, Deltenre P, de Suray N, et al. Efficacy and safety of tumor necrosis factor antagonists in Crohn's disease: meta-analysis of placebo-controlled trials. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2008;6:644–653.
2. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med.* 2005;353: 2462–2476.
3. Sandborn WJ, van Assche G, Reinisch W, et al. Adalimumab induces and maintains clinical remission in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2012;142:257–265.
4. Sandborn WJ, Feagan BG, Marano C, et al. Subcutaneous golimumab induces clinical response and remission in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2014;146:85–95.
5. Sandborn WJ, Feagan BG, Marano C, et al. Subcutaneous golimumab maintains clinical response in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2014;146:96–109.
6. Colombel JF, Feagan BG, Sandborn WJ, et al. Therapeutic drug monitoring of biologics for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18:349–358.
7. Lichtenstein GR. Letter from the editor. *Gastroenterol Hepatol (N Y).* 2013;9:67.
8. Nanda KS, Cheifetz AS, Moss AC. Impact of antibodies to infliximab on clinical outcomes and serum infliximab levels in patients with inflammatory bowel disease (IBD): a meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2013;108: 40–47; quiz 48.
9. O'Meara S, Nanda KS, Moss AC. Antibodies to infliximab and risk of infusion reactions in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis.* 2014;20:1–6.
10. Ordas I, Feagan BG, Sandborn WJ. Therapeutic drug monitoring of tumor necrosis factor antagonists in inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2012;10:1079–1087; quiz e85–e86.
11. Karmiris K, Paintaud G, Noman M, et al. Influence of trough serum levels and immunogenicity on long-term outcome of adalimumab therapy in Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2009;137:1628–1640.
12. Roblin X, Marotte H, Rinaudo M, et al. Association between pharmacokinetics of adalimumab and mucosal healing in patients with inflammatory AU15 bowel diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014;12:80–84.
13. Pradhan RS, Sharma S, Thakkar R. Relationship between adalimumab concentrations and efficacy for the induction of clinical remission in pediatric patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2013;144:230–231.
14. Imaeda H, Takahashi K, Fujimoto T, et al. Clinical utility of newly developed immunoassays for serum concentrations of adalimumab and anti-adalimumab AU16 antibodies in patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol.* 2014;49:100–109.
15. Velayos FS, Sheibani S, Lockton S, et al. Prevalence of antibodies to adalimumab (ATA) and correlation between ATA and low serum drug concentration on CRP and clinical symptoms in a prospective sample of IBD patients. In: *Hepatology.* Orlando, FL: DDW; 2013:4–5. AU17
16. Mazor Y, Koplov K, Ben Huret D. *Evaluating Adalimumab Drug and Antibody Levels as Predictors of Clinical and Laboratory Response in Crohn's Disease Patients.* ECCO; 2013:P517. AU18
17. Dastrich P, Kozeluhova J, Bortlik M, et al. Infliximab but not adalimumab serum trough level is a useful predictor of deep remission in patients with Crohn's disease. *Gut.* 2011;60. AU19
18. Hanauer SB, Sandborn WJ, Rutgeerts P, et al. Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. *Gastroenterology.* 2006;130:323–333; quiz 591.
19. Chiu YL, Rubin DT, Vermeire S, et al. Serum adalimumab concentration and clinical remission in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19:1112–1122.
20. Guyatt G, Oxman AD, Akl EA, et al. GRADE guidelines: 1. Introduction-GRADE evidence profiles and summary of findings tables. *J Clin Epidemiol.* 2011;64:383–394.
21. Guyatt GH, Oxman AD, Vist G, et al. GRADE guidelines: 4. Rating the quality of evidence: study limitations (risk of bias). *J Clin Epidemiol.* 2011;64:407–415.
22. Higgins JP, Altman DG, Gotzsche PC, et al. The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials. *BMJ.* 2011;343: d5928.
23. DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials.* 1986;7:177–188.
24. Egger M, Davey Smith G, Schneider M, et al. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ.* 1997;315:629–634.
25. Ferrante M, Karmiris K, Compernolle G, et al. *Efficacy of ADA in Patients with UC: Restoration of Serum Levels After Dose Escalation Results in a Better Long Outcome.* Stockolm, Sweden: UEGW; 2011:OP312.
26. Sharma S, Pradhan R, Thakkar R. Relationship between adalimumab concentration and efficacy for the maintenance of clinical remission in pediatric patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gastroentrology.* 2013; 144:231. AU20
27. West RL, Zelinkova Z, Wolbink GJ, et al. Immunogenicity negatively influences the outcome of adalimumab treatment in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008;28:1122–1126.
28. Bodini G, Savarino V, Fazio V, et al. Relationship between drug serum concentration and clinical activity in patients with CD who achieved remission with adalimumab: a prospective study. In: *Gastroenterology.* San Diego, CA: DDW; 2012:S388.
29. Gisbert JP, Panes J. Loss of response and requirement of infliximab dose intensification in Crohn's disease: a review. *Am J Gastroenterol.* 2009; 104:760–767.
30. Billioud V, Sandborn WJ, Peyrin-Biroulet L. Loss of response and need for adalimumab dose intensification in Crohn's disease: a systematic review. *Am J Gastroenterol.* 2011;106:674–684.

Downloaded from http://ard.bmj.com/ on June 5, 2015 - Published by group.bmj.com

The antibody response against human and chimeric anti-TNF therapeutic antibodies primarily targets the TNF binding region

M Rinaudo-Gaujous, X Roblin, H Marotte and S Paul

Ann Rheum Dis published online March 23, 2015

Updated information and services can be found at:
http://ard.bmj.com/content/early/2015/03/22/annrheumdis-2015-207503

These include:

References This article cites 9 articles, 4 of which you can access for free at:
http://ard.bmj.com/content/early/2015/03/22/annrheumdis-2015-207503#BIBL

Email alerting service Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Notes

To request permissions go to:
http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions

To order reprints go to:
http://journals.bmj.com/cgi/reprintform

To subscribe to BMJ go to:
http://group.bmj.com/subscribe/

Downloaded from http://ard.bmj.com/ on June 5, 2015 - Published by group.bmj.com

ARD Online First, published on March 23, 2015 as 10.1136/annrheumdis-2015-207503

The antibody response against human and chimeric anti-TNF therapeutic antibodies primarily targets the TNF bindingregion

We read with a great interest the report by Van Schie *et al*[1] which highlighted that the antibody response against human and chimeric anti-TNF therapeutic antibodies primarily targets the TNF binding region. The results described in this report confirm very clearly the results that we obtained recently.

This study adds to the one we performed, which shows the neutralising capacity of antidrug antibodies (ADAs) against infliximab (IFX) in patients with inflammatory bowel disease (IBD) treated by IFX. We assessed ADAs' biological activity by a functional assay using a reporter HEK-Dual TNF cell line developed for TNF detection (InvivoGen). Briefly, sera of patients with IBD were first incubated with various amounts of IFX (from 0.1mg/mL to 5 mg/mL), then with recombinant tumour necrosis factor (TNF) (10 ng/mL, R&D Systems), and then deposed in wells with HEK-Dual TNF cells. In parallel, ADA levels were measured by ELISA assay (Lisa Tracker, Theradiag). For ADA levels higher than 50 ng/mL in ELISA, activation of HEK-Dual TNF cells was observed for higher concentrations of IFX (figure 1A). A good correlation was noticed between ADA levels in ELISA and activation of HEK-Dual TNF cells estimating residual TNF in the mixt of sera with IFX and exogenous TNF, demonstrating the capacity of ADAs to block IFX bioactivity (figure 1A). Using the same assay, IFX activity was secondarily evaluated in 119 sera from 44 patients with IBD treated with IFX. Presence of detectable IFX in ELISA was a good surrogate marker of its bioactivity in patients with IBD (figure 1B). Moreover, in the presence of ADAs in ELISA, no biological IFX was detected in these sera with our functional assay (figure 1C). To sum up, both assays were similar for IFX and ADAs detection in patients with IBD, proving their respective bioactivity.

The results obtained in this report are consistent with clinical data already published. In fact, several studies have reported an association between ADA production and reduced levels of TNF blockers.[2–4] This association can be partially explained by an increased drug clearance secondarily to the formation of immune complexes between ADAs and anti-TNF.[5] Clinically, the presence of ADAs is associated with a significantly higher risk of loss of clinical response to IFX,[6 7] reinforcing ADAs importance in terms of interference with drug action.

In conclusion, ADAs interest is increasing as many clinical and physiological studies have shown their importance in drug activity. As the majority of ADAs are neutralising, their monitoring during TNF blocker treatment seems to be highly relevant. More algorithms must be developed[8 9] regarding drug characteristics and the assay used for drug and ADA determination.

M Rinaudo-Gaujous,[1] X Roblin,[2] H Marotte,[3] S Paul[1]

[1]Laboratoire d'Immunologie et d'immunomonitoring, CIC INSERM 1408, GIMAP EA3064, CHU de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France
[2]Service de Gastro-Entérologie-Hépatologie, CHU de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France
[3]INSERM1059/LBTO, Université Jean Monnet, Université de Lyon and Rheumatology department, CHU de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France

Correspondence to Dr Stéphane Paul, Department of Immunology, CHU Saint-Etienne, Saint-Etienne 42023, France; stephane.paul@chu-st-etienne.fr

Contributors MR-G, XR, HM, SP have performed the experiment and contributed to the redaction of the letter.

Competing interests None.

Provenance and peer review Not commissioned; internally peer reviewed.

To cite Rinaudo-Gaujous M, Roblin X, Marotte H, *et al*. *Ann Rheum Dis* Published Online First: [*please include* Day Month Year] doi:10.1136/annrheumdis-2015-207503

Received 25 February 2015
Accepted 28 February 2015

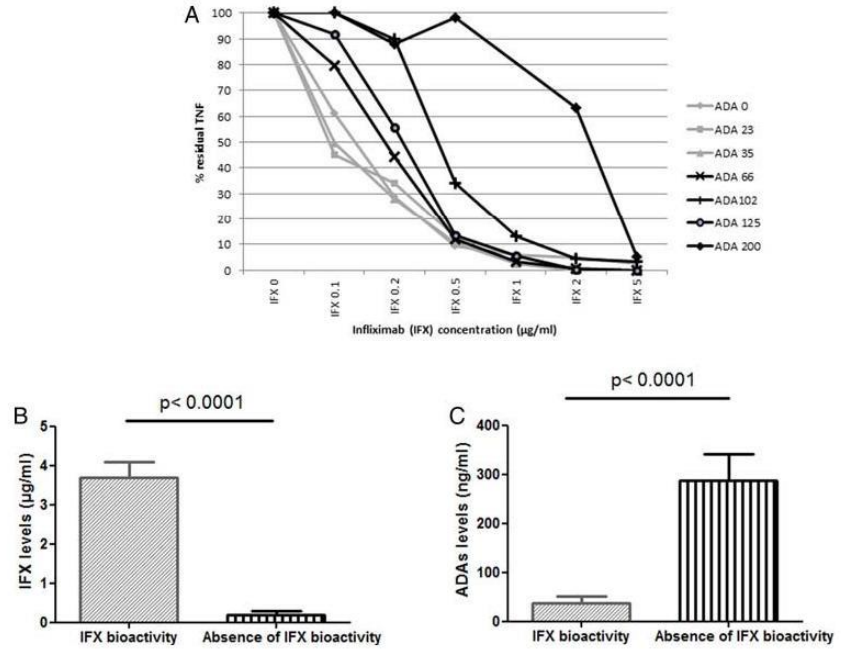


Figure 1 Evaluation of ADAs and IFX bioactivity in patients with IBD treated with IFX using a functional test.
(A) Neutralising capacity of ADAs in patients with IBD (ADAs concentration expressed in mg/mL). Residual TNF represents the quantity of recombinant TNF added not blocked by IFX.
(B) Relation between IFX levels in ELISA and its bioactivity (C) Correlation between ADAs level and IFX bioactivity. ADAs, antidrug antibodies; IBD, inflammatory bowel disease; IFX, infliximab.

Copyright Article author (or their employer) 2015. Produced by BMJ Publishing Group Ltd (& EULAR) under licence.

Downloaded from http://ard.bmj.com/ on June 5, 2015 - Published by group.bmj.com

Correspondence

Ann Rheum Dis 2015;0:1–2. doi:10.1136/annrheumdis-2015-207503

REFERENCES

1 Van Schie KA, Hart MH, de Groot ER, *et al*. The antibody response against human and chimeric anti-TNF therapeutic antibodies primarily targets the TNF binding region. *Ann Rheum Dis* 2015;74:311–14.
2 Zitomersky NL, Atkinson BJ, Fournier K, *et al*. Antibodies to infliximab are associated with lower infliximab levels and increased likelihood of surgery in pediatric IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2015;21:307–14.
3 Warman A, Straathof JWA, Derijks LJJ. Therapeutic drug monitoring of infliximab in inflammatory bowel disease patients in a teaching hospital setting: results of a prospective cohort study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2015;27:242–8.
4 Pallagi-Kunstár É, Farkas K, Szepes Z, *et al*. Utility of serum TNF-α, infliximab trough level, and antibody titers in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol WJG* 2014;20:5031–5.
5 Rojas JR, Taylor RP, Cunningham MR, *et al*. Formation, distribution, and elimination of infliximab and anti-infliximab immune complexes in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;313:578–85.
6 Radstake TRDJ, Svenson M, Eijsbouts AM, *et al*. Formation of antibodies against infliximab and adalimumab strongly correlates with functional drug levels and clinical responses in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1739–45.
7 Nanda KS, Cheifetz AS, Moss AC. Impact of antibodies to infliximab on clinical outcomes and serum infliximab levels in patients with inflammatory bowel disease (IBD): a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2013;108:40–7.
8 Garcês S, Antunes M, Benito-Garcia E, *et al*. A preliminary algorithm introducing immunogenicity assessment in the management of patients with RA receiving tumour necrosis factor inhibitor therapies. *Ann Rheum Dis* 2014;73:1138–43.
9 Roblin X, Rinaudo M, Del Tedesco E, *et al*. Development of an algorithm incorporating pharmacokinetics of adalimumab in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 2014;109:1250–6.

Résultats et discussion

L'intérêt du dosage du taux résiduel d'anti-TNF et d'ADAs a d'abord été évalué pour l'infliximab sur 2 cohortes prospectives de patients atteints de MICI. Une première cohorte, incluant 55 patients atteints d'une MC et 48 de RCH, a permis de confirmer que les taux résiduels d'infliximab étaient significativement plus élevés chez les patients en rémission clinique pour la MC (2.2 µg/mL vs. 0.8 µg/mL pour les patients avec une maladie active; $p < 0.0001$) et la RCH (1.9 vs. 0.9 µg/mL; $p = 0.01$). Un seuil d'infliximab résiduel de 2 µg/ml a pu être établi pour différencier les patients en rémission clinique avec une sensibilité de 76% et une spécificité de 82.3% pour les 2 pathologies. Concernant les ADAs, leur taux était à l'inverse plus bas chez les patients en rémission clinique par rapport aux patients présentant une maladie active. Le seuil de 200 ng/ml d'ADAs pourrait discriminer les répondeurs des non-répondeurs avec une bonne spécificité analytique (93.5%) malgré une faible sensibilité (22%). L'intérêt de ces seuils a été confirmé sur une deuxième cohote de 52 patients MICI ayant bénéficiés d'une optimisation de dose. En effet, l'optimisation permettait d'atteindre la rémission clinique chez les patients présentant un taux d'infliximab < 2 µg/ml sans ADAs, à l'inverse des patients ayant développés des ADAs > 200 ng/ml. La cicatrisation muqueuse n'était obtenue en majorité que chez des patients ayant un taux d'infliximab < 2 µg/ml avec des ADAs <200 ng/ml avant optimisation.

Ces résultats ne sont cependant pas extrapolables d'une technique à l'autre. En effet, les différentes techniques employées pour le dosage de l'infliximab et de ses anticorps (RIA, ELISA, HMSA, test cellulaire) sont généralement comparables pour déterminer si la présence d'infliximab est détectable dans l'échantillon. Par contre, des variations significatives existent sur la concentration exacte de l'infliximab, impliquant l'impossibilité de comparer les taux entre les différentes techniques. Ces différences de concentrations peuvent aller 1.41 µg/ml entre l'ELISA et la RIA, et de 0.48 µg/ml entre l'ELISA et le test cellulaire par exemple[497]. Pour les ADAs, la comparaison inter-technique est également déconseillée puisqu'en plus des valeurs de concentrations différentes, le pourcentage de détection est variable selon la technique, avec une forte sensibilité pour l'HMSA (33%), à l'inverse de l'ELISA (9%)[498]. Au sein même de la technique ELISA, des seuils décisionnels légèrement différents ont été retrouvés par Benhorin *et al* avec un seuil d'infliximab de 3.8 µg/ml pour discriminer les répondeurs des non-répondeurs[499]. Les taux et les associations avec les résultats cliniques doivent être ainsi déterminés et validés pour chaque type de test, afin que le monitoring des biothérapies soit un outil fiable de décision thérapeutique individuel.

La question de la fonctionalité de l'infliximab et des ADAs nous a semblé ensuite essentielle à vérifier. Pour cela, 144 sérums de 44 patients MICI traités par infliximab ont été dosés grâce au test cellulaire. Pour tester la bioactivité de l'anti-TNF, du TNF exogène a été ajouté, à une concentration stable, en même temps que les sérums des patients dans les puits cellulaires. L'activité résiduelle du TNF, c'est-à-dire non bloqué par l'infliximab sérique, a été ensuite mesurée et quantifiée. La présence d'infliximab en ELISA était un bon marqueur indirect de sa bioactivité chez ces patients MICI. De plus, en présence d'ADAs en ELISA, le test fonctionnel ne retrouvait pas d'infliximab bioactif dans les prélèvements. Ensuite, pour évaluer la capacité neutralisante des ADAs, 7 sérums de patients ayant des taux différents

d'ADAs en ELISA (de 0 à 200 ng/ml) ont été testés avec plusieurs concentrations d'infliximab (de 0 à 5 µg/ml). Pour des taux supérieurs à 50 ng/ml d'ADAs en ELISA, l'activation des cellules HEK-TNF était possible malgré l'ajout d'une concentration élevée d'infliximab. Il y avait une bonne corrélation entre les taux d'ADAs détectés en ELISA et l'activation cellulaire, ce qui démontre la capacité des ADAs à bloquer l'infliximab bioactif. Le test fonctionnel présentait par contre 2 inconvénients dans cette étude par rapport à l'ELISA. Outre sa moins bonne praticabilité, le test fonctionnel présentait une sensibilité légèrement inférieure à l'ELISA, puisque les rares cas discordants entre les 2 techniques présentaient une réponse clinique corrélée aux taux mesurés en ELISA. Le test de détection des ADAs étaient aussi très sensible à la présence d'infliximab sérique résiduel car se rajoutant à la concentration d'infliximab exogène évaluant la fonctionalité des ADAs.

La bonne corrélation retrouvée entre les tests ELISA et cellulaire est en accord avec les études de comparabilité inter-techniques déjà publiées. Steenholdt *et al* rapportent un taux de détection des ADAs similaire entre ELISA et test fonctionnel, bien que beaucoup plus faibles qu'avec la RIA et l'HMSA. Néanmoins, tous les patients ayant des ADAs détectés par ELISA sont retrouvés positifs dans les 2 autres techniques également, suggérant une plus grande sensibilité de la RIA et de l'HMSA. En fait, la sensibilité de ces 2 techniques est si élevée qu'elles pourraient permettre la détection d'anticorps anti-médicament non fonctionnels, non-neutralisants ou des anticorps qui seraient bloqués *in vivo* par la formation de complexes immuns avec l'infliximab circulant. La RIA et l'HMSA, par exemple, ont la capacité de quantifier les anticorps monovalents IgG4, qui peuvent ne pas être aussi efficaces dans la neutralisation de l'infliximab. Au niveau clinique, cette comparaison ne définit pas une technique optimale pour le monitoring de l'infliximab puisque ces tests ne diffèrent pas dans leur capacité à prédire les résultats cliniques[498]. Cependant, des études cliniques supplémentaires, incluant un plus grand nombre de patients et conçus dans ce but, doivent être entreprises pour répondre à cette problématique.

Chez des patients MICI ayant reçu quant à eux un traitement par adalimumab, une première étude avait mis en évidence la corrélation entre le taux résiduel d'adalimumab, la rémission clinique ainsi que la cicatrisation muqueuse avec un « cut-off » à 4.9 µg/ml. Par contre, aucune corrélation significative n'avait pu être décrite concernant les anticorps anti-adalimumab et les scores cliniques. Par la suite, les données relevées pour 80 patients IBD traités par adalimumab ont permis d'établir un algorithme décisionnel basé sur les taux résiduels d'adalimumab et d'anticorps anti-adalimumab. En effet, il est ressorti de cette étude que les patients présentant un taux d'adalimumab faible (<4.9 µg/ml) en présence d'anticorps anti-médicament (> 10ng/ml) ne répondaient pas à une optimisation de dose et qu'un switch thérapeutique était à envisager. A l'inverse, en l'absence d'anticorps anti-adalimumab, les patients pouvaient bénéficier d'une optimisation de dose. Une méta-analyse incluant 14 études a permis de confirmer l'importance du suivi des taux résiduels d'adalimumab et des anticorps anti-adalimumab dans la MC. En effet, l'odds ratio (OR) poolé de 4 études pour la perte de réponse clinique à l'adalimumab chez des patients MC ayant développés des ADAs était de 10.15 (3.90–26.40, P = 0.0001). Au delà du seuil prédéfini de taux résiduel

d'adalimumab, les patients étaient plus susceptibles d'être en rémission clinique avec un OR de 2.6 (1.79–3.77, P = 0.0001).

Les données issues de ces différentes études observationnelles permettent aux cliniciens de définir un cadre dans lequel les décisions cliniques peuvent être faites. Actuellement, l'application du monitoring des biothérapies se fait essentiellement après une perte secondaire de réponse au traitement. Différents choix thérapeutiques s'offrent alors au patient, notamment l'optimisation de dose, le changement d'anti-TNF ou de classe thérapeutique. Plusieurs algorythmes, basés sur des avis d'experts, apparaissent pour guider les décisions thérapeutiques. Trois algorythmes décisionnels différents sont publiés mais ils partagent des caractéristiques communes. En effet, chaque algorythme commence par évaluer les symptômes cliniques des patients pour objectiver une maladie active et éliminer un diagnostic différentiel. De plus, le dosage du taux résiduel et des anticorps anti-médicament sont utilisés systématiquement[500]. Ce monitoring permet de classer les patients en 3 groupes. Le premier groupe concerne les patients MICI ayant développés de hauts titres d'ADAs et ayant par conséquent des taux résiduels bas d'anti-TNF. Ces patients se sont immunisés contre le médicament et doivent être switchés avec un autre anti-TNF. Les patients ayant des taux résiduels d'anti-TNF normaux sont rassemblés dans le 2ème groupe. Ces patients ont peu de chance de répondre à une intensification de dose puisque leur processus inflammatoire pourrait ne pas être médié par un mécanisme lié au TNF. Dans ce cas, les cliniciens peuvent faire un changement thérapeutique en faveur d'autre classe médicamenteuse, si possible, ou rajouter des corticostéroïdes par exemple. L'optimisation de dose est recommandée pour un 3ème groupe de patients dont le taux résiduel d'anti-TNF est bas sans que la présence d'ADAs soit détectable[500].

En conclusion, l'utilisation d'un coffret ELISA commercial pour le dosage d'anti-TNF et des ADAs a démontré son intérêt dans le suivi prospectif de patients MICI. Ces études ont permis le développement de ces dosages en raison de la preuve de leur impact clinique pour ces patients.

Résultats 2 : Immunogénicité et réponse clinique chez des patients atteints de Polyarthrite Rhumatoïde

Introduction

Plusieurs traitements de fond sont disponibles pour la prise en charge de la PR. On distingue les molécules synthétiques conventionnelles (scDMARDs) dont fait parti le méthotrexate et les biothérapies incluant les anti-TNF (bDMARDs). Ces traitements de fond ont démontré leur efficacité sur l'activité de la maladie et, pour certains d'entre eux, leur capacité à réduire la progression des lésions articulaire structurales. Le but de ces traitements est d'obtenir une rémission clinique ou à défaut un contrôle de l'activité de la maladie, de prévenir le handicap fonctionnel et les lésions structurales, de limiter les conséquences psychosociales et d'améliorer la qualité de vie du patient[501].

Afin de permettre une évaluation plus objective de l'activité de la PR, des scores cliniques doivent être établis régulièrement, le DAS 28 étant le plus fréquemment employé. Le DAS 28 prend en compte le nombre de synovites et d'articulations douloureuses à la palpation, le résultat de la vitesse de sédimentation (VS) et la valeur de l'appréciation globale de la maladie évaluée par le patient sur une échelle visuelle analogique (EVA). L'analyse articulaire se fait sur 28 sites articulaires (10 métacarpophalangiennes, 8 interphalangiennes proximales des mains, 2 interphalagiennes des pouces, 2 poignets, 2 genoux, 2 coudes, 2 épaules). Le DAS 28 permet de définir plusieurs niveaux d'activité de la maladie : la PR de faible niveau d'activité (DAS 28 $\leq$ 3.2) et la PR active (DAS 28 $\geq$ 3.2) divisée en PR modérément active (3,2 < DAS 28 $\leq$ 5,1) et en PR très active (DAS 28 > 5,1). La valeur du seuil de rémission définie pour le DAS 28 est < 2,6[501].

Cette définition du niveau d'activité de la PR avec le DAS 28 permet une certaine standardisation et une comparaison entre les évaluations cliniques (Fig.45). De plus, ce score peut aussi servir à la mesure de la réponse clinique selon les critères de l'EULAR. Les critères de réponse se basent sur les variations du DAS 28, en tenant compte de la valeur initiale de ce score[502].

Activité de la PR (score actuel)	Diminution du score DAS 28		
	> 1,2	> 0,6 et ≤ 1,2	≤ 0,6
Faible	Bonne		
Modérée		Modérée	Nulle
Forte	Modérée	Nulle	

Figure 45: Réponse thérapeutique selon les critères de l'EULAR selon l'évolution du DAS 28 au cours d'une période[501]

Ces critères sont bien discriminants en terme de réponse clinique et sont associés à la progression de l'atteinte articulaire et aux changements relatifs de la capacité fonctionnelle[502].

Ces scores ont donc été choisis pour évaluer la réponse clinique dans la cohorte prospective de patients PR pendant 54 semaines, en parallèle des taux sériques d'infliximab et d'ADAs mesurés par technique ELISA ou tests fonctionnels. Ces résultats sont en cours de publication.

Article

Methotrexate reduced TNF bioactivity in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab

Prevention of anti-infliximab antibody development by methotrexate

Delphine Dénarié[1], Mélanie Rinaudo[2], Thierry Thomas[3,1], Stéphane Paul[2], and Hubert Marotte[3,1]

[1] Rheumatology Unit, CHU Saint-Etienne, Saint-Etienne, France

[2] Immunology and Immunomonitoring Department, CHU de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France

[3] INSERM 1059/LBTO, Université Jean Monet, Université de Lyon, Saint-Etienne, France

Abstract

Objectives: To evaluate methotrexate effects on tumor necrosis factor alpha (TNF) bioactivity and antibody against infliximab (ATI) development in rheumatoid arthritis (RA) patients treated by infliximab (IFX).

Materiels and Methods: In a longitudinal multicenter study including 39 RA patients requiring IFX therapy, clinical data and blood sample were recorded at the inclusion (W0), at the 6th week (W6), at the 6th month (W22) and at the 12th month (W54) of treatment.

Results: IFX trough level increased from W0 to W54 and distribution became heterogeneous at W22 at the time of first ATI detection. From W22, an inverse correlation between IFX trough level and ATI concentrations was observed ($p<0.05$). ATI concentrations inversely correlated with EULAR response at W22 ($p<0.005$). TNF bioactivity decreased from W0 to W6, and distribution was heterogeneous from W22. TNF bioactivity correlated with both DAS28 ($p<0.05$) and ATI concentrations ($p<0.001$) at W22. Methotrexate therapy was associated with absence of ATI at W22 ($p<0.05$), and TNF bioactivity was lower than in patients with other synthetic disease modifying antirheumatic drugs ($p<0.005$).

Conclusion: This suggests that methotrexate plays a key role on TNF bioactivity and against ATI development.

Introduction

Since last two decades, management of rheumatoid arthritis (RA) improved strongly RA prognosis due to tight control with availability of biological disease modifying antirheumatic drugs (bDMARDs). Infliximab (IFX, Remicade®) is a human-murine chimerical monoclonal IgG antibody targeting tumor necrosis factor alpha (TNF) approved for RA (1) and other inflammatory diseases, after inadequate response to conventional synthetic (cs) DMARDs.

Unfortunately, clinical improvement is heterogeneous with primary or secondary therapy failure (2). Many predictors for clinical response were already reported (3). Among them, we previously described that high TNF bioactivity level was a predictor for a good clinical response to IFX therapy (4), but not yet used at the time of “personalised medicine” (5).

Detection of antibody towards IFX (ATI) was described early in the IFX development and could explain immunoallergic reactions, paradoxical effect, or lack of response to IFX (6). Since development of commercial kits for IFX level and ATI detections, interest of monitoring of IFX and ATI levels is growing, mainly for IFX management in inflammatory bowel disease (7). At this time, the hypothesis is that ATI reduce IFX concentration, which induces lack of efficacy.

So, we explored development of ATI and its effect on IFX trough level, TNF bioactivity, and clinical response in RA patients treated by IFX over one year.

Materials and Methods

Patients

Between July 2002 and November 2003, 39 RA women in failure to csDMARDs and naïve to bDMARDs were enrolled and previously described (8). Patients received infliximab therapy given at 3 mg/kg per infusion at weeks (W) 0, 2, 6, and then every 8W in combination with csDMARDs. Before each infusion, a clinical evaluation was performed (tender and swollen joint count, patient global evaluation, morning stiffness) with erythrocyte sedimentation rate (ESR) and C-reactive protein (CRP) assessment, and DAS28 was calculated. The clinical response was estimated according to the criteria of the EULAR (9).

IFX trough and ATI levels determination

Blood samples were performed before IFX infusion at W0, W6, W22, and W54. IFX trough and ATI levels were assessed by ELISA with Lisa Tracker infliximab® kit (Theradiag, Marne-La-Vallee, France). High and low levels of IFX were defined with a cut off at 2 µg/mL ATI positivity was defined by a level higher than 20 ng/mL (7).

Infliximab and TNF bioactivity

A functional assay to assess TNF bioactivity was adapted from our previously study (4) by using HEK-Dual TNF Cells (InvivoGen, San Diego, CA). Briefly, sera of patients were first incubated with exogenous recombinant TNF (10 ng/mL, R&D Systems) with ou without exogenous infliximab (5 mg/mL). Then, the mixt was deposed in wells with HEK-Dual TNF cells. These cells allow the specific study of TNF-induced NF-kB activation by monitoring the activity of secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) thanks to a SEAP detection reagent QUANTI-BlueTM (Invivogen, San Diego, CA).

Statistical analysis

Since low number of patients, data were expressed as median and interquartile range 25%-75% [IQR 25-75] or number (%) and non-parametric tests (Spearman test with coefficient r, Pearson's (χ^2 test, Wilcoxon test, or Kruskal Wallis test with Dunn's multiple comparison test, as appropriate) were performed. Statistical analyses were performed using R software.

Results

Correlation between IFX serum level, ATI level, and disease activity

The main RA characteristics were described previously (8) and summarized in the Table 1. Of note the methotrexate was mainly used as csDMARDs in 24 RA patients, whereas leflunomide and hydoxychloroquine were used in 13 and 2 patients, respectively. As expected IFX trough level increased from 0.04 µg/ml [0.03-0.07] at W0 to 0.88 µg/ml [0.08-3.45] at W54 (Figure 1A). At W6, IFX trough level was increased from W0 with a small range (4.25 µg/ml [3.65-4.73]), whereas IFX trough level decreased after with a huge range at W22 (0.63 µg/ml [0.06-1.63]) and W54 (0.88 µg/ml [0.08-3.45]) (Figure 1A). ATI were detected from W22 (41%; n=16) to W54 (37%; n=7; Figure 1B). At W22 and W54, ATI were detected only in RA patients with low IFX trough level ($r=-0.81$; $p<0.001$ and $r=-0.56$; $p<0.005$, respectively; Figure 1C and 1D). Regarding clinical activity, DAS28 correlated with both IFX trough level (negatively) and ATI level (positively) at W22 ($r=-0.36$; $p<0.05$ and $r=0.6$; $p<0.001$; respectively). Baseline corticosteroid therapy (presence and dosage) did not affect IFX trough and ATI levels.

Correlation between clinical response and IFX serum or ATI levels

IFX trough level (Figure 2A; NS) and ATI level (Kruskal-Wallis rank sum test $p<0.005$; Figure 2B) were different according to EULAR response at W22. At W22, CRP correlated with ATI level (positively, $r=0.43$; $p<0.05$) and IFX trough level (negatively, $r=-0.48$; $p<0.005$).

TNF bioactivity modulation by IFX trough level, ATI level, and disease activity

TNF bioactivity was investigated in the same blood samples. The high level of TNF bioactivity at W0 (8.20 ng/ml [6.35-9.46]) was reduced at W6 (1.00 ng/ml [1.00-1.04]; $p<0.0001$), further to the IFX loading doses. Similarly to IFX trough and ATI levels, TNF bioactivity ranges was high at W22 and at W54 (1.00 ng/ml [1.00-6.01] and 1.00 ng/ml [1.00-4.04], respectively). TNF bioactivity correlated with DAS28 ($r=0.38$; $p<0.05$) and ESR

(r=0.35; p<0.05) only at W22 without with CRP. Only a trend was observed between the TNF bioactivity and EULAR response at W22 (Figure 2C; NS). A correlation between ATI level and TNF bioactivity at W22 was observed (r=0.79; p<0.001).

Since TNF bioactivity would be the reflect between IFX trough and ATI levels, we explored TNF bioactivity in 3 groups according to IFX trough level and ATI positivity at W22: 1-Low IFX without ATI, 2- Low IFX with ATI, and 3- High IFX without ATI. High level of TNF bioactivity was observed only in the group “Low IFX with ATI” (p<0.05; Figure 2D). Similarly to TNF bioactivity, DAS28 was heterogeneous in these 3 groups (Kruskal-Wallis rank sum test p<0.05) and higher in the “Low IFX with ATI” group compared to the two others (p<0.05; Figure 2E).

Correlation between ATI, TNF bioactivity, and methotrexate therapy

Methotrexate therapy was associated with absence of ATI development compared to other scDMARDs (leflunomide or hydroxychloroquine) at W22 (χ^2=6.13; p<0.02). Furthermore, in patients with methotrexate therapy, TNF bioactivity was lower than in patients with other scDMARDs at W22 (Wilcoxon rank sum test p<0.005; Figure 2F) confirming association between ATI level and TNF bioactivity.

Discussion

Since commercial kits are available in daily practice, monitoring of bDMARDs is a growing topic for personalized medicine (5). However monitoring of IFX trough level and ATI should be allow to explain only some part of the lack of response to IFX therapy (10).

This study highlights methotrexate therapy in ATI development in RA patients treated with IFX. Homogeneity of IFX trough and ATI levels at W6 and heterogeneity at W22 and W54 are consistent with previous studies (11). Small range for IFX trough level was related to loading dose of IFX (11), whereas mechanism of later heterogeneity of IFX remained controversial. Heterogeneity of IFX trough level could explain some part of heterogeneity of clinical response as previously described in RA (12). Consistently with previous results, CRP was also correlated with ATI level and IFX trough level (11).

Despite the large consensus between IFX trough level and good clinical response (13), data on ATI interest remained controversial in part due to heterogeneity of assessment tests (13). According to ELISA test used in our study for ATI determination, we confirmed that ATI were detectable only in patients with low IFX trough level (12). Development of ATI seemed more frequent in RA than in spondyloarthritis (SpA) (12) with 40% in our study consistently with previous reports at the same time points (12)(14). ATI positivity was associated with a lower EULAR response as previously reported (14), suggesting a neutralizing role on IFX function.

Our main result was to observe methotrexate as a protector for ATI development compared to other csDMARDs. Previously, methotrexate was not described to increased IFX trough level during RA (12)(14) or SpA (12). However, methotrexate therapy increased IFX treatment duration in RA patients with ATI (15), suggesting a beneficial effect of methotrexate on ATI level or function. Glucocorticoid was not found to prevent development of ATI in this cohort.

Since we previously reported that circulating TNF bioactivity was a good predictor of clinical response to IFX (4), we investigated it in this RA cohort. TNF bioactivity correlated strongly

with DAS28 at W22. As suspected TNF bioactivity was low in patients with high IFX trough level. Furthermore, TNF bioactivity was lower in RA patients with methotrexate compared to others scDMARDs in accordance with prevention of ATI development by methotrexate. Interestingly, RA patients with low IFX trough level and without ATI had no TNF bioactivity, whereas RA patients with low IFX and with ATI had high TNF bioactivity. This was unsuspected and suggested other way of regulation of TNF bioactivity not trigger by IFX and ATI such as soluble TNF receptors (4). Recently, we described a IFX bioactivity, which is the opposite of TNF bioactivity during IFX treatment. In IBD patients, these high IFX bioactivity was associated with high IFX level and absence of ATI(16). The association between ATI and low TNF bioactivity demonstrates that the presence of ATI is preventing endogenous TNF neutralization. This result is in agreement with previous studies demonstrating that the great bulk of anti-TNF inhibitors are neutralizing antibodies.

Our data have some weakness with 39 patients included at baseline. We failed to observe correlation between low IFX trough level and development of ATI probably due to absence of blood samples around 3 months of IFX therapy. The paradox results between TNF bioactivity and low IFX trough level in presence or not of ATI will require further investigations.

To conclude, we described a major role of methotrexate to reduce ATI development, TNF bioactivity and improved DAS28 compared to other scDMARDs.

References:

1. Maini R, St Clair EW, Breedveld F, Furst D, Kalden J, Weisman M, et al. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. Lancet. 1999 Dec 4;354(9194):1932–9.
2. Rubbert-Roth A, Finckh A. Treatment options in patients with rheumatoid arthritis failing initial TNF inhibitor therapy: a critical review. Arthritis Res Ther. 2009;11 Suppl 1:S1.
3. Mori S, Ueki Y. Primary lack of efficacy of infliximab therapy for rheumatoid arthritis: pharmacokinetic characterization and assessment of switching to tocilizumab. Mod Rheumatol Jpn Rheum Assoc. 2011 Dec;21(6):628–36.
4. Marotte H, Maslinski W, Miossec P. Circulating tumour necrosis factor-alpha bioactivity in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab: link to clinical response. Arthritis Res Ther. 2005;7(1):R149–55.
5. Smolen JS, Aletaha D. Forget personalised medicine and focus on abating disease activity. Ann Rheum Dis. 2013 Jan;72(1):3–6.
6. Alessandri C, Scrivo R, Spinelli FR, Ceccarelli F, Magrini L, Priori R, et al. Autoantibody production in anti-TNF-alpha-treated patients. Ann N Y Acad Sci. 2007 Sep;1110:319–29.
7. Paul S, Del Tedesco E, Marotte H, Rinaudo-Gaujous M, Moreau A, Phelip J-M, et al. Therapeutic drug monitoring of infliximab and mucosal healing in inflammatory bowel disease: a prospective study. Inflamm Bowel Dis. 2013 Nov;19(12):2568–76.
8. Chopin F, Garnero P, le Henanff A, Debiais F, Daragon A, Roux C, et al. Long-term effects of infliximab on bone and cartilage turnover markers in patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2008 Mar;67(3):353–7.
9. Van Gestel AM, Prevoo ML, van 't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB, 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 Jan;39(1):34–40.

10. Finckh A, Dudler J, Wermelinger F, Ciurea A, Kyburz D, Gabay C, et al. Influence of anti-infliximab antibodies and residual infliximab concentrations on the occurrence of acquired drug resistance to infliximab in rheumatoid arthritis patients. Jt Bone Spine Rev Rhum. 2010 Jul;77(4):313–8.

11. St Clair EW, Wagner CL, Fasanmade AA, Wang B, Schaible T, Kavanaugh A, et al. The relationship of serum infliximab concentrations to clinical improvement in rheumatoid arthritis: results from ATTRACT, a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum. 2002 Jun;46(6):1451–9.

12. Ducourau E, Mulleman D, Paintaud G, Miow Lin DC, Lauféron F, Ternant D, et al. Antibodies toward infliximab are associated with low infliximab concentration at treatment initiation and poor infliximab maintenance in rheumatic diseases. Arthritis Res Ther. 2011;13(3):R105.

13. Vincent FB, Morand EF, Murphy K, Mackay F, Mariette X, Marcelli C. Antidrug antibodies (ADAb) to tumour necrosis factor (TNF)-specific neutralising agents in chronic inflammatory diseases: a real issue, a clinical perspective. Ann Rheum Dis. 2013 Feb;72(2):165–78.

14. Bendtzen K, Geborek P, Svenson M, Larsson L, Kapetanovic MC, Saxne T. Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor alpha inhibitor infliximab. Arthritis Rheum. 2006 Dec;54(12):3782–9.

15. Pascual-Salcedo D, Plasencia C, Ramiro S, Nuño L, Bonilla G, Nagore D, et al. Influence of immunogenicity on the efficacy of long-term treatment with infliximab in rheumatoid arthritis. Rheumatol Oxf Engl. 2011 Aug;50(8):1445–52.

16. Rinaudo-Gaujous M, Roblin X, Marotte H, Paul S. The antibody response against human and chimeric anti-TNF therapeutic antibodies primarily targets the TNF binding region. Ann Rheum Dis. 2015 Mar 23;annrheumdis – 2015–207503.

Table 1: Patients characteristics

Population characteristics	
Number of patients	39
Age (years)	56.28 [46.45-61.32]
RA duration (years)	12.2 [6.4-17.7]
DAS28 at baseline	5.2 [4.94-5.64]
Anti-CCP positive (%)	82.5
RF positive (%)	82.5
Corticosteroid therapy (%)	77.5
Corticosteroid therapy (mg/day)	10 [5-12]
Background therapy	
Methotrextate (n)	24
Leflunomide (n)	13
Hydroxychloroquine (n)	2
Smoking (%)	12.5

Patients characteristics at baseline: median and interquartile range 25%-75% [IQR 25-75], except precision

Legend of figures

Figure 1

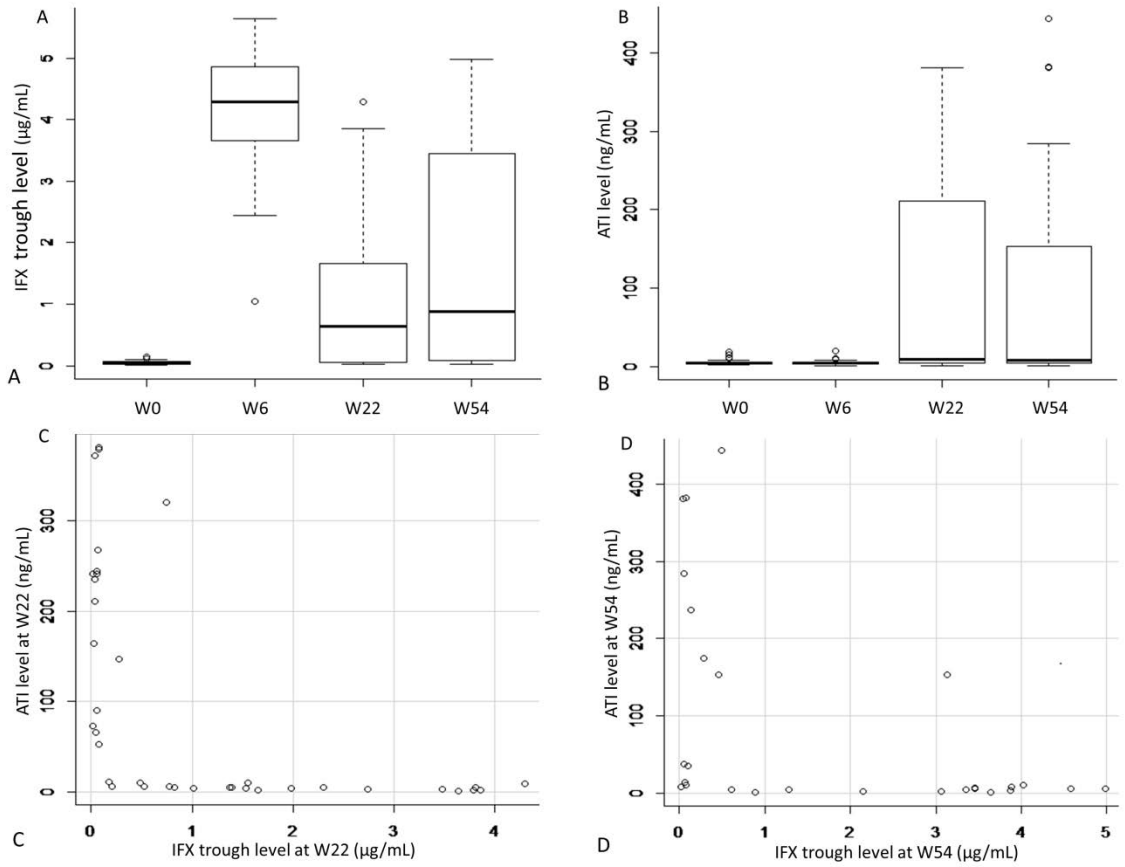


Figure 1: Evolution of IFX trough level, ATI level according to IFX treatment duration. IFX trough level (A) and ATI level (B) were on the same range at W0 and W6 with high range at W22 and W54. ATI were observed only when IFX trough level was low at W22 (C) and W54 (D).

The box plots show the median values and the first and third quartiles at each time. The T bars represent the rest of the data with a maximum of 1.5 times the interquartile range. Circles represent values lower or upper than 1.5 times the interquartile range (A, B). IFX: infliximab; ATI: anti-infliximab antibodies; W: week.

Figure 2

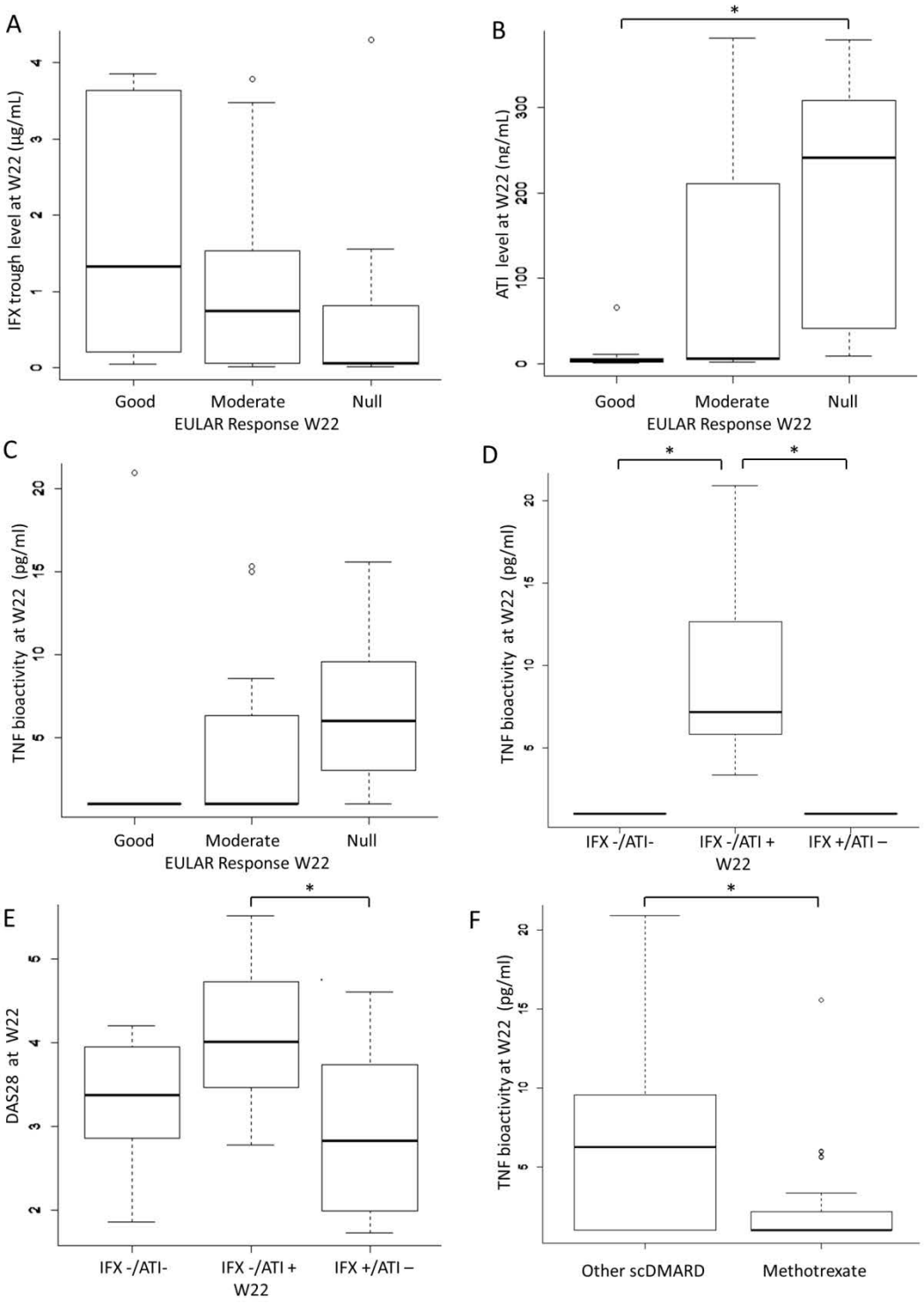

A
IFX trough level at W22 (µg/mL)
0
1
2
3
4
Good
Moderate
Null
EULAR Response W22
B
*
ATI level at W22 (ng/mL)
0
100
200
300
Good
Moderate
Null
EULAR Response W22
C
TNF bioactivity at W22 (pg/ml)
5
10
15
20
Good
Moderate
Null
EULAR Response W22
D
*
*
TNF bioactivity at W22 (pg/ml)
5
10
15
20
IFX -/ATI-
IFX -/ATI + W22
IFX +/ATI –
E
*
DAS28 at W22
2
3
4
5
IFX -/ATI-
IFX -/ATI + W22
IFX +/ATI –
F
*
TNF bioactivity at W22 (pg/ml)
5
10
15
20
Other scDMARD
Methotrexate

Figure 2: Association between IFX trough level, ATI level, TNF bioactivity, MTX therapy, and clinical response. A trend between IFX trough level and EULAR response with higher level in Good response compared to Null response (A; Kruskal-Wallis rank sum test NS). At the opposite, ATI level was not detectable in Good response and high in Null response at W22 (B; Kruskal-Wallis rank sum test $p<0.005$). TNF bioactivity was not detectable in Good response and high in Null response at W22 (Kruskal-Wallis rank sum test ; NS). High level of TNF bioactivity was observed in the group “Low IFX with ATI”, but not in the group “Low IFX without ATI” and “High IFX without ATI” (D; Kruskal-Wallis rank sum test $p<0.05$). DAS28 was higher in the “Low IFX with ATI” group compared to the two others (E; Kruskal-Wallis rank sum test $p<0.05$). With methotrexate therapy TNF bioactivity was lower than with other scDMARDs at W22 (F; Wilcoxon rank sum test $p<0.005$).

The box plots show the median values and the first and third quartiles at each time. The T bars represent the rest of the data with a maximum of 1.5 times the interquartile range. Circles represent values lower or upper than 1.5 times the interquartile range. IFX: infliximab; ATI: anti-infliximab antibodies; W: week; TNF: tumor necrosis factor alpha; IFX -: infliximab trough level lower than 2 µg/mL; IFX +: infliximab trough level higher than 2 µg/mL; ATI -: anti-infliximab antibodies level lower than 20 ng/mL; ATI +: anti-infliximab antibodies level higher than 20 ng/mL; scDMARDs: synthetic disease modifying antirheumatic drugs; *: $p<0.05$

Résultats et discussion

Cette étude de l'immunogénicité des anti-TNF a été réalisée sur 39 patients atteints de PR traités par infliximab pendant 54 semaines. Les taux résiduels d'infliximab augmentaient entre le taux de base et à S54, avec une hétérogénéité des taux notée à partir de S22 correspondant à la première identification d'ADAs. Les taux d'ADAs étaient alors inversement proportionnels aux taux résiduels d'infliximab et corrélaient bien avec l'absence de réponse clinique évaluée par l'EULAR. Un traitement par méthotrexate était associé à l'absence de développement d'ADAs en comparaison avec les autres scDMARDs utilisés (Léflunomide, Hydroxychloroquine) à S22.

Dans notre étude, la cible thérapeutique minimale à atteindre en infliximab était définie à 2µg/ml. Les seuils de concentration sérique en médicament pour déterminer un sous-dosage ou un sur-dosage en anti-TNF ne sont pas encore établis de manière convaincante dans la PR. Toutefois, les taux sériques en anti-TNF semblent optimums entre 2 et 8 mg/L, avec des concentrations insuffisantes si le taux est < 2 mg/L et trop élevées si > 8 mg/L selon les données publiées[503]. D'ailleurs, un algorythme reprenant ces seuils d'anti-TNF a permis de modifier la décision thérapeutique de la moitité des patients inclus dans une étude ouverte observationnelle, et de conduire à l'amélioration du contrôle de l'activité de la maladie pour les patients dont la dose d'infliximab a été augmentée[504]. Bien que des études complémentaires soient nécessaires afin de préciser la cible thérapeutique d'infliximab à atteindre, ces seuils semblent valides dans notre étude. L'intérêt de surveiller les concentrations sériques d'infliximab dans la PR part de le constation d'une variabilité interindividuelle importante dans ces taux malgré l'administration du traitement en fonction du poids. Il est maintenant communément admis que le taux de réponse clinique augmente en parallèle du taux sérique d'infliximab. D'ailleurs, une concentration supérieure de 1 mg/L est associée à la maintenance prolongée d'un traitement par infliximab[503]. De plus, certaines données suggèrent le rôle d'une exposition à de faibles concentrations d'infliximab dans le développement des ADAs, réduisant alors la maintenance de l'infliximab[505]. Dans notre étude, les ADAs apparaissent à partir de la semaine 22, ce qui est concordant avec une étude réalisée dans les MICI rapportant que 90% des patients développant des anticorps anti-infliximab le font dans la première année suivant le début du traitement[506]. De même, 67% des patients PR développant des anticorps anti-adalimumab ont un taux détectable dans les 28 premières semaines de traitement[507]. Les ADAs pouvant être responsable de l'augmentation de la clairance de l'anti-TNF, il n'est pas étonnant de remarquer une hétérogénéité des taux d'infliximab dans notre étude dès lors que les ADAs sont détectés.

Concernant ces ADAs, la notion récente de la persistance de ces anticorps dans le temps est également importante à prendre en compte. En effet, certaines études mettent en avant l'insuffisance de la mesure unique des ADAs dans le suivi des patients, puisque ces ADAs peuvent être transitoires. Bien que non décrit encore dans la PR, ces ADAs transitoires n'aboutissent pas forcément à une aggravation de l'évolution clinique dans les MICI, à l'inverse des anticorps permanents qui sont toujours liés à une perte de réponse clinique au traitement[508]. Le seuil optimal des ADAs permettant de prédire un échappement clinique serait d'au moins 20 ng/ml, sur 2 mesures consécutives pour établir leur stabilité[509]. Ainsi, ce

seuil de 20 ng/ml a été retenu pour la considération de la positivité des ADAs dans notre étude, réalisé par la même techique ELISA, et les résultats retrouvés sont concordants avec les données issues des précédentes études.

L'extrapolation aux maladies inflammatoires rhumatismales des résultats obtenus dans les essais cliniques sur les MICI doit cependant être réalisée avec prudence. En effet, la physiopathologie de ces 2 familles de maladies est très différente, comme nous avons pu l'appréhender précédemment, et le mécanisme d'action des anti-TNF peut varier suivant la pathologie considérée. Les données actuelles suggèrent que l'action de l'infliximab serait similaire dans les indications rhumatologiques et le psoriasis, à savoir par liaison au TNF soluble et membranaire. Cependant, la région Fc de l'anti-TNF pourrait également jouer un rôle important dans les MICI par activation des mécanismes ADCC et CDC[510].

Ces données pourront par contre être probablement appliquées aux biosimilaires de l'infliximab déjà commercialisés en Europe. Dans le processus de validation réglementaire, aucune différence en termes de pharmacocinétique, pharmacodynamique et d'immunogénicité n'a été retrouvée entre les médicaments de référence et leurs copies[511].

Partie 2 : Implication d'un facteur bactérien dans la résistance au traitement par anti-TNF

Résultats 1 : Etude des marqueurs bactériens et de leur évolution chez des patients atteints de MICI traités par infliximab

Introduction

Les MICI sont des maladies chroniques dont l'étiologie n'est que partiellement comprise. La présence de facteurs environnementaux sur un terrain génétique particulier peut engendrer l'activation d'une réponse immunitaire inappropriée, induisant la destruction de la muqueuse intestinale. Cette dégradation de l'épithélium intestinal augmente la perméabilité intestinale qui correspond au mécanisme pouvant expliquer la présence d'anticorps anti-microbiens dans les MICI et qui peuvent servir de biomarqueurs.

Une réactivité à certains antigènes bactériens comme l'oligomannane ASCA, OmpC et CBir1 a déjà été largement étudiée pour la capacité à aider les cliniciens dans le diagnostic, la stratification ou le pronostic de la maladie. Ces 3 anticorps anti-microbiens ont été associés à une forme clinique agressive de MC[332]. Outre les ASCA qui sont dirigés contre les mannanes de *S. cerevisiae,* de nouveaux anticorps anti-glycans ont été récemment décrits dans les MICI et inclus : les anticorps anti-chitibioside carbohydrate (ACCA) IgA, anti-laminaribioside carbohydrate (ALCA) IgG, anti-mannobioside carbohydrate (AMCA) IgG, anti-laminarine (anti-L) et anti-chitine (anti-C) IgA. Des données récentes indiquent que des niveaux élevés d'anticorps anti-glycans peuvent être associés à des formes compliquées des MICI, avec une plus forte probabilité de chirurgie liée à la maladie[340]. Cette association pourrait s'expliquer par une altération plus importante de la barrière intestinale dans les formes sévères, laissant le passage aux bactéries de la flore commensale dans la lamina propria. Ces formes sévères ou compliquées de la maladie nécessitent généralement l'administration d'agents anti-TNF dans leur prise en charge. Les indications des biothérapies sont étendues aux formes sévères des MICI ou modérées mais présentant des facteurs de mauvais pronostic, une destruction de la paroi intestinale, une fistule ou abcès ano-périnéale ou après échec des immunosuprpesseurs[512]. Il existe un intérêt croissant pour évaluer si la détermination d'une réponse immunitaire contre ces épitopes de glycans, seuls ou en combinaison, pourrait être associée à une forme clinique plus agressive de la maladie ou à sa stabilité, et si la détection et la quantification des ces anticorps sériques pourraient représenter un marqueur de substitution pour déterminer l'évolution clinique sous traitement et la sévérité des MICI.

Dans la présente étude, nous nous sommes concentrés sur les anticorps anti-glycans pour analyser leur performance, seul ou en association avec les ASCA et les p-ANCA, pour le diagnostic des MICI, la stratification et le phénotype de la maladie, et pour déterminer si le statut sérologique pourrait être associé qualitativement et quantitativement à la sévérité de l'évolution de la maladie.

Article

Copyedited by: OUP

Journal of Crohn's and Colitis, 2015, 1–7
doi:10.1093/ecco-jcc/jjv063
Original Article

Original Article

Association of Anti-glycan Antibodies and Inflammatory Bowel Disease Course

S Paul,[a†] G Boschetti,[b†] M Rinaudo-Gaujous,[a] A Moreau ,[a] E Del Tedesco,[c] J Bonneau,[a] E Presles, F Mounsef, L Clavel,[c] C Genin,[a] B Flourié,[b] J-M Phelip,[c] S Nancey, X Roblin[c]

[a]Laboratory of Immunology, University Hospital, Saint-Etienne, France [b]Department of Gastroenterology, Lyon-Sud Hospital, Pierre-Benite, France and International Centre for Research in Infectiology [CIRI], Lyon, France [c]Department of Gastroenterology, University Hospital, Saint-Etienne, France [4]DRCI-CIC, University Hospital, Saint-Etienne, France [5]Pharmacy Department, University Hospital, Saint-Etienne, France

[†]Co-first authors, equal contributions.

Corresponding author: Xavier Roblin, MD, PhD, Department of Gastroenterology, Saint-Etienne University Hospital, 42 Saint-Etienne, France. Email: xavier.roblin@chu-st-etienne.fr

Abstract

Background and Aims: The usefulness of anti-glycan antibodies alone or combined with anti-*Saccharomyces cerevisiae* [ASCA] or perinuclear antineutrophil cytoplasmic [pANCA] antibodies for diagnosis of inflammatory bowel disease [IBD], differentiation between Crohn's disease [CD] and ulcerative colitis [UC], disease stratification including IBD phenotype, and also for determination of the course of the disease, remain unclear.

Methods: A large panel of serological anti-glycan carbohydrate antibodies, including anti-mannobioside IgG antibodies [AMCA], anti-chitobioside IgA [ACCA], anti-laminaribioside IgG antibodies [ALCA], anti-laminarin [anti-L] and anti-chitine [anti-C] were measured in the serum from a cohort of 195 patients with IBD] [107 CD and 88 UC]. The respective accuracy of isolated or combined markers for diagnosis, disease differentiation, stratification disease phenotype, and severity of the disease course, defined by a wide panel of criteria obtained from the past medical history, was assessed.

Results: The positivity of at least one anti-glycan antibody was detected in a significant higher proportion of CD and UC compared with healthy controls [$p < 0.0001$ and $p < 0.0007$, respectively]. Whereas ASCA and ANCA antibody status had the highest efficacy to be associated with CD in comparison with UC (area under receiver operating characteristic curve [AUROC] = 0.70 for each], the adjunction of anti-laminarin antibody substantially improved the differentiation between CD and UC [AUROC = 0.77]. Titres of ACCA [> 51 U/ml] and anti-laminarin [> 31 U/ml] were significantly linked with a higher association with steroid dependency (odds ratio [OR] =2.0 [1.0–4.0], $p = 0.03$ and OR = 2.4 [1.1–5.2], $p = 0.02$, respectively]. We further defined the respective performance of anti-glycan antibodies to discriminate between patients with severe or not severe CD and UC course and determined the associated optimal cut-off values: severe CD course was significantly more likely in case of AMCA > 77 U/ml [OR = 4.3; $p = 0.002$], ASCA > 63 U/ml [OR = 3.5; $p < 0.009$] and at a lesser degree ACCA > 50 U/ml [OR = 2.8; $p < 0.02$] and severe UC course was significantly associated with AMCA > 52 U/ml [OR = 3.4; $p = 0.04$] and ACCA > 25 U/ml [OR = 3.0; $p < 0.04$].

AQ1

Copyright © 2015 European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). Published by Oxford University Press. All rights reserved.
For permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Copyedited by: OUP

Conclusions: Anti-glycan antibodies are valuable serological markers, especially AMCA antibodies that may help clinicians to promptly classify patients into high risk for severe disease.

Keywords: Serological antibodies; anti-glycans; Crohn's disease; ulcerative colitis; IBD behaviour

Abbreviations

[CD]	Crohn's disease
[UC]	Ulcerative colitis
[IBD]	Inflammatory bowel disease
[TNFα]	perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody Tumor necrosis factor
[anti-TNF]	Anti-Tumor Necrosis Factor
PPV	Positive Predictive Value
NPV	Negative Predictive Value
Ss	Sensibility
Sp	Specificity.

1. Background

Inflammatory bowel diseases [IBD], including Crohn's disease [CD] and ulcerative colitis [UC], are chronic intestinal disorders characterised by alternating relapse and remission periods. Pathogenesis is multifactorial and involves abnormal host-immune-gut microbial interactions, as evidenced by the presence of serum specific antibodies directed against resident luminal bacterial components.[1] Various seroreactivity to specific microbial antigens such as anti-*Saccharomyces cerevisiae* [ASCA] and perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody [pANCA] serve as surrogate markers that can be seen in a subgroup of patients with IBD. Knowledge of other CD-specific antibodies directed against specific microbial antigens has expanded, including anti-*Pseudomonas*-associated sequence I2, outer-membrane-porin C, and anti-bacterial cBir1 flagellin; and all of them have been previously extensively investigated for their respective ability to help clinicians in diagnosis, disease stratification, or disease behaviour in IBD. Reactivity to microbial antigens such as oligomannan ASCA, OmpC and CBir1 were found to be associated with an aggressive CD behaviour.[2,3,4,5] More recently, novel specific seroreactivity to anti-glycan carbohydrate antibodies, including anti-mannobioside carbohydrate IgG antibodies [AMCA], anti-chitobioside carbohydrate IgA [ACCA], and anti-laminaribioside carbohydrate IgG antibodies [ALCA] have been added to the armamentarium of available serological markers that can be detected. They have been also studied for their ability to assess diagnosis of CD[6] and to differentiate CD from UC, and recent evidences have also reported that high levels of anti-glycan antibodies could be associated with complicated disease behaviour and a higher probability of disease-related surgery in CD.[3,7,8,9] It has been shown that the presence of anti-glycans was linked with a high likelihood to develop a complicated IBD behaviour leading to increased risk of IBD-related surgery.[9]

There is a growing interest to determine whether the determination of an immune response directed against glycan-epitopes alone or in combination could be associated with an aggressive disease behaviour or stability, and whether the detection and the measurement of anti-glycan antibody status in the serum of patients with IBD would represent a surrogate marker in determining the clinical course or severity of IBD. Emerging disease-modifying therapies, including anti-tumour necrosis factor [anti-TNF] are capable to change the natural course of IBD if they are used as early enough, as necessary. Therefore early identifying patients at high risk of severe or disabling disease would be of interest in using preemptive therapy. In the present study, we focused on the anti-glycan carbohydrate antibodies by analysing their performance alone or in combination with ASCA or pANCA antibodies for diagnosis of IBD, disease stratification, and disease phenotype, an also whether anti-glycan antibody status may be qualitatively and quantitatively associated with the severity of the course of the disease.

2. Methods

2.1. Patients and study characteristics

All the consecutive in- and outpatients with IBD [107 with CD and 88 with UC] referred to the Department of Gastroenterology of Saint-Etienne's University Hospital were prospectively enrolled over a 12-month period between September 2009 and October 2010. The diagnosis of IBD was assessed on common endoscopic and histological evidences of the disease, according to the Lennard-Jones criteria.[10] Only patients with a confirmed diagnosis of IBD for more than 1 year were enrolled and patients with indeterminate colitis were excluded. The healthy control group [n = 45] were age- and gender-matched to IBD group consecutive healthy volunteers selected from blood donors. All gave their written informed consent for participation in the study, which was previously approved by the local Ethics Committee of the University of Saint-Etienne.

A complete medical chart review of the past history and physical examinations were systematically recorded at inclusion and disease activity was assessed using the Crohn's Disease Activity Index [CDAI] for CD and the Lichtiger severity index for UC. The following additional clinical data were collected at baseline: date of birth, gender, disease duration, age at onset, disease location and behaviour according to the Montreal classification,[11] concomitant perianal disease, extra-intestinal manifestation, smoking history, and previous history of IBD-related surgery. Previous drug-response history (e.g. need for steroid and/or immunosuppressant, steroid dependency and/or resistance, as previously defined by the European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO]) was also recorded by reviewing the medical charts.

For the purpose of the study, the presence of at least one of the following composite severity criteria in the IBD-related past medical history was noted: patients with uncontrolled active disease requiring adjunction of biotherapy with anti-TNF after failure with conventional immunosuppressants; two or more IBD-related previous surgeries or bowel resection longer than 70 cm; concomitant active perianal disease with complex fistulas; or spread of bowel disease [defined regarding a length of small bowel greater than 50 cm with diffuse jujenal injury], for patients with CD, and: pancolitis associated with increased C-reactive protein levels and steroid treatment at UC diagnosis; early use of immunosuppressant during the first year of the disease due to steroid-refractory response; use of anti-TNF after failure with immunosuppressant; acute severe UC; or colectomy, for UC patients. These conditions were associated with serological markers.

2.2. Serological marker analysis

All patients and healthy controls provided a venous blood sample [≈ 10 ml]. Serum was rapidly transported to the laboratory,

Copyedited by: OUP

separated from blood by centrifugation and kept frozen at -80°C until use. All sera were analysed by enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA] for a large panel of serological markers including ASCA, ANCA, ACCA, ALCA, AMCA, anti-chitin and anti-laminarin antibodies. Clinical data analyses and serological assessments were performed in a blinded manner without knowledge of the patients' diagnosis and medical history. Commercially available kits were used to detect ANCA IgG [Bioadvance, Philadelphia, PA], ASCA IgA and IgG, ACCA IgA, ALCA IgG, AMCA IgG, anti-chitin IgA and anti-laminarin IgA [Glycominds, Israel] levels in sera. Briefly, serum samples or standard control samples were diluted and incubated on microtitre plates coated with specific antigens. The plates were washed to remove the unbound antibodies. Then biotin-labeled antibodies were added to the wells and the plates were incubated with frequent shaking. The wells were then washed by washing with buffer three times and then 100 µl of streptavidin enzyme conjugate was added to each well. After incubation, the plates were washed and 100 µl of the substrate tetramethylbenzidine [TMB] was added. After short incubation in the dark, the stop solution was added to block colour development after the recommended times and the optical densities [OD] at 450 nm were measured by an ELISA-microplate reader [AP22, Bioadvance]. Results are presented as arbitrary units, which were calculated based on the sample and calibrator optical density. Intra- and inter-assay precision errors were below 10%.

2.3. Statistical analysis

Qualitative data were reported as numbers and percentages. Quantitative data were reported as mean ± standard deviation, median value with first quartile [Q1] and third quartile [Q3], minimum and maximum. Univariate and multivariate analyses were generated to identify potential independent antibodies for CD and UC. These analyses were adjusted for age and sex. Only variables with a prevalence of at least 3% and associated with the risk of pathology according to univariate analyses with a p-value of less than 0.15 were included in the multivariate model. The univariate analysis and multivariate models were logistic. A p-value of 0.05 or less was used to retain antibody as independent factor of pathology. Data were processed and analysed by SAS-WINDOWS™ software [version 9.2].

3. Results

3.1. Characteristics of the patients

A total of 107 consecutive patients with CD (57 females [53%], median age 41.3 years [20–101]) and 88 consecutive patients with UC (33 females [37%], median age 49.3 years [19–88]) were enrolled during the study period. The median duration of disease at study inclusion was 9.4 years [1–44] for CD, and 10.4 years, [1–34] for UC. More than half of CD patients enrolled had a colonic [L2] or ileocolonic disease location [L3] and 43 out of 107 patients [40%] a complicated behaviour [B2-stricturing or B3-penetrating], according to the Montreal classification. Around 46% of UC patients had a pancolitis [E3] at inclusion. Among the whole population, 26 patients [13%] were treated with anti-TNF antibodies and more than two-thirds of patients were steroid-dependent and/or steroid-refractory in their medical history. Of 107 CD patients, 68 [63%] and 44of 88 UC patients [50 %] fulfilled the criteria for severe disease described below. Demographic and baseline disease characteristics of patients and healthy controls are listed in Table 1.

3.2. Distinguishing IBD patients from controls and UC patients from CD patients

The respective abilities of the large panel of anti-glycan antibodies tested, including ALCA, ACCA, and AMCA, anti-laminarin [anti-L] and anti-chitin [anti-C] antibodies to distinguish IBD patients from healthy controls were analysed. Using predetermined manufacturers' thresholds, all the antibodies investigated, except for anti-C antibodies, were found significantly positive more often in CD [40.6% vs 2.3% for AMCA or 29.2% vs 4.5% for ALCA] when compared with those detected in healthy controls [Supplementary Table 2, available as Supplementary data at *ECCO-JCC* online: as examples, ACCA median of 52.9 vs 37.9, AMCA median of 78.4 vs 39.9 respectively]. In UC, positive anti-glycan antibodies ALCA and AMCA were detected in a significantly higher number of patients [Supplementary Table 2: 19.3% and 29.5% vs 4.5% and 2.3%, respectively] compared with those in healthy controls [$p < 0.04$ and $p < 0.006$, respectively]. In contrast, positivity against ACCA, an anti-L or anti-C antibody was not found statistically different between UC and healthy controls. Using a multivariate analysis, a significantly and independently higher number of CD and UC patients where found positive for at least one anti-glycan antibody compared with healthy controls [$p < 0.0001$ and $p < 0.0007$ for CD and UC, respectively Supplementary Table 2]. Again by a multivariate analysis, the positivity of AMCA seroreactivity [29.5%] was also found significantly associated with UC [$p < 0.005$; Supplementary Table 3, available as Supplementary data at *ECCO-JCC* online].

Among the wide panel of antibodies tested in univariate analysis using manufacturers' thresholds, the best antibodies capable of distinguishing CD from UC patients were ANCA, ASCA, ACCA, and anti-laminarin antibodies. Figure 1 summarizss the median titres of individual antibody measured in CD and in UC patients. Then we performed a multivariate analysis taking into account all sig- nificant anti-glycan antibodies adjusted for age and sex, given that these parameters were statistically different between UC and CD [$p = 0.0032$ and $p = 0.0286$, respectively]. We found that only ANCA, ASCA, and anti-laminarin antibodies were able to differentiate CD from UC. For example, ASCA antibodies [IgA/IgG] were positive in 18.2% of UC and 47.2% of CD cases [Supplementary Table 3]. The results of univariate and, in cases of significance, multivariate analysis for all the antibodies are summarised in Supplementary Table 3. In a head-to-head comparison, ASCA and ANCA antibodies had the highest validity to discriminate CD from UC, with an area under the receiver operating characteristic [AUROC] curve of 0.70 for both and, at a lesser degree, for anti-laminarin antibody [AUC = 0.68]. The combination of the three antibodies [ASCA, ANCA, and anti-laminarin] substantially improved the diagnostic value of these three markers with an AUC of 0.77.

3.3. Relationships between anti-glycan antibodies and phenotype of IBD and therapy

We further tested the relationship between the positivity of specific seroreactivity and disease location in a univariate analysis. Only anti-glycan ALCA antibodies were statistically associated with an increased risk of colonic [L2] or ileocolonic [L3] CD, according to the Montreal classification [OR = 2.77 [1.08–7.08], $p = 0.0334$]. In UC, we failed to detect any association between anti-glycan seroreactivity and disease location. We further investigated the relationships between antibodies and IBD behaviour and we failed to detect any significant difference in the levels of expression of anti-glycan antibodies with regard to disease phenotype. According to disease duration, we were also not able to show a significant differencein

Copyedited by: OUP

Table 1. Demographic and main baseline characteristics of patients and controls

	UC	CD	Controls
Number	88	107	45
Sex ratio[M/F]	55/33	50/57	22/23
Current smoker [*n*, %]	3.4	42.1	
Median age at inclusion, years, [IQ]	49.3 [19–88]	41.3 [20–101]	
Median age at diagnosis years, [IQ]	40.0 [13–79]	32.9 [9–84]	
Median disease duration at inclusion years, [IQ]	10.4 [1–34]	9.4 [1–44]	
Disease location			
Ileal [L1]		14 [19 %]	
Colonic [L2]		12 [15 %]	
Ileocolonic [L3]		52 [66 %]	
Rectum [E1]	15 [18.1 %]		
Distal colitis [E2]	30 [36.1 %]		
Extensive colitis [E3]	38 [45.8 %]		
Disease behaviour			
Non-stricturing and non-penetrating [B1]		61 [58.7 %]	
Stricturing [B2]		28 [26.9 %]	
Penetrating [B3]		15 [14.4 %]	
Perianal disease		22 [21.2 %]	
First-line medications			
Anti-TNF therapy	0 [0 %]	1 [0.9 %]	
Steroids	39 [44.3 %]	73 [68.2 %]	
Immunosuppressants	1 [1.1 %]	8 [7.5 %]	
5-ASA	48 [54.5 %]	25 [23.4 %]	
Concomitant medications			
Anti-TNF therapy	7 [8 %]	19 [17.8 %]	
Steroids	54 [61.4 %]	86 [80.4 %]	
Immunosuppressants	21 [23.9 %]	50 [46.7 %]	
Steroid dependent	60 [68.2 %]	74 [69.2 %]	
Steroid refractory	30 [34.1 %]	18 [16.8 %]	
IBD-related surgery	12 [13.6 %]	41 [38.3 %]	

IQ, interquartile range; anti-TNF, anti tumour necrosis factor; 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; IBD, inflammatory bowel disease.

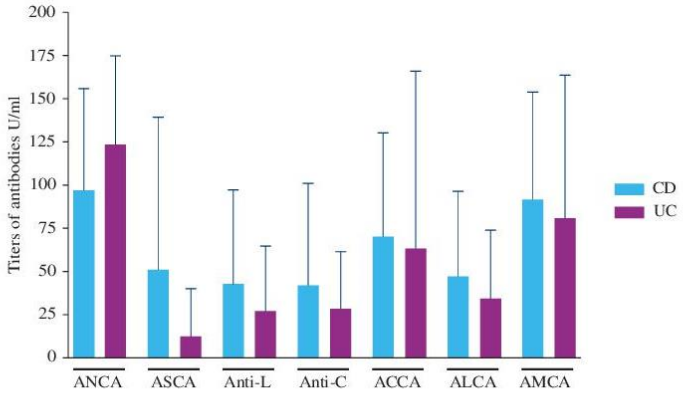


Figure 1. Serum levels of the panel of anti-glycan antibodies in CD and UC patients. Histogram represents the mean ± SD of serum titre [U/ml] for each antibody in CD patients [white bar] and in UC patients [black bar]. CD, Crohn's disease; UC, ulcerative colitis.

term of positivity of antibodies between the patients in whom the disease had evolved for more than 10 years [$n = 76$] or for less than 10 years [$n = 119$]. Moreover, we compare the presence of each antibody in early IBD [less than 2 years' duration; $n = 28$] and very long duration of IBD [more than 10 years; $n = 76$]. No significant difference between these two groups was reported

Considering IBD-related therapy, we have investigated the relationship between the presence of specific anti-antibodies detected

Copyedited by: OUP

in the cohort and the need for IBD-related surgery. Among all the panel of tested antibodies, only AMCA antibodies tended to be associated with higher risk of CD-related surgery with an odds of 2.1 [0.8–5.1] but the level of significance was not reached [p = 0.10]. We analysed the potential association between the panel of anti-glycan antibodies and the presence of steroid-dependency. Among the 195 IBD patients, 134 experienced a steroid-dependency [74 CD and 60 UC], and only the presence of ACCA was significantly associated with a higher prevalence of steroid dependency [OR = 2.9 [1.2–6.7], p = 0.01] using predetermined manufacturers' thresholds. Given that the thresholds of positivity of antibodies were not specifically defined according to the criterion of steroid-dependency, a ROC curve was further constructed to determine the optimal cut-off points for each anti-glycan antibody. So titres of ACCA antibody higherer than 51.7 U/ml and higher than 31.8 U/ml for anti-laminarin antibody were significantly associated with a higher risk of steroid-dependency [OR = 2.0 [1.0–4.0], p = 0.030 and OR = 2.4 [1.1–5.2], p = 0.023, respectively, for ACCA and anti-laminarin]. The combination of the positivity for ACCA and anti-laminarin antibodies had an AUC of 0.65 and is associated with whether patients have experienced a steroid-dependency in their past medical history. In addition, there was no association between any antibodies and loss of response under anti-TNF treatment [data not shown].

3.4. Association between anti-glycan antibodies and the severity during the disease course

We further investigated the relationships between seroreactivity directed against glycan and the severity of IBD. First, we analysed individually in a univariate analysis all serological markers with each clinical associated parameter for severe IBD [disease behaviour, first medications, concomitant medications, perianal disease, IBD-related surgery, pancolitis, and steroid dependence/refractory response; data not shown]. In this first-step analysis, only anti-laminarin antibodies were significantly associated with perianal disease (p = 0.048, 0.26 [0.07; 0.96]). For other anti-glycans, we observed only trends in the association with clinical parameters such as surgery or treatments due to the lack of power in those groups. So we pooled all clinical parameters related to severe illness to continue our analysis. According to the severe disease criteria defined below, 68 CD patients [63 %] and 44 UC patients [50 %] were reported to have had a disease considered as 'severe'. Using manufacturers' cut-offs, we found that a significant number of patients with severe CD had positive ASCA and anti-glycan AMCA antibodies [n = 32 and n = 35, respectively] when compared with the number of patients who had none of the predefined criteria of severity in their past medical history disease [n = 8 and n = 8, p = 0.011 and p = 0.003, respectively]. In CD, ASCA and AMCA antibodies had the best validity for association with a non-severe course, stable from severe disease, with an AUC of 0.63 for ASCA and 0.65 for AMCA antibodies. If we combined both antibodies, we obtained a better diagnostic precision with an AUC of 0.71. In UC, we failed to detect any significant difference between the positivity of all antibodies tested and disease severity. The associations between individual antibody according to manufacturers' cut-off point and disease severity are summarised in Table 2 for CD and Table 3 for UC. Figure 2 represents the titres of each antibody measured in CD and UC patients according to disease severity.

We finally constructed several ROC curves to define optimal cut-off values to discriminate with the best accuracy a severe from a non-severe disease course using anti-glycan antibodies. For CD, we found that ASCA, ACCA, and AMCA antibodies were the best serological markers to diagnose severe CD with an AUC of 0.68 for ASCA, 0.66 for ACCA, and 0.68 for AMCA antibodies [Table 4]. The thresholds defined with ROC curves and the performances obtained for each antibody tested in CD are summarised in Table 4. A titre of antibody higher than the threshold of 63 U/ml for ASCA, 50.7 U/ml for

Table 2. Statistical analysis of all individual antibodies according to the severity of CD [manufacturers' cut-off].

	Severe CD n=68	Non severe CD n=39	Univariate analysis	Multivariate analysis
ANCA	19 [28.4 %]	6 [15.4 %]	p=0.1346	-
ASCA	32 [47.8 %]	8 [20.5 %]	3.54 [1.42;8.83] p=0.0066	3.41 [1.32;8.82] p=0.0114
Anti-laminarin	22 [32.8 %]	12 [30.8 %]	1.10 [0.47;2.57] p=0.8260	-
Anti-chitin	22 [32.8 %]	6 [15.4 %]	2.69 [0.98;7.37] p=0.0545	1.11 [0.31;3.96] p=0.8733
ACCA	27 [40.3 %]	7 [17.9 %]	3.09 [1.19;8.00] p=0.0204	2.30 [0.82;6.48] p=0.1142
ALCA	21 [31.3 %]	10 [25.6 %]	1.32 [0.55;3.21] p=0.5343	-
AMCA	35 [52.2 %]	8 [20.5 %]	4.24 [1.7;10.56] p=0.0019	4.10 [1.6;10.50] p=0.0033

CD, Crohn's disease; ANCA, mannobioside IgG antibodies; AMCA, anti-chitobioside IgA antibodies; ACCA, anti-laminaribioside IgG antibodies; ASCA, anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies; ALCA, anti-laminaribioside IgG antibodies.

Table 3. Statistical analysis of all the antibodies according to the severity of ulcerative colitis [UC] course [manufacturers' cut-off].

	Non severe UC n=44	Severe UC n=44	Univariate analysis	Multivariate analysis
ANCA	23 [52.3 %]	19 [43.2 %]	p=0.3939	-
ASCA	3 [6.8 %]	2 [4.5 %]	-	-
Anti-laminarin	4 [9.1 %]	7 [15.9 %]	-	-
Anti-chitin	8 [18.2 %]	5 [11.4 %]	-	-
ACCA	10 [22.7 %]	5 [11.4 %]	2.29 [0.71;7.37] p=0.1635	-
ALCA	12 [27.3 %]	5 [11.4 %]	2.92 [0.93;9.17] p=0.0658	-
AMCA	17 [38.6 %]	9 [20.5 %]	2.45 [0.95;6.34] p=0.0650	-

UC, ulcerative colitis; ANCA, mannobioside IgG antibodies; AMCA, anti-chitobioside IgA antibodies; ACCA, anti-laminaribioside IgG antibodies; ASCA, anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies; ALCA, anti-laminaribioside IgG antibodies.

Copyedited by: OUP

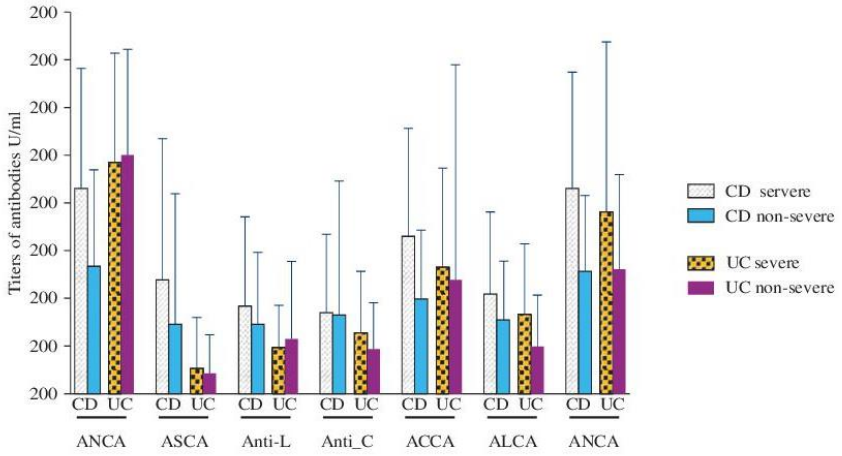


Figure 2. Serum levels of the panel of anti-glycan antibodies in CD and UC patients according to the disease stability status. CD, Crohn's disease; UC, ulcerative colitis. Histogram represents the mean ± SD of serum titre [U/ml] for each antibody in CD patients who experienced a severe [grey bar] or a stable disease [white bar] and in UC patients who experienced a severe [small black bar] or a stable disease [black bar].

Table 4. Optimal thresholds according to ROC curves and subsequent accuracies for each antibody tested according to the severity of the disease course in CD.

Antibody	Best threshold U/ml	Sensitivity %	Specificity %	AUC
ASCA	> 63	65.7	71.8	0.687
Anti-laminarin	> 16.1	88.1	43.6	
Anti-chitin	> 35.7	41.8	79.5	
ACCA	> 50.7	67.2	69.2	0.669
ALCA	> 19.4	83.6	43.6	
AMCA	> 77.4	64.2	74.4	0.680

ROC, receiver operating characteristic, CD, Crohn's disease; AUC, area under the curve; AMCA, anti-chitobioside IgA antibodies; ACCA, anti-laminaribioside IgG antibodies; ASCA, anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies; ALCA, anti-laminaribioside IgG antibodies.

ACCA and 77.4 U/ml for AMCA antibodies, was significantly associated with severe disease (OR = 3.5 [1.37–9.2], $p = 0.0009$; OR = 2.8 [1.12–7.39], $p = 0.027$; and OR = 4.3 [1.69–11.03], $p = 0.0022$, respectively, for ASCA, ACCA, and AMCA antibodies). The combination of thethree3 antibodies [ASCA, ACCA, and AMCA] improved the diagnosis value associated with severe CD course with an AUC of 0.79. Regarding UC, a similar analysis was performed and we could identify that values of ACCA or AMCA antibodies higher than a threshold of 25.5 U/ml and 52 U/ml, respectively, were significantly associated with a severe UC course (OR = 3.0 [1.0–9.1], $p = 0.045$ and OR = 3.4 [1.0–6.9], $p = 0.045$, respectively, for ACCA and AMCA antibodies). With the new thresholds, the AUC was 0.62 for ACCA and 0.63 for AMCA antibodies. The combination of the two antibodies [ACCA and AMCA] slightly improved the diagnostic value of these two markers, with an AUC of 0.67.

4. Discussion

The present cross-sectional study clearly highlights the value of novel anti-glycan antibodies in the setting of disease diagnosis, differentiation between CD and UC, disease behaviour and severity based on the presence of various criteria in their past medical history in patients with IBD. The determination of ALCA, AMCA, and anti-laminarin antibody status may be useful to distinguish between CD and healthy controls, and the presence of ALCA and AMCA antibodies were found more often positive in UC when compared with non-IBD controls. The qualitative seroreactivity to AMCA was independently associated with UC, and multivariate analysis revealed that the presence of at least one anti-glycan antibody found positive was significantly associated with IBD. Interestingly, the presence of ALCA antibodies in CD was associated with 2-fold increase in odds of having a colonic or an ileocolonic location.

Our findings confirm those from previous studies reporting the value of anti-glycan for the diagnosis of IBD and for disease differentiation and behaviour and extends the relationships between seroreactivity for anti-glycans and the course of IBD.[9,12,13,14] Few studies are available regarding the relationship between anti-glycan antibodies and the severity of IBD past history. Interestingly, in our cohort, a combination of positive ASCA, AMCA, and ACCA antibodies was preferentially present in patients who had experienced a severe CD course. The ability of the measurement of these three autoantibodies allowed discrimination between patients who met the criteria of severe disease course and those who did not, with good accuracy [AUC = 0.79]. In addition, in UC the presence of both ACCA and AMCA antibodies was associated with a 3-fold increase of severe disease. The need for surgery has been associated with the presence of reactivity to oligomannan ASCA, OmpC, and CBir1. In a multicentere study in a paediatric cohort of CD, reactivity to ASCA, anti-I2, anti-OmpC, and anti-CBir1 was measured early in the course of the disease with more than half of the patients within 3 months of diagnosis. The risk of developing fibrostenosing and internally penetrating CD, two conditions favouring the need for surgery, increased in parallel with seroreactivity to increasing number of antigens.[15] High ASCA levels have also been related with complicated disease behaviour and the requirement of small bowel surgery.[16] Based on the seroreactivity status, if our findings are confirmed in a longitudinal prospective trial in which the antibody status would be determined before the occurrence of disease complications, the development of an aggressive IBD behaviour may be anticipated in case of reactivity to microbial antigens,

Copyedited by: OUP

consequently helping the clinicians to better manage such patients at risk of developing disabling disease. Severe and disabling disease could be associated with an enhanced intestinal permeability consequently favouring seroreactivity to microbial antigens.

Our study has several limitations: the cohort of IBD patients comes from a tertiary referral single –centre, leading to a selection bias; the relative small sample size of the population may have limited the identification of some associations with disease behaviour and severity; the qualitative and quantitative seroreactivity is based on a unique serum sample and assumed that anti-glycan antibodies remain stable over time. A recent longitudinal study from a large IBD cohort has clearly demonstrated that the serological anti-glycan antibodies status remains widely stable over time.[13] Moreover, and regarding the use of anti-glycans for UC diagnosis and association with severity, the low number of UC patients in this study limits the conclusions about the utility of these markers and must be confirmed in a larger number of patients. We also acknowledge that the criteria defining a severe disease course are composite, including heterogeneous parameters, and may be the subject of discussion. However, each of these criteria has been individually recognised as a prognostic factor indicating a more severe history. We focused in the present study on the value of anti-glycan antibodies and therefore the determination of other anti-microbial reactivity, including anti-OmpC, anti-I2, anti-CBir1, was not available even though the impact of a combination of all serological markers, particularly on disease course, would be of paramount interest in patients with IBD. In addition, it was shown that associations of genetic markers, including variants of certain susceptibility genes such as *NOD2*, and seroreactivity to microbial antigens, are linked since a defect in innate immunity can lead to an enhanced adaptive immune response. NOD2 genotype and seroreactivity were both involved in determining the probability of developing fibrostenosing CD.[17] Moreover, the observational design of our study allows reporting only of an association and not a prediction or causality.

Despite a large panel of confounders in our logistic regression analyses, anti-glycan antibodies remained independently associated with severe disease, as well in CD as in UC. The determination of anti-glycan antibody markers may help clinicians to classify patients into a population at high risk for developing a disabling disease course.

In conclusion, a combination of seroreactivities to different cell surface glycans may represent a non-invasive and valuable tool to identify certain IBD patient subgroups that have experienced a severe disease. Longitudinal prospective studies are lacking to confirm these findings and to assess whether the early detection of anti-glycans may predict the course of the disease and impact on the therapeutic management of the patients.

Supplementary Data

Supplementary data are available at *ECCO-JCC* online.

AQ4 ## Funding

None

Acknowledgements

The whole study was conceived and designed by SP, GB, SN, and XR. Statistical analyses were performed by SP, EP, and GB. All authors were involved in the interpretation of results and discussion. SP, GB, SN, and XR drafted the manuscript, which was critically revised by all the authors. All authors also approved the final version of the manuscript. Guarantor of the article: SP. Conflicts of Interest: The authors disclose the following: for SP, MR, GB, E P, JB, AM, LC, CG, JMP, no conflict of interest; For XR, lecture and consulting fees from Merck. http://ecco-jcc.oxfordjournals.org/lookup/suppl/doi:10.1093/ecco-jcc/jjv063/-/DC1

References

1. Prideaux L, De Cruz P, Ng SC, *et al.* Serological antibodies in inflammatory bowel disease: a systematic review. *Inflamm Bowel Dis* 2012;**18**:1340–55.
2. Arnott ID, Landers CJ, Nimmo EJ, *et al.* Sero-reactivity to microbial components in Crohn's disease is associated with disease severity and progression, but not NOD2/CARD15 genotype. *Am J Gastroenterol* 2004;**99**:2376–84.
3. Ferrante M, Henckaerts L, Joossens M, *et al.* New serological markers in inflammatory bowel disease are associated with complicated disease behaviour. *Gut* 2007;**56**:1394–403.
4. Mow WS, Vasiliauskas EA, Lin YC, *et al.* Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;**126**:414–24.
5. Targan SR, Landers CJ, Yang H, *et al.* Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005;**128**:2020–8.
6. Dotan I, Fishman S, Dgani Y, *et al.* Antibodies against laminaribioside and chitobioside are novel serologic markers in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006;**131**:366–78.
7. Papp M, Altorjay I, Dotan N, *et al.* New serological markers for inflammatory bowel disease are associated with earlier age at onset, complicated disease behavior, risk for surgery, and NOD2/CARD15 genotype in a Hungarian IBD cohort. *Am J Gastroenterol* 2008;**103**:665–81.
8. Papp M, Altorjay I, Norman GL, *et al.* Seroreactivity to microbial components in Crohn's disease is associated with ileal involvement, noninflammatory disease behavior and NOD2/CARD15 genotype, but not with risk for surgery in a Hungarian cohort of IBD patients. *Inflamm Bowel Dis* 2007;**13**:984–92.
9. Rieder F, Schleder S, Wolf A, *et al.* Serum anti-glycan antibodies predict complicated Crohn's disease behavior: a cohort study. *Inflamm Bowel Dis* 2010;**16**:1367–75.
10. Elliott PR, Lennard-Jones JE, Hathway N. Simple index of Crohn's disease activity. *Lancet* 1980;**1**:876.
11. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, *et al.* The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;**55**:749–53.
12. Rieder F, Hahn P, Finsterhoelzl L, *et al.* Clinical utility of anti-glycan antibodies in pediatric Crohn's disease in comparison with an adult cohort. *Inflamm Bowel Dis* 2012;**18**:1221–31.
13. Rieder F, Lopez R, Franke A, *et al.* Characterization of changes in serum anti-glycan antibodies in Crohn's disease a longitudinal analysis. *PLoS One* 2011;**6**:18172.
14. Rieder F, Schleder S, Wolf A, *et al.* Association of the novel serologic anti-glycan antibodies anti-laminarin and anti-chitin with complicated Crohn's disease behavior. *Inflamm Bowel Dis* 2010;**16**:263–74.
15. Dubinsky MC, Lin YC, Dutridge D, *et al.* Serum immune responses predict rapid disease progression among children with Crohn's disease: immune responses predict disease progression. *Am J Gastroenterol* 2006;**101**:360–7.
16. Vasiliauskas EA, Plevy SE, Landers CJ, *et al.* Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Crohn's disease define a clinical subgroup. *Gastroenterology* 1996;**110**:1810–9.
17. Ippoliti AF, Devlin S, Ynag H, *et al.* The relationship between abnormal innate and adaptive immune function and fibrostenosis in Crohn's disease patients. *Gastroenterology* 2006;**130**[Suppl 2]:A24.

Résultats et discussion

Dans les MICI, un panel de marqueurs sérologiques ciblant des antigènes bactériens a également été dosé chez 107 patients présentant une maladie de Crohn et 88 atteints d'une rectocolite hémorragique. L'exposition intestinale à des phénomènes de translocation bactérienne peut être à l'origine du maintien de l'inflammation dans les MICI. Les anticorps anti-glycans sont le reflet de formes très sévères de cette pathologie, avec une importante perméabilité intestinale. Les anti-glycans de type ACCA et les anti-laminarines étaient associés à une dépendance aux stéroïdes chez ces patients. L'association anticorps anti-AMCA et ASCA indiquait plutôt une instabilité de la maladie de Crohn et les anti-AMCA et ACCA une instabilité de la rectocolite hémorragique. Ces anticorps étaient liés aux formes sévères de la maladie et donc nécessitant le recours à un traitement par anti-TNF. Par contre, aucune association avec des phénomènes de résistance n'a pu être établie.

Compte tenu du rôle reconnu de la flore commensale dans la régulation du système immunitaire, il n'est pas surprenant que ce microbiote soit également capable d'engendrer des réactions auto-immunitaires. Bien que la recherche actuelle démontre l'importance des bactéries commensales dans le développement des maladies auto-immunes, la compréhension des mécanismes sous jacents se heurte à plusieurs difficultés : l'énorme complexité de cette flore commensale, l'implication de communautés bactériennes plus que d'une seule lignée en particulier, la sensibilité de cette flore aux agresssions environnementales (alimentaire, chimique, biologique) et la multiplicité des récepteurs anti-microbiens de l'hôte[513]. Les glycans ont l'avantage d'être retrouvés sur la membrane de nombreuses bactéries et levures commensales ou pathogènes, de virus et de certaines cellules (érythrocytes, cellules immunitaires). Une forte immunisation envers ces polysaccharides permet d'avoir un reflet indirect du passage de cette flore à travers l'épithélium intestinal, sans distinction de lignées ou d'espèces bactériennes.

La stabilité de ces anticorps dans le temps a été peu étudiée mais le status sérologique semble relativement stable avec un pourcentage faible de changement dans le temps. Des variations importantes des taux d'anticorps ont été constatées chez un même patient sans que le statut ne change. L'apparition de la première complication ou de la première chirurgie liée à la MC, une maladie active ou le début d'un traitement immunosuppresseur n'influence pas la réponse immunitaire globale ou les taux d'anticorps de manière individuelle. Les taux avant événements n'étaient pas différents des taux après événements[514]. Même si les anti-glycans pourraient associés à la perméabilité intestinale, il existe à ce jour peu de données concernant l'évolution du statut sérologique et du taux des Ac anti-glycans en lien avec le traitement de la maladie. Plusieurs études n'ont pas retrouvé d'associations entre les anti-glycans et les traitements[515]. Les gASCA pourraient être liés à une résistance aux stéroïdes. Dans la même étude, la positivité des marqueurs sérologiques (AMCA, ACLA, ACCA) ne préjugeait pas de la réponse à court terne (8 semaines) après induction d'un traitement par infliximab[327], consolidant les résultats retrouvés dans notre étude. De plus, dans un sous groupe de 26 patients MC ayant obtenu une amélioration de leur score CDAI de plus de 70 points, la grande majorité des patients n'ont pas eu de variation de leur taux d'anticorps anti-glycans[329].

A l'heure actuelle, ces nouveaux anticorps ne peuvent donc pas être recommandés dans le monitoring des patients sous infliximab et des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer leur intéret dans la réponse thérapeutique. Nous sommes donc en train de réévaluer à 2 ans les profils immunologiques des patients de cette première étude et ainsi pouvoir les comparer, grâce à un financement AOL 2013. En cas de changement de statut de certains anticorps, la recherche de facteurs associés (cliniques, biologiques ou thérapeutiques) sera pratiquée. En cas de négativation des anticorps anti-glycans, l'hypothèse pourrait être le témoin d'une diminution ou d'une normalisation de la perméabilité intestinale accrue dans les MICI.

Toutefois, ces anticorps anti-glycans sont associés à la progression vers une forme sévère de la maladie, ce qui pourrait être utile dans l'établissement du pronostic des MICI. De plus, bien que leur sensibilité soit faible, la combinaison de plusieurs anti-glycans pourrait améliorer la précision du diagnostic[515].

Résultats 2 : Implication de *Porphyromonas gingivalis* dans la PR et dans son traitement

Introduction

De nombreux germes sont présents au niveau de la plaque dentaire et peuvent être responsable de la maladie parodontale, comme *PG (PG), Prevotella intermedia (P. intermedia), Prevotella melaninogenica* et *Bacteriodes forsythus*. Chez les patients ayant une PR, les taux sériques d'anticorps dirigés contre ces bactéries sont 2 fois plus élevés que chez les sujets contrôles[412]. L'ADN de plusieurs bactéries parodontales a même été détecté au niveau de la plaque dentaire de tous les patients PR dépistés, de même que dans le liquide synovial. *P. intermedia* et PG étaient les 2 espèces majoritairement retrouvés dans ces prélèvements[411]. Les patients PR ont un taux de positivité en ADN de PG plus élevé dans le tissu synovial comparé aux sujets contrôles. De plus, les patients PR portant l'allèle HLA DRB1 04 avaient une présence plus importante de PG dans la synovial que les patients PR ne détenant pas cet allèle[516]. Plusieurs études ont confirmé la présence de titres élevées d'anticorps anti- *PG* dans des populations de PR ou de leur famille[461]. D'ailleurs, une corrélation entre le titre élevé des anticorps contre *PG* et les concentrations des anticorps anti-CCP et de la CRP a également été décrite[517]. Une des hypothèses liant PG et la PR serait sa capacité à citrulliner les protéines bactériennes et de l'hôte. Cette citrullination est favorisée par la présence de protéases de type gingipains exprimées par cette bactérie qui clivent les protéines de la gencive au niveau des résidus d'arginine. Ces protéines ainsi modifiées ont des propriétés biochimiques et antigéniques différentes. L'accumulation de ces protéines pourrait engendrer, chez des personnes génétiquement prédisposées, une rupture de tolérance du système immunitaire et la production d'auto-anticorps envers les antigènes citrullinés endogènes, participant alors à l'atteinte articulaire.

PG a également démontré son rôle dans la production de certaines métalloprotéinases dans le tissu parodontal, notamment les MMP 1, 2, 3, 9 et 13. La protéine MMP-3 était surexprimée lorsque le LPS penta acylé de PG était mis en présence de fibroblastes gingivaux[518]. Cette augmentation de la production de MMP-3 est observée dans les états inflammatoires chroniques telles la PR et la parodontopathie qui entraînent la dégradation excessive des tissus conjonctifs adjacents. La MMP-3 est considérée comme un biomarqueur de destruction dans la PR et la maladie parodontale.

Bien que de nombreuses études pointent l'importance de PG dans la physiopathologie de la PR, aucune donnée n'est diponible à l'heure actuelle sur la stabilité de ces anticorps chez des patients PR, ni sur leurs potentielles intéractions avec un traitement anti-TNF. Cette étude a donc permis d'évaluer l'évolution des sérologies bactériennes ainsi que d'autres marqueurs de sévérité de la PR (incluant MMP-3) lors d'un suivi pendant 6 mois de patients PR traités par infliximab.

Article

Impact of severe periodontal disease on rheumatoid arthritis severity and response to infliximab

Rinaudo-Gaujous M[1], Miossec P[2], Moreau A[1], Blasco-Baque V[3], Dénarié D[4], Gaudin P[5], Farge P[6], Genin C[1], Thomas T[4], Paul S[1*], and Marotte H[4*].

(1) GIMAP EA3064, Laboratory of Immunology and Immunomonitoring, CIC CIE3 Inserm Vaccinology, Hôpital Nord, CHU Saint-Etienne, France

(2) Clinical Immunology Unit, Departments of Immunology and Rheumatology, Hôpital Edouard Herriot, CHU Lyon, France

(3) Institute of Cardiovascular and Metabolic Diseases, CHU Rangueil, France

(4) Department of Rheumatology, Hôpital Nord, CHU Saint-Etienne, France

(5) Grenoble Teaching Hospital, CHU Hôpital Sud, Echirolles, France

(6) Faculty of Odontology, University Lyon I, Lyon, France

* The authors contribute equally to this work

All authors declare to have no financial disclosure related to this work.

Corresponding author:
Hubert Marotte
Department of Rheumatology, Hôpital Nord
University Hospital Saint-Etienne
42055 Saint-Etienne Cedex 02France
Phone: 33-477-12-76-43
Fax: 33-477-12-75-77
e-mail: hubert.marotte@chu-st-etienne.fr

Abstract

Objectives: This study focused on some biological markers of severe periodontal disease (PD) including matrix metalloproteinase 3 (MMP-3), *Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis)* and *Prevotella intermedia (P. intermedia)* serologies. These biomarkers were evaluated for markers of rheumatoid arthritis (RA) severity and predictive markers to infliximab response.

Methods: We enrolled 101 established RA patients requiring infliximab therapy. Clinical data including DAS28 were assessed before and at 6 months of infliximab therapy. Blood sample were collected at the same time for determination of ACPA, MMP-3, anti-*P. intermedia* (whole extract), and anti-*P. gingivalis* (LPS and whole extract) specific antibodies by specific ELISA.

Results: At baseline, ACPA levels were associated with anti-*P. gingivalis* LPS-specific antibody levels ($P<0.01$) and anti-*P. gingivalis* whole extract antibody levels ($P<0.01$). Anti-*P. gingivalis* antibody levels were not significantly correlated with clinical, biological, or destruction parameters of RA disease. DAS28 and inflammation markers (CRP and ESR) decreased during infliximab therapy ($P<0.05$). Furthermore, ACPA and MMP-3 levels decreased at 6 months of infliximab therapy, whereas *P. gingivalis* and anti-*P. intermedia* antibody levels increased. Presence of anti-*P. gingivalis* antibodies at baseline did not influence clinical treatment outcome, but high baseline MMP-3 levels and a decrease of ACPA at 6 months were associated with infliximab efficacy.

Conclusions: Anti-*P. gingivalis*is correlated with ACPA at baseline suggesting a role of periodontal infection in RA pathogenesis. Unlike anti-*P. gingivalis* antibody levels**,** MMP-3 levels can be a useful marker to predict clinical infliximab response in RA patients as well as ACPA evolution during treatment.

Keywords: Rheumatoid arthritis, *Porphyromonas gingivalis*, periodontal disease, MMP-3, infliximab

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is the most frequently chronic inflammatory joint disease characterized by joint and bone destruction, affecting mainly distal joints [1]. Associations between RA and periodontal disease (PD) susceptibility and severity were already described by epidemiological studies [2]. Both diseases (RA and PD) share important similarities in their pathogenesis involving similar genetic background or production of large amount of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF) and interleukin-1 beta [3]. Environmental factors are also critical for these both diseases. For instance, some bacterial colonization was already described in the gut in RA patients [4]. For PD, inflammation is initiated and perpetuated by a subset of bacteria, including *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) and *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), two specific gram-negative anaerobic bacteria, which colonize the gingival sulcus and proliferate in the gingival plaque. The resulting chronic inflammatory response by the host induces destruction of the supporting structures of the teeth defining severe PD. *P. gingivalis* seems to be specific of severe PD. The hallmark of RA is bone and cartilage damage induced by chronic joint inflammation [5]. Furthermore, autoimmunity plays a critical role with anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) are highly specific marker for RA diagnosis and prognosis [1] and was recently described to induce osteoclasts activation [6]. Citrullinated proteins are carried out by endogenous peptidyl-arginine deiminases (PADs). These enzymes catalyze the conversion of peptidyl-arginine to peptidyl-citrulline, which is essential for many physiological processes [7]. However, PAD catalyzed protein citrullination also occurs under pathological inflammatory conditions like necrosis and has been linked to the breakdown of immune tolerance to citrullinated proteins leading to induction of RA in susceptible individuals [8]. Recent findings indicate that infection with *P. gingivalis* precedes RA and that the bacteria is a likely factor for initiation and maintenance of the autoimmune inflammatory responses that occur in RA [9]. In this respect, presence of *P. gingivalis* PAD (PPAD), a specific enzyme of *P. gingivalis* but absent in other prokaryotes [10], may have a profound impact on the development and progression of RA *via* citrullination of proteins to generates neo-epitopes

[11]. Furthermore *P. gingivalis* secretes also cysteine proteinases reducing large to small peptides [11]. These two properties induced small immunogenic citrullinated host proteins in gingival cells [11] and brought a rupture of tolerance by ACPA production. Indeed, anti-*P. gingivalis* antibody levels are higher in a cohort of established RA patients than in healthy individuals. They also correlated with ACPA [12,13]. Anti-*P. gingivalis* antibodies were also detected in the gingival crevicular fluid of severe PD patients [14]. Recent data suggested a strong association between sera antibodies anti-*P. gingivalis* and the bacteria itself in the subgingival detected by PCR [15]. Furthermore, *P. gingivalis* DNA has been identified in the synovial tissue and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from RA patients [16]. Other antibodies to anaerobic periodontal pathogens such as *P. intermedia* have also been detected both in the serum and synovial fluids of RA patients [13][17]. However, these other oral pathogens lack expression of PAD. So their roles in RA induction are reduced.

Since the T-4 study [18], interest for strong monitoring using matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) levels in RA patients has been demonstrated to improve clinical response and reduce joint destruction. MMP-3 is one of the major MMPs expressed in rheumatoid synovial tissue [19] and is mainly secreted by fibroblasts, chondrocytes, macrophages and by the synovial lining cells [20]. Having the ability to digest components of extracellular matrix, MMP-3 also participates to bone and cartilage degradation in RA and bone destruction in PD [21]. *P. gingivalis* can induced MMP-3 in human gingival fibroblasts [22]. Thus, MMP-3 was already considered as a biomarker for RA and PD destruction [23,24].

In both PD and RA, production of proinflammatory cytokines, as TNF, is increased. Since more than one decade, specific blocking of TNF improves two-third of patients [25]. Only few studies have reported predictive factors of response to infliximab [26], but no relevant clinical or biological markers can be used in daily practice. In only one previous study, PD was related to be a predictive factor for a non-response to TNF blocker therapy in RA patients [27]. Persistence of pathogens such as *P. gingivalis* in gingival tissue could participate to maintain local and systemic inflammation responsible in treatment resistance.

The aim of our study was to assess PD-specific biomarkers for RA severity assessment. In addition, the usefulness of these biomarkers (MMP-3, anti-*P. gingivalis* and anti-*P. intermedia* antibodies) were assessed for prediction of clinical response to infliximab therapy.

Patients and methods

Patients and healthy controls

One hundred one RA patients were included consecutively from three university hospitals (Edouard Herriot, Lyon; Grenoble; and Saint-Etienne) between April 2001 and 2003. Clinical indices of disease activity included age, sex, disease duration, patient's global assessment of disease activity, and 28 joint tender and swollen joint counts. All patients were treated with methotrexate. Biological data included erythrocyte sedimentation rate (ESR), rheumatoid factor (RF), and ACPA. The 28 joint disease activity score (DAS28) was calculated. Joint damage was defined by a right Larsen wrist score ≥ 2, as previously used [28]. Severe PD was defined by periodontal bone destruction according to the Hugoson and Jordan criteria, as previously used [28]. Wrist X-rays were examined by the same reader (HM) as panoramic X-rays (PF). The intra-reader variability, as assessed by the correlation coefficient was 0.96. Blood samples were collected in 79 patients before and at 6 months of infliximab therapy for measurement of ACPA, rheumatoid factor (RF), MMP-3, and anti-*P. gingivalis* and anti-*P. intermedia* antibodies. All RA patients were treated with infliximab and followed for 6 months. Clinical response to infliximab was defined by a decrease of DAS28> 1.2. Twenty seven blood healthy donors were enrolled as control healthy volunteers. Local clinical ethics committee approved the protocol and all patients gave their written informed consent.

Methods

Determination of anti-*P. gingivalis* and anti-*E. coli* LPS-specific antibodies by ELISA

To optimize our evaluation, *P. gingivalis* ELISA assay was standardized both on extract and LPS components. Lipopolysaccharide (LPS) from *P. gingivalis* or *E. coli* (InvivoGen, San Diego, California, USA) was coated on 96-well plates (Nunc, Dominique Dutscher, Brumath, France) at 10 µg/ml (diluted in carbonate buffer, pH 9.6) and incubated overnight at 4°C.

Wells were washed three times with phosphate buffered saline (PBS)-Tween (0.005%). Plasma were diluted to 1:600 in PBS containing 1% of bovine serum albumin (BSA) and incubated (in duplicate) for 2 hours at room temperature. Plates were washed as described above and incubated with peroxidase-conjugated goat anti-human IgG H+L (Jackson ImmunoResearch, Pennsylvania, USA) (diluted 1:50 000 in PBS) for 2 hours at room temperature. After a final wash, detection was made by tetramethylbenzidine substrate (R&D Systems, Minneapolis, USA). The reaction was stopped by the addition of $1M H_2SO_4$ solution, and absorbances were measured at 450 nm.

Determination of anti-*P. gingivalis* and anti-*P. intermedia* whole extract antibodies by ELISA

P. gingivalis strain ATCC 33277 and *P. intermedia* CIP 103607 were grown on sterile non-selective agar containing defibrinated sheep blood, supplemented with 0.0002% menadione sodium bisulfite and 0.4% hemin chloride. Cultures were then placed in an anaerobic chamber for 7 days at 37°C. Then, colonies were recovered in a sterile water solution and centrifuged for 20 min at 5000G. Pellets were diluted in sterile PBS at a concentration of 50 mg/ml and were frozen at -20°C until use. *P. gingivalis* or *P. intermedia* solution was then washed twice with carbonate buffer (pH 9.6) and diluted in the same buffer to obtain a solution of 1 McFarland (DensiCHEK plus, Biomérieux, France). The solution was heated to 60°C for 45 min, filtered (0.22µm), diluted 1:10, coated on a 96-well plate and then incubated overnight at 4°C. Plasma were diluted to 1:900 in PBS containing 1% BSA. Following steps are identical to those described for the LPS-specific ELISA. Cut-off values for seropositivity to *P. gingivalis (LPS and whole extract)* and *P. intermedia* were determined by level values higher than the 95th percentile in 27 blood healthy donors.

Homemade ELISA calibration

A calibration curve was systematically done for each plate with dilutions of a pool of positive plasma diluted 6 times from 1:100 to 1:16200 to correct for plate-to-plate variation. Two plasma controls (high and low positives) were included on all plates. All intra assay

coefficients of variation (CV) were below 6.5%. Inter assay CV for the high positive control were 13%, 8%, and 28% for *P. gingivalis* whole extract and LPS assay and for *P. intermedia* assay, respectively. Results are expressed in Arbitrary Units (AU) defined by the pool dilution (10 AU=1:16200 to 2430 AU=1:100).

Assessments of ACPA, RF, and MMP-3

MMP-3 blood levels were determined by commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method (AESKUDIAGNOSTICS, Wendelsheim, Germany). ACPA and RF (IgA and IgM) were measured by ELIA method on ImmunoCap 250 (Phadia, Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden). ACPA were considered to be positive at a cut off value of 10 U/mL, RF IgA at 14 IU/ml and RF IgM at 3.5 IU/ml as recommended by the manufacturer.

Statistical analysis

Since data were not normally distributed, they were expressed as median and interquartile range 25%-75% [IQR 25-75] or number (%). Correlations were performed by Spearman tests. Comparisons between controls and RA patients were performed by Mann Whitney test. Comparisons between baseline and 6 months of infliximab treatment were performed by Wilcoxon test. Statistics were done with the software GraphPad Prism (version 5.0). P values less than 0.05 were considered as statistically significant.

Results

RA population

Our RA population has the main characteristics of RA patients treated with TNF inhibitors as reported in the Table 1. The median [IQR 25-75] age was 52.9 [43.2-59.4] years. Patients were predominantly women (77%) with disease duration of 9 [5-17] years and 78.48% were ACPA positive. Most patients had an active disease with a DAS28 at 5.3 [4.7-6.1] despite methotrexate treatment. In this cohort, severe PD was present in 62 and severe PD was associated with joint damage (χ^2 test = 3.9; P<0.05).

Immunity against oral pathogens is related RA

Anti-*P. gingivalis* whole extract antibodies were more frequently positive in RA patients (97.5%) than in control healthy volunteers (5%). Anti-*P. gingivalis* antibody levels were higher in RA patients (238 [148-377] AU) than in control healthy volunteers (43 [24-79] AU; Fig. 1A; P<0.0001). Same pattern was found with anti-*P. gingivalis* LPS specific antibody (data not shown). Anti-*P. intermedia* whole extract antibodies were also more frequently positive in RA patients (84.8%) than in control healthy volunteers (17.8%; Fig. 1A; P<0.0001). Anti-*P. intermedia* antibody levels was also higher in RA patients (390[131-1558] AU) than in control healthy volunteers (96 [67-179] AU; Fig. 1A; P<0.0001).

Anti-*P. gingivalis* antibody levels determined by LPS and whole extract strongly correlated together (Fig. 1B; P<0.0001). Antibody levels against these two bacteria in RA patients (*P. gingivalis* and *P. intermedia*) also correlated together (Fig. 1C; P<0.0001). Since we observed a correlation between immunity against these two bacteria from the oral cavity, we explored the specificity of our assay. For this purpose, we tested the same plasma against the LPS fraction of Escherichia coli (*E. coli*, another commensal bacterium of the gut). No cross-reaction was observed in our assay since high anti-*P. gingivalis* antibody levels remained negative for anti-*E. coli* antibody (Fig. 1D). As *P. gingivalis* extract may contain citrullinated proteins, we then investigated a putative cross reactivity between ACPA and

anti-*P. gingivalis* antibodies. No citrullinated proteins in *P. gingivalis* extract and LPS fraction was confirmed by ELISA using a monoclonal ACPA specific antibody. In established RA patients, immunity against oral pathogens was higher than in controls reinforcing the possible association between RA and PD as previously described.

Differential implication of P. gingivalis and P. intermedia antibodies in immune response in RA patients

Since high antibody levels against *P. gingivalis* and *P. intermedia* was observed in RA patients, association of these antibodies with clinical and biological RA parameters was investigated. At baseline, anti-*P. gingivalis* or anti-*P. intermedia* antibodies were not significantly correlated with clinical RA or PD parameters. Only RF IgA was correlated with DAS28 at baseline (Fig.2A; $P<0.01$). Futhermore, ACPA levels correlated with anti-*P. gingivalis* whole extract and LPS-specific antibody levels (Fig. 2B&C; $P<0.001$ and $P<0.01$; respectively), without any correlation with IgM RF. Interestingly, anti-*P. intermedia* antibodies were not correlated with ACPA levels, but with IgM RF levels (Fig. 2D; $P<0.05$). Since only anti-*P. gingivalis* levels correlated with ACPA level, this data reinforced the association between *P. gingivalis* and citrullination in RA.

Joint or periodontal destruction and clinical response

As expected, DAS28 and inflammation markers (CRP and ESR) decreased at 6 months of infliximab treatment (Table 1). DAS28 improvement was similar in RA patients with severe PD (1.8 [0.3-3.1]) compared to RA patients without severe PD (2.3 [0.7-3.3]; not significant). Similarly, DAS28 improvement was equal according to the joint damage status (2.1 [1.2-3.3]) in RA patients with joint damage compared to RA patients without joint damage (1.6 [0.1-3.1]; not significant).

MMP-3 in RA patients treated by infliximab therapy

MMP-3 is already described as a biomarker of bone destruction at periodontal and joint sites. At baseline, MMP-3 was strongly correlated with C-reactive protein (CRP; Fig. 3A; P<0.001). However, MMP-3 levels were not correlated with other common RA biomarkers such as RF (IgA and IgM), ACPA, or anti-*P. gingivalis* antibody levels. During infliximab therapy, MMP-3 levels significantly decreased from 90 [14-259] ng/ml to 45 [10-160] ng/ml (Fig. 3B; P<0.0001). So, infliximab treatment strongly reduced MMP-3 level.

Effect of infliximab treatment on RA and PD biological markers

ACPA levels decreased significantly during infliximab therapy (Fig. 4A; P<0.001) as IgM and IgA RF levels (Fig. 4B; P<0.001). Anti-*P. gingivalis* whole extract antibody levels increased at 6 months of infliximab therapy (Fig.4C; P<0.001). The same increasing for anti-*P. intermedia* antibody levels during infliximab therapy was also observed (Fig. 4D; P<0.05). So, despite decreasing of ACPA and RF induced by infliximab therapy, we observed an increasing of antibody levels against oral bacterial flora.

Biological markers and prediction of clinical response

Among biomarkers evaluated in this study, baseline MMP-3 level was higher in patients with a good response to infliximab (111 ng/ml [49-187]) compared to non-responders (57 ng/ml [29-110]; P<0.05; Fig. 5A). However, neither ACPA levels nor anti-*P. gingivalis* or anti-*P. intermedia* antibody positivity or levels were associated with response to infliximab (Fig. 5B; NS). Interestingly, reduction of MMP-3 during infliximab therapy was higher in responders than in non-responders patients (Fig. 5C; P<0.05). Only a trend was observed for a higher reduction of ACPA in responders compared to non-responders to infliximab (Fig. 5D; P=0.09).

Discussion

Despite description of an association between RA and PD since decade, recent data suggest that *P. gingivalis* could be the missing link between these both diseases. Here, the prevalence of PD in established RA patients (64.5%) was consistent with previous study in early RA [29] and higher than reported in the general population (30-40%) [30]. We also confirmed association between RA and PD severity [31]. Since other anaerobic periodontal pathogens such as *P. intermedia, P. melaninogenica,* or *T. forsythia* are also in the gingival tissue and antibodies against them have been also detected in the serum from RA patients [32]. However, except *P. gingivalis,* these pathogens do not express the PAD enzyme. All these oral bacteria were first described in PD. Among all these bacteria, *P. gingivalis* was reported to be associated to severe form. So we explored various ways to explore antibodies against oral pathogens, *P. gingivalis* and *P. intermedia*.

P. gingivalis is the only bacteria known to induce peptide citrullination process, which may induce autoimmune responses through development of ACPA by molecular mimicry. Previous studies have explored antibodies against *P. gingivalis* in RA patients by using either LPS or whole extract (13,14). LPS is a major macromolecule found on the outer surface of gram-negative bacteria and could participate to elicit immune response against *P. gingivalis*. Immune response against LPS or whole extract of *P. gingivalis* could be different as described on PBMCs [34]. Here, we described for the first time that LPS and bacterial extract specific antibody levels are well correlated together with well standardized immunoassay. Despite many components of *P. gingivalis*, our results suggest that LPS is the major component for immune response induction in RA patients. Since levels of circulating antibodies to *P. gingivalis* are associated with gingival presence of *P. gingivalis* detected by PCR and PD severity, serology determination will be the easiest way to assess presence of PD and *P. gingivalis* [15]. Our assay to measure antibodies against *P. gingivalis* did not cross-react with purified LPS from *E. coli* thus indicating that specific structure of *P. gingivalis* LPS is involved and may activate TLR2 and TLR4 whereas LPS from *E. coli* activates mainly

TLR4 [35]. Use of LPS is more convenient for the setup of an assay, but could induce bias due to distinct commercial batches. The bacterial extract and the LPS used for ELISA were both not citrullinated as no reactivity was found with purified ACPA. Regarding association with RA biomarkers, the two assays were pretty similar when looking for the correlation between ACPA and anti-*P. gingivalis* titration. This strong correlation was also recently observed in early RA patients [36].

Since no LPS for *P. intermedia* is commercially available, we only assessed antibodies against this bacteria by using whole extract. Antibodies against *P. intermedia* and *P. ginigvalis* were higher in RA than in healthy volunteer as previously described in 30 RA patients [32]. At baseline, we confirmed the correlation between *P. gingivalis* and *P. intermedia* antibody titration as well as higher prevalence of these antibodies in RA patients compared to control subjects. Nevertheless, anti-*P. intermedia* antibodies were not correlated with ACPA, but with RF IgM levels. These may indicate a different mechanism of action between these two bacteria in the induction of the immune response. As RF is defined as an antibody against the Fc portion of immunoglobulin, we may hypothesize that *P. gingivalis* and *P. intermedia* do not induce the same isotype of Ig. Since only *P. gingivalis* was correlated with ACPA, this is a new key argument for the specific role of *P. gingivalis* in established RA pathogenesis.

Due to low power of our study, we failed to confirm association between anti-*P. gingivalis* or anti-*P. intermedia* antibodies and presence of severe PD assessed on X-rays. Previously this association was related to *P. gingivalis* and anti-*P. intermedia* antibodies in a severe PD population compared to non-PD disease [37].

As previously described [38], MMP-3 is closely correlated to CRP in RA patients. MMP-3 was already considered as an indicator of inflammation [39] and may reflect more specifically joint destruction in RA [40], as well as dental bone resorption in PD [41]. In human, infliximab was also described to block joint destruction in RA patients with remaining joint inflammation [42].

Inflammatory markers (ESR, CRP) and MMP-3 decreased during infliximab treatment [43]. Both CRP and MMP-3 are regulated through pro-inflammatory cytokines [44] and may explain this correlation and reduction induced by infliximab therapy.

Despite the growing interest for *P. gingivalis* in RA, this was the first observation that anti-*P. gingivalis* antibodies were increasing over time during infliximab therapy. Only a recent study observed a stability of anti-*P. gingivalis* antibody level in 50 early RA patients mainly treated with methotrexate [36]. As previously reported with methotrexate therapy, no patient developed seroconversion for *P. gingivalis* or *P. intermedia* with combination of infliximab and methotrexate. This result would be consistent with a previous study evaluating infliximab effect on PD in 40 RA patients [45]. Infliximab increased gingival inflammation without effect on plaque index suggesting that TNF blockade stop dental bone loss independently to persistence of local inflammation. On the contrary, periodontal treatment conducted in 26 RA patients improved disease activity, but also led to a reduction of *P. gingivalis* antibody and ACPA levels [46].

Only a trend for a reduction of ACPA during infliximab therapy was observed in our study. Some studies have reported a significant decrease of ACPA at least after 24 weeks of treatment [47][48], but this remained controversial [49]. Prediction of TNF response remains a huge challenge and to date no biomarkers can be used in daily practice [26]. However, we observed here that high MMP-3 levels at baseline were associated with a good clinical response. This emphasizes the role of MMP-3 for RA management strategy [18]. Previously, at baseline MMP-3 level was the same in 47 good responders *vs.* 29 non-responders according to response assessed at 14 weeks [50]. MMP-3 role for clinical response prediction should be then confirmed in a larger cohort.

In conclusion, we described that anti-*P. gingivalis* antibody, a biomarker of PD severity, correlated very well with ACPA level and anti-*P. intermedia* antibody. Furthermore, MMP-3, another biomarker of PD and RA severity, is a predictive biomarker of response to infliximab

therapy. Our data reinforce interest of PD in RA pathogenesis and RA therapeutic management. They also confirm the possible involvement of *P. gingivalis* in RA physiopathology.

References

[1] Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. Ann Rheum Dis 2010;69:1580–8. doi:10.1136/ard.2010.138461.

[2] Rutger Persson G. Rheumatoid arthritis and periodontitis - inflammatory and infectious connections. Review of the literature. J Oral Microbiol 2012;4. doi:10.3402/jom.v4i0.11829.

[3] Rosenstein ED, Greenwald RA, Kushner LJ, Weissmann G. Hypothesis: the humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis. Inflammation 2004;28:311–8. doi:10.1007/s10753-004-6641-z.

[4] Newkirk MM, Zbar A, Baron M, Manges AR. Distinct bacterial colonization patterns of Escherichia coli subtypes associate with rheumatoid factor status in early inflammatory arthritis. Rheumatology (Oxford) 2010;49:1311–6. doi:10.1093/rheumatology/keq088.

[5] Boissier M-C, Semerano L, Challal S, Saidenberg-Kermanac'h N, Falgarone G. Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. J Autoimmun 2012;39:222–8. doi:10.1016/j.jaut.2012.05.021.

[6] Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, et al. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. J Clin Invest 2012;122:1791–802. doi:10.1172/JCI60975.

[7] György B, Tóth E, Tarcsa E, Falus A, Buzás EI. Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. Int J Biochem Cell Biol 2006;38:1662–77. doi:10.1016/j.biocel.2006.03.008.

[8] Klareskog L, Rönnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. Annu Rev Immunol 2008;26:651–75. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090244.

[9] Lundberg K, Wegner N, Yucel-Lindberg T, Venables PJ. Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection. Nat Rev Rheumatol 2010;6:727–30. doi:10.1038/nrrheum.2010.139.

[10] Mangat P, Wegner N, Venables PJ, Potempa J. Bacterial and human peptidylarginine deiminases: targets for inhibiting the autoimmune response in rheumatoid arthritis? Arthritis Res Ther 2010;12:209. doi:10.1186/ar3000.

[11] Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen K-A, Lundberg K, et al. Peptidylarginine deiminase from Porphyromonas gingivalis citrullinates human fibrinogen and α-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2010;62:2662–72. doi:10.1002/art.27552.

[12] Hitchon CA, Chandad F, Ferucci ED, Willemze A, Ioan-Facsinay A, van der Woude D, et al. Antibodies to porphyromonas gingivalis are associated with anticitrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis and their relatives. J Rheumatol 2010;37:1105–12. doi:10.3899/jrheum.091323.

[13] Mikuls TR, Payne JB, Reinhardt RA, Thiele GM, Maziarz E, Cannella AC, et al. Antibody responses to Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis) in subjects with rheumatoid arthritis and periodontitis. Int Immunopharmacol 2009;9:38–42. doi:10.1016/j.intimp.2008.09.008.

[14] Harvey GP, Fitzsimmons TR, Dhamarpatni AASSK, Marchant C, Haynes DR, Bartold PM. Expression of peptidylarginine deiminase-2 and -4, citrullinated proteins and anti-citrullinated protein antibodies in human gingiva. J Periodont Res 2013;48:252–61. doi:10.1111/jre.12002.

[15] Mikuls TR, Payne JB, Yu F, Thiele GM, Reynolds RJ, Cannon GW, et al. Periodontitis and Porphyromonas gingivalis in Patients With Rheumatoid Arthritis. Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ) 2014;66:1090–100. doi:10.1002/art.38348.

[16] Totaro MC, Cattani P, Ria F, Tolusso B, Gremese E, Fedele AL, et al. Porphyromonas gingivalis and the pathogenesis of rheumatoid arthritis: analysis of various compartments including the synovial tissue. Arthritis Res Ther 2013;15:R66. doi:10.1186/ar4243.

[17] Moen K, Brun JG, Madland TM, Tynning T, Jonsson R. Immunoglobulin G and A antibody responses to Bacteroides forsythus and Prevotella intermedia in sera and synovial fluids of arthritis patients. Clin Diagn Lab Immunol 2003;10:1043–50.

[18] Urata Y, Uesato R, Tanaka D, Nakamura Y, Motomura S. Treating to target matrix metalloproteinase 3 normalisation together with disease activity score below 2.6 yields better effects than each alone in rheumatoid arthritis patients: T-4 Study. Ann Rheum Dis 2012;71:534–40. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200108.

[19] Okada Y, Nagase H, Harris ED. A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. Purification and characterization. J Biol Chem 1986;261:14245–55.

[20] Okada Y, Takeuchi N, Tomita K, Nakanishi I, Nagase H. Immunolocalization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in rheumatoid synovioblasts (B cells): correlation with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 1989;48:645–53.

[21] Loo WTY, Wang M, Jin LJ, Cheung MNB, Li GR. Association of matrix metalloproteinase (MMP-1, MMP-3 and MMP-9) and cyclooxygenase-2 gene polymorphisms and their proteins with chronic periodontitis. Arch Oral Biol 2011;56:1081–90. doi:10.1016/j.archoralbio.2011.03.011.

[22] Herath TDK, Wang Y, Seneviratne CJ, Darveau RP, Wang C-Y, Jin L. The expression and regulation of matrix metalloproteinase-3 is critically modulated by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide with heterogeneous lipid A structures in human gingival fibroblasts. BMC Microbiol 2013;13:73. doi:10.1186/1471-2180-13-73.

[23] Kudo-Tanaka E, Ohshima S, Ishii M, Mima T, Matsushita M, Azuma N, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptide 2 (CCP2) are superior to other potential diagnostic biomarkers for predicting rheumatoid arthritis in early undifferentiated arthritis. Clin Rheumatol 2007;26:1627–33. doi:10.1007/s10067-007-0558-5.

[24] Shovman O, Gilburd B, Zandman-Goddard G, Sherer Y, Orbach H, Gerli R, et al. The diagnostic utility of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, matrix metalloproteinase-3, rheumatoid factor, erythrocyte sedimentation rate, and C-reactive protein in patients with erosive and non-erosive rheumatoid arthritis. Clin Dev Immunol 2005;12:197–202.

[25] Papagoras C, Voulgari PV, Drosos AA. Strategies after the failure of the first anti-tumor necrosis factor alpha agent in rheumatoid arthritis. Autoimmun Rev 2010;9:574–82. doi:10.1016/j.autrev.2010.04.002.

[26] Marotte H, Miossec P. Biomarkers for prediction of TNFalpha blockers response in rheumatoid arthritis. Joint Bone Spine 2010;77:297–305. doi:10.1016/j.jbspin.2010.02.026.

[27] Savioli C, Ribeiro ACM, Fabri GMC, Calich AL, Carvalho J, Silva CA, et al. Persistent periodontal disease hampers anti-tumor necrosis factor treatment response in rheumatoid arthritis. J Clin Rheumatol 2012;18:180–4. doi:10.1097/RHU.0b013e31825828be.

[28] Marotte H, Farge P, Gaudin P, Alexandre C, Mougin B, Miossec P. The association between periodontal disease and joint destruction in rheumatoid arthritis extends the link between the HLA-DR shared epitope and severity of bone destruction. Ann Rheum Dis 2006;65:905–9. doi:10.1136/ard.2005.036913.

[29] Scher JU, Ubeda C, Equinda M, Khanin R, Buischi Y, Viale A, et al. Periodontal disease and the oral microbiota in new-onset rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2012;64:3083–94. doi:10.1002/art.34539.

[30] Burt B, Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. Position paper: epidemiology of periodontal diseases. J Periodontol 2005;76:1406–19. doi:10.1902/jop.2005.76.8.1406.

[31] Mikuls TR, Payne JB, Yu F, Thiele GM, Reynolds RJ, Cannon GW, et al. Periodontitis and Porphyromonas gingivalis in Patients With Rheumatoid Arthritis. Arthritis & Rheumatology 2014;66:1090–100. doi:10.1002/art.38348.

[32] Ogrendik M, Kokino S, Ozdemir F, Bird PS, Hamlet S. Serum antibodies to oral anaerobic bacteria in patients with rheumatoid arthritis. MedGenMed 2005;7:2.

[33] Ogrendik M, Kokino S, Ozdemir F, Bird PS, Hamlet S. Serum antibodies to oral anaerobic bacteria in patients with rheumatoid arthritis. MedGenMed 2005;7:2.

[34] Trindade SC, Olczak T, Gomes-Filho IS, Moura-Costa LF, Vale VL, Galdino-Neto M, et al. Porphyromonas gingivalis antigens differently participate in the proliferation and cell death of human PBMC. Arch Oral Biol 2012;57:314–20. doi:10.1016/j.archoralbio.2011.09.003.

[35] Netea MG, van Deuren M, Kullberg BJ, Cavaillon J-M, Van der Meer JWM. Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? Trends Immunol 2002;23:135–9.

[36] Arvikar SL, Collier DS, Fisher MC, Unizony S, Cohen GL, McHugh G, et al. Clinical correlations with Porphyromonas gingivalis antibody responses in patients with early rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther 2013;15:R109. doi:10.1186/ar4289.

[37] Miyashita H, Honda T, Maekawa T, Takahashi N, Aoki Y, Nakajima T, et al. Relationship between serum antibody titres to Porphyromonas gingivalis and hs-CRP

levels as inflammatory markers of periodontitis. Arch Oral Biol 2012;57:820–9. doi:10.1016/j.archoralbio.2011.11.008.

[38] Posthumus MD, Limburg PC, Westra J, van Leeuwen MA, van Rijswijk MH. Serum matrix metalloproteinase 3 levels in comparison to C-reactive protein in periods with and without progression of radiological damage in patients with early rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol 2003;21:465–72.

[39] Shinozaki M, Inoue E, Nakajima A, Hara M, Tomatsu T, Kamatani N, et al. Elevation of serum matrix metalloproteinase-3 as a predictive marker for the long-term disability of rheumatoid arthritis patients in a prospective observational cohort IORRA. Mod Rheumatol 2007;17:403–8. doi:10.1007/s10165-007-0608-5.

[40] Omura K, Takahashi M, Omura T, Miyamoto S, Kushida K, Sano Y, et al. Changes in the concentration of plasma matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) after total joint replacement in patients with arthritis. Clin Rheumatol 2002;21:488–92. doi:10.1007/s100670200120.

[41] Reddy NR, Roopa D, Babu DSM, Kumar PM, Raju CM, Kumar NS. Estimation of matrix metalloproteinase-3 levels in gingival crevicular fluid in periodontal disease, health and after scaling and root planing. J Indian Soc Periodontol 2012;16:549–52. doi:10.4103/0972-124X.106907.

[42] Ziolkowska M, Kurowska M, Radzikowska A, Luszczykiewicz G, Wiland P, Dziewczopolski W, et al. High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor alpha treatment. Arthritis Rheum 2002;46:1744–53. doi:10.1002/art.10388.

[43] Ban A, Inaba M, Furumitsu Y, Okamoto K, Yukioka K, Goto H, et al. Time-course of health status in patients with rheumatoid arthritis during the first year of treatment with infliximab. Biomed Pharmacother 2010;64:107–12. doi:10.1016/j.biopha.2009.04.035.

[44] Hyc A, Osiecka-Iwan A, Niderla-Bielinska J, Moskalewski S. Influence of LPS, TNF, TGF-ß1 and IL-4 on the expression of MMPs, TIMPs and selected cytokines in rat synovial membranes incubated in vitro. Int J Mol Med 2011;27:127–37. doi:10.3892/ijmm.2010.550.

[45] Pers J-O, Saraux A, Pierre R, Youinou P. Anti-TNF-alpha immunotherapy is associated with increased gingival inflammation without clinical attachment loss in subjects with rheumatoid arthritis. J Periodontol 2008;79:1645–51. doi:10.1902/jop.2008.070616.

[46] Okada M, Kobayashi T, Ito S, Yokoyama T, Abe A, Murasawa A, et al. Periodontal Treatment Decreases Levels of Antibodies to Porphyromonas Gingivalis and Citrulline in Patients With Rheumatoid Arthritis and Periodontitis. J Periodontol 2013. doi:10.1902/jop.2013.130079.

[47] Bobbio-Pallavicini F, Alpini C, Caporali R, Avalle S, Bugatti S, Montecucco C. Autoantibody profile in rheumatoid arthritis during long-term infliximab treatment. Arthritis Res Ther 2004;6:R264–272. doi:10.1186/ar1173.

[48] Klaasen R, Cantaert T, Wijbrandts CA, Teitsma C, Gerlag DM, Out TA, et al. The value of rheumatoid factor and anti-citrullinated protein antibodies as predictors of response to infliximab in rheumatoid arthritis: an exploratory study. Rheumatology (Oxford) 2011;50:1487–93. doi:10.1093/rheumatology/ker010.

[49] De Rycke L, Verhelst X, Kruithof E, Van den Bosch F, Hoffman IEA, Veys EM, et al. Rheumatoid factor, but not anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, is modulated by

infliximab treatment in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 2005;64:299–302. doi:10.1136/ard.2004.023523.

[50] Lequerré T, Jouen F, Brazier M, Clayssens S, Klemmer N, Ménard J-F, et al. Autoantibodies, metalloproteinases and bone markers in rheumatoid arthritis patients are unable to predict their responses to infliximab. Rheumatology (Oxford) 2007;46:446–53. doi:10.1093/rheumatology/kel262.

Table 1: Characteristics of RA patients at baseline and after infliximab therapy

	Baseline	6 months	P values
Sex (female/male)	79/22		
Age, years	52.9 [43.0-59.5]		
Disease duration (years)	9 [5-17]		
No destruction, n (%)	16 (15.8%)		
Wrist destruction, n (%)	71 (70.3%)		
Periodontal disease, n (%)	62 (61.4%)		
DAS28	5.3 [4.7-6.2]	3.4 [2.6-4.3]	<0.0001
ESR (mm/h)	31 [16-48]	15 [9-31]	<0.0001
CRP (mg/l)	20 [8-34]	6 [2-17]	<0.05
ACPA (U/ml)	97 [9-275]	43 [5-189]	<0.001
RF IgM (IU/ml)	38 [11-96]	22 [6-66]	<0.0001
RF IgA (IU/ml)	25 [10-61]	17 [8-47]	0.0001
MMP-3 (ng/ml)	90 [40-177]	45 [24-91]	<0.0001
Anti-*P. gingivalis* extract (AU)	238 [146-378]	274 [173-557]	<0.01
Anti-*P. gingivalis* LPS (AU)	86 [67-146]	97 [77-152]	NS
Anti-*P. intermedia* extract (AU)	390 [226-653]	436 [246-853]	<0.05

Values are indicated as number of patients (%) or median [1st and 3rd quartiles]. Values are based on the full population (n=101) for clinical and radiological assessment and on a subset (n=79) for MMP-3, ACPA, RF, and antibodies assessment. DAS28: Disease Activity Score 28; ESR: Erythrocyte sedimentation rate; CRP: C-reactive protein; ACPA: anti-citrullinated protein antibody; RF: rheumatoid factor; MMP-3: Matrix metalloproteinase-3; U: unit; IU; international units; AU: arbitrary units, NS: non-significant.

Figure Legends

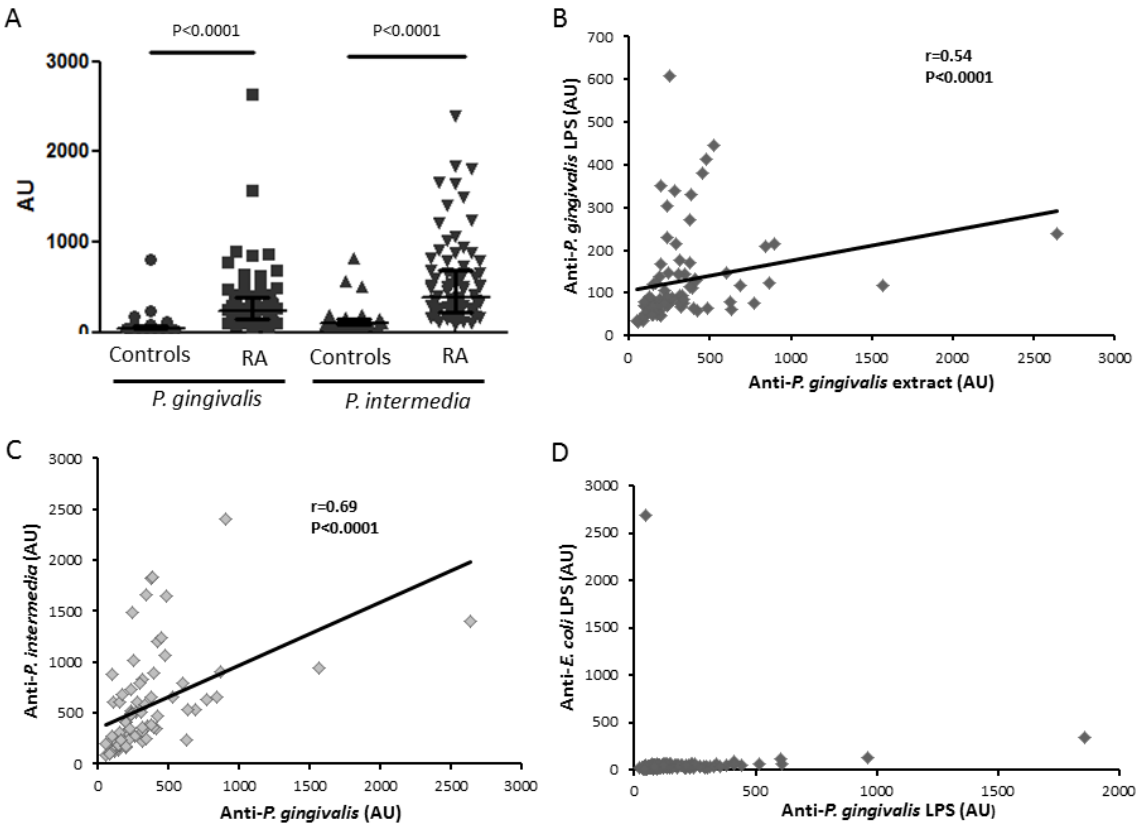


Figure 1: Evaluation of the measure of anti-*P. gingivalis* whole extract and LPS specific antibodies by ELISA.

Anti-*P. gingivalis* and anti-*P. intermedia* whole extract antibodies were measured in control subjects and RA patients (A). Correlations between both anti-*P. gingivalis* LPS and extract (B); anti-*P. intermedia* and anti-*P. gingivalis* whole extract (C). Specificity of anti-*P. gingivalis* antibodies in RA patients (D). From the bottom up, the bars indicate the interquartile range and the median. AU: arbitrary units; r: Spearman correlation coefficient; LPS: lipopolysaccharide.

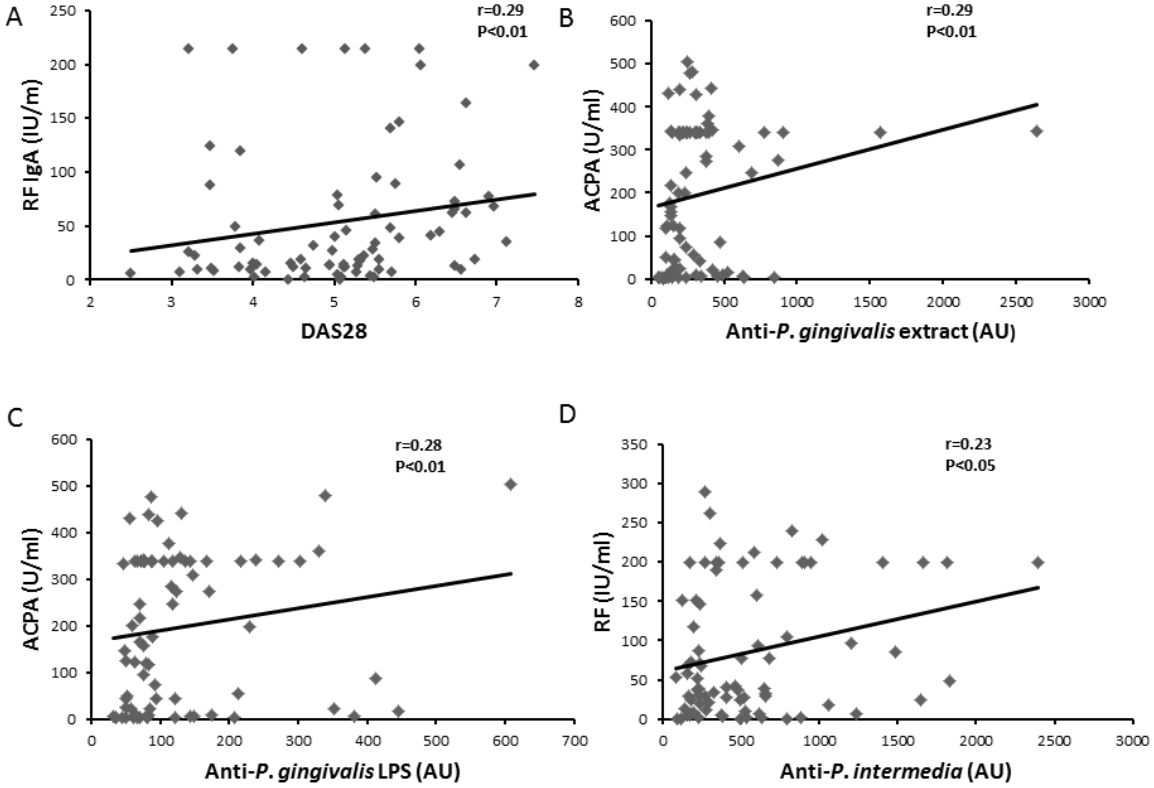


Figure 2: Correlation between clinical and biological parameters at baseline.

Correlations between RF IgA and DAS28 (A); ACPA and anti-*P*. *gingivalis* whole extract antibodies (B); ACPA and anti-*P. gingivalis* LPS specific antibodies (C); and RF IgG and anti-*P. intermedia* antibodies (D). RF: rheumatoid factors; IU: international units; DAS28: disease activity score 28; AU: arbitrary units; ACPA: anti-citrullinated protein antibodies; r: Spearman correlation coefficient; LPS: lipopolysaccharide; U: Unit; IU: International unit; NS: non-significant.

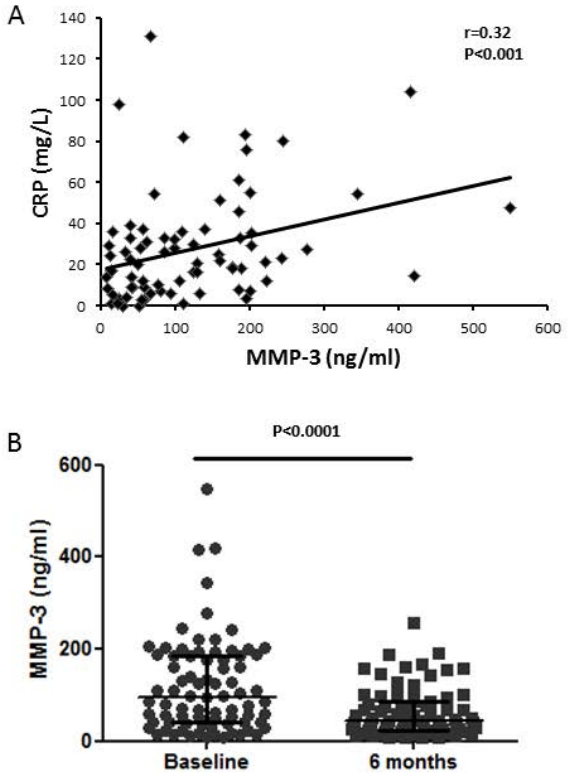


Figure 3: Interest of MMP-3 levels in RA patients during infliximab therapy.

Correlation between CRP and MMP-3 levels at baseline (A) and evolution of MMP-3 after 6 months of infliximab therapy (B). Dots represent results for each patient. From the bottom up, the bars indicate the interquartile range and the median. CRP: C-reactive protein; MMP-3: matrix metalloproteinase-3; r: Spearman correlation coefficient; *: P<0.0001.

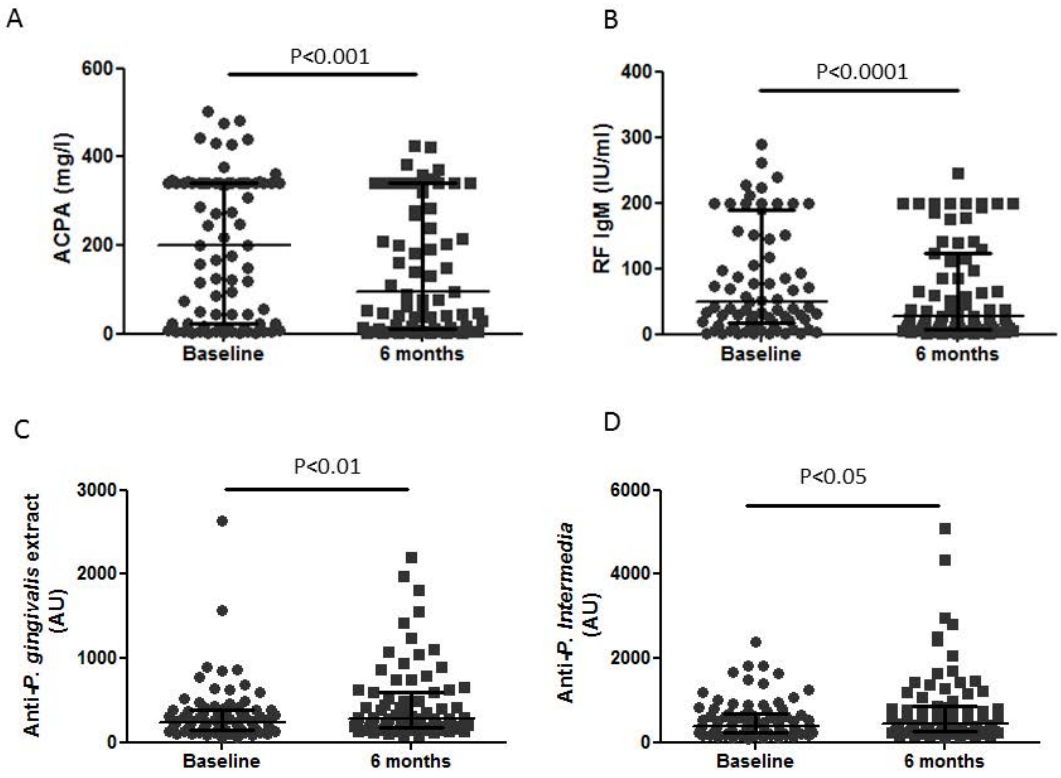


Figure 4: Effect of infliximab treatment on biological markers

ACPA (A), RF IgM (B), Anti-*P. gingivalis* antibodies (C), and anti-*P. intermedia* antibodies (D) were evaluated at baseline and after 6 months of infliximab therapy. Dots represent results for each patient, with values at baseline in round and at 6 months of infliximab therapy in square. From the bottom up, the bars indicate the interquartile range and the median. ACPA: anti-citrullinated protein antibodies; RF: rheumatoid factor; AU: arbitrary units; IU: International units; *: P<0.05; **: P<0.001.

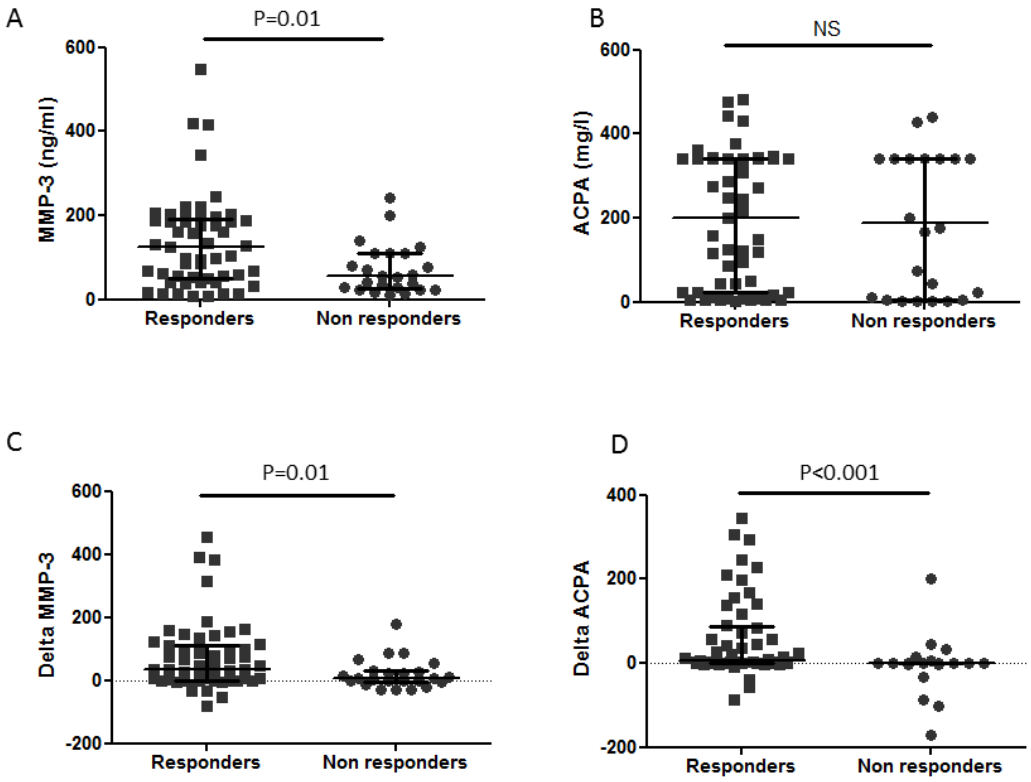


Figure 5: Predictive factors for clinical response to infliximab therapy

Baseline values of MMP-3 (A) and ACPA (B) are represented. Delta MMP-3 (C) and delta ACPA (D) represent difference of MMP-3 and ACPA (baseline value minus 6 month value) and are shown according to clinical response to infliximab. Dots represent results for each patient, with responders in square (■) and non-responders in round (●).From the bottom up, the bars indicate the interquartile range and the median. Response to infliximab treatment was defined by an improvement > 1.2 of DAS28 at 6 months. MMP-3: matrix metalloproteinase-3; ACPA: anti-citrullinated protein antibodies; ; *: P<0.05; NS: non significant.

Résultats et discussion

Ce travail a consisté dans l'étude du rôle de *PG* dans la rupture de tolérance immunitaire impliquée dans la physiopathologie de la PR par sa capacité à citrulliner les protéines. Nous souhaitions également étudier si une exposition à PG pouvait être associée à une résistance aux anti-TNF. Pour cela, 79 patients sous infliximab ont été suivis pendant 6 mois. Deux types de sérologies anti-*PG* (LPS et extrait brut) ont dû être mises au point afin d'étudier les corrélations entre l'exposition bactérienne des patients et la sévérité clinique. Les 2 sérologies étaient bien corrélées, ce qui peut laisser penser que le LPS de *PG* est le principal immunogène de *PG* chez les patients PR. Les taux d'anticorps anti-*PG* étaient bien corrélés aux taux d'anti-CCP2 à TO. Après 6 mois de traitement par infliximab, les marqueurs inflammatoires, incluant la CRP, la VS, le taux de MMP-3, étaient significativement diminués ainsi que les anticorps anti-CCP2. A l'inverse, les sérologies bactériennes augmentaient. Cependant, la sérologie anti-bactérienne ne s'est pas révélée significative pour prédire la réponse à l'infliximab. Par contre, un taux élevé de la matrix metalloproteinase 3 (MMP-3), impliquée dans la dégradation des os et du cartilage, était retrouvé chez les patients atteignant une rémission clinique à 6 mois.

L'interprétation fiable des résultats sérologiques anti-PG dans notre étude a pu être réalisée grâce à l'élimination de plusieurs *biais* potentiellement présents dans notre technique ELISA. En effet, PG étant capable de citrulliner ses propres protéines, la présence de peptides citrullinés au sein de l'extrait bactérien utilisé pour « coater » les plaques ELISA a été tout d'abord suspectée. Pour éviter que le signal émis soit relatif aux anticorps anti-CCP présents dans le sérum des patients PR, nous avons testé 2 types d'anticorps dont la cible antigénique est la forme citrullinée des protéines. Ainsi, un anticorps monoconal anti-CCP2 ne permettait pas l'obtention d'un signal après dépôt sur l'extrait bactérien, réfutant l'hypothèse d'une réaction croisée entre les anti-CCP2 spécifiques de la PR retrouvés à des taux élevés dans le sérum des patients et les anticorps anti-PG. Toutefois, la présence de peptides citrullinés autres que CCP2 a pu être mise en évidence par l'utilisation d'un anticorps polyclonal anti-citrulline dont la sensibilité commençait pour une concentration de 62.5 ng/ml, concentration faible pour induire une interférence. Pour confirmer la spécificité de la sérologie bactérienne, nous avons donc voulu déterminer en parallèle ces anticorps anti-PG grâce à du LPS de PG (Invivogen) exempt de protéines citrullinés. Les 2 sérologies sortent bien corrélées entre elles, validant les résultats retrouvés sur l'extrait bactérien. De plus, cette corrélation dans notre étude a permis de montrer que le LPS est le facteur immunogène le plus important dans PG, malgré les nombreux autres facteurs de virulence décrits chez cette bactérie et les différences d'effets pathogènes directs sur les PBMCs entre LPS et extrait[519].

Une fois le test ELISA validé, la détermination des sérologies à l'initiation du traitement et à 6 mois a permis de noter une augmentation des taux d'anticorps anti-bactériens dans le temps. Ces données n'ont jamais été décrites mais elles semblent concordantes avec une étude centrée sur la parodontopathie montrant l'aggravation de l'inflammation gingivale des patients PR sous traitement anti-TNF, avec persistance de l'infection bactérienne révélée par l'indice de plaque dentaire[520]. A l'inverse, le traitement de la parodontopathie induit une baisse des anticorps anti-PG et des ACPA en parallèle de l'amélioration du score clinique

DAS28-CRP[521], renforçant le rôle de PG dans la citrullination des protéines survenant dans la PR. Nous retrouvons d'ailleurs dans notre étude une corrélation entre les anti-CCP2 et les anticorps anti-PG uniquement, association déjà rapportée par de précédentes études[517]. Toutefois, l'intérêt de PG dans la physiopathologie de la PR est depuis peu remis en question. En effet, l'association de la maladie parodontale avec la PR ne semble pas forcément dépendante d'une colonisation par PG. Mikuls *et al* ne montrent pas de différences au niveau des taux d'anticorps anti-PG ou de la présence sous gingivale de PG entre les patients PR et les cas contrôles[389]. La sélection des contrôles pour affirmer une différence au niveau sérologique est primordiale pour l'interprétation des données. Nous avons choisi de comparer les patients PR avec la population générale, représentée par les donneurs de sang. Mikuls *et al* ont inclus comme contrôle des patients présentant une arthrose, ce qui peut expliquer les différents résultats retrouvés par rapport à notre étude. En effet, PG a montré son implication dans de nombreuses pathologies non liées à l'auto-immunité (voire introduction), et peu de d'études se sont intéressées à PG dans l'arthrose. Des études métagénomiques révèlent que les microbiotes salivaire, dentaire et fécale des patients PR s'écartent sensiblement des sujets sains sur l'ensemble des sites étudiés[522]. Néanmoins, PG est enrichi dans la salive et la plaque dentaire des sujets contrôles sains et non des patients PR, remettant aussi en cause l'importance de PG et sa faculté à sécréter une PAD pour le déclanchement de la PR[523]. Bien que le rôle de PG soit controversé, la notion d'une dysbiose du microbiote oral dans la PR est renforcée par l'ensemble de ces études. Le rôle exact de PG au sein de ce microbiote doit encore être précisé dans des études supplémentaires, notamment grâce à la mise en place d'un modèle animal sur lequel la conséquence de différents types de coinfections pourrait être explorée.

Dans notre étude, seul un taux élevé de MMP-3 était prédictif d'une bonne réponse aux anti-TNF. La diminution de ce biomarqueur en cas de traitement par anti-TNF est déjà décrite[524], de même lors de l'administration d'autres traitements immunosuppresseurs[525,526]. Le taux de MMP-3 réflète l'inflammation articulaire. Sa diminution n'est donc pas spécifique d'un traitement donné mais de l'action anti-inflammatoire de ces traitements. Toutefois, sa capacité à prédire la réponse au traitement pourrait consolider l'importance de son dosage dans le suivi des patients PR. En effet, l'étude T-4 a déjà montré une supériorité d'une stratégie thérapeutique basée sur la normalisation du taux de MMP-3 en plus du DAS 28[527]. La capacité prédictive de MMP-3 dans la réponse à l'infliximab reste cependant encore controversée puisqu'une précédente étude n'a pas retrouvé les mêmes résultats chez 76 patients PR[528]. Bien que l'évaluation de la réponse clinique ait été faite plus tard dans notre étude, le rôle prédictif de MMP-3 doit donc être confirmé sur une cohorte plus large.

Perspectives

De nombreuses études soulignent le rôle grandissant de la flore commensale dans la physiopathologie des maladies auto-immunes. Bien que les premiers résultats sérologiques ne soient pas concluants en tant que facteurs prédictifs de réponse aux anti-TNF, cette piste nous a paru intéressante à approfondir.

1. Etude transciptomique

A ce jour, l'analyse complète de l'expression génique spécifique induite *in vitro* par *PG* sur plusieurs types cellulaires n'est pas connue. Il est pourtant important de connaître l'effet direct de ce pathogène sur les cellules impliquées dans la PR en raison de ses nombreux facteurs de virulence autres que sa PAD. Précédemment, seule une étude sur des cellules épithéliales gingivales a pu montrer que *PG* pourrait induire des voies de signalisation anti-apoptotique à l'inverse d'un germe non pathologique[529] mais cette étude n'est pas suffisante pour expliquer l'impact de *PG* dans la PR. En conséquence, nous avons décidé de réaliser une analyse complète d'analyse transcriptomique de l'action d'un extrait bactérien de *PG* sur des fibroblastes synoviaux, des cellules mononuclées du sang (PBMC) et des fibroblastes gingivaux pour identifier une signature correspondant à ce germe. Ce travail a reçu un financement grâce à un appel d'offre local (AOL) en 2014.

Ce travail exploratoire s'effectuera en 2 étapes :

- Une première partie sur des lignées cellulaires de fibroblastes gingivaux, PBMC et synoviocytes. Cette étape permettra d'explorer les 3 types cellulaires pouvant être mis en cause dans l'hypothèse physiopathologique de la PR : les fibroblastes gingivaux où a lieu l'infection par *PG*, les PBMCs pour leur possible implication dans le transport de la bactérie et enfin les synoviocytes pour leur rôle dans la PR et l'inflammation articulaire. L'avantage d'utiliser des lignées cellulaires est d'avoir un matériel homogène, reproductible et facilement accessible. Par contre, l'utilisation de ces lignées ne permet pas de tester l'influence de la variabilité du terrain génétique dans cette réponse induite par *PG*.

- Une deuxième partie sera ainsi réalisée sur des cellules issues de prélèvements synoviaux de 3 patients PR pour répondre complètement à la problématique de l'étude. La population contrôle sera composée de synoviocytes de 3 patients atteints d'arthrose puisqu'il y a une destruction articulaire sans production d'anticorps anti-CCP2 dans cette pathologie.

Plusieurs conditions seront testées pour chacune de ces parties. Les cellules non stimulées seront nécessaires pour connaître les voies de signalisation à l'état basal de ces cellules. Les cellules stimulées avec *PG* permettront de connaître l'action directe de ce germe. Enfin, les cellules stimulées avec *Prevotella intermedia,* un autre germe responsable de la MP mais qui n'aurait pas de rôle prépondérant dans le déclenchement de la PR permettra de répondre à la question de la spécificité d'action de *PG* par rapport à un autre germe retrouvé dans le complexe rouge de la parodontopathie.

Résultats préliminaires

Une étape préliminaire a été réalisée pour définir la dose optimale de *PG* et de *P. intermedia* nécessaire à l'activation de ces trois types cellulaires après une culture de 24h. Pour cela, les différents types cellulaires ont été mis en culture dans des plaques 96 puits stériles à fond plat à une concentration de 5.10^5 cellules/ml pour que les cellules soient confluentes. Les extraits bactériens de *PG* et *P. intermedia* ont été obtenus à partir de souches de référence (ATCC 32277 et CIP 103607 pour respectivement *PG*, et *P. intermedia*). Plusieurs concentrations d'extraits bactériens de *PG* et *P. intermedia* ont été testées en triplicate pour chaque lignée cellulaire. L'activation cellulaire a été évaluée par un dosage ELISA (eBiosciences) de l'IL-6 sécrétée par les cellules en réponse à la stimulation bactérienne dans le surnageant des cultures cellulaires après 24h d'incubation. La quantité d'IL-6 dosée permettra d'établir la concentration optimale d'extrait bactérien à utiliser pour l'activation cellulaire.

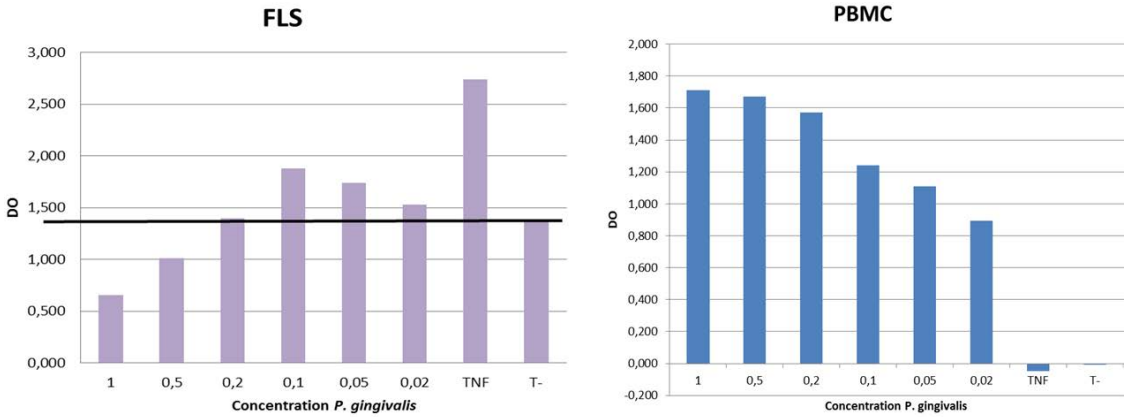


Figure 46: Résultats préliminaires d'activation des synoviocytes (FLS) et des PBMC par PG (bactéries vivantes).

Les résultats préliminaires suggèrent la nécessité d'utiliser les bactéries vivantes pour induire une stimulation dans les 3 types cellulaires testés. Une concentration de 0.1 Mac Farland devrait être appropriée pour toutes les stimulations cellulaires

Analyse transciptomique

L'étude de l'expression génique par puces à ADN se fera en collaboration avec le Pr Lachuer de la plateforme ProfileXpert de Lyon. Les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit Qiagen selon les recommandations du fournisseur. Leur quantité évaluée à l'aide d'un nanodrop et leur qualité par bioanalyseur 2100 (Agilent). Environ 100 ng d'ARN totaux seront amplifiés et marqués par transcription in vitro et hybridés sur puces Illumina (HumanHT-12 v4 Expression BeadChip Kit) permettant l'analyse de plus de 50.000 transcripts. Après hybridation les puces seront scannées (BeadArray Reader, iScan system) et les données brutes extraites. Les données sont ensuite normalisées (Mas 5) grâce au logiciel GenomeStudio. Le grand nombre de données qui seront générées par les puces à ADN seront normalisées, validées statistiquement, triées, regroupées, classées pour être enfin comparées entre elles et interprétées en terme biologique. Cette étape est en cours de réalisation.

2. Modèle animal d'arthrite à PG

La majorité des modèles animaux d'arthrite utilisés dans l'étude de la PR se base sur des lignées de rongeurs, rats ou souris préférentiellement.

Plusieurs souches de souris génétiquement modifiées déclarent une arthrite spontanée durant leur vie. Ainsi, les souris hTNF, ayant le transgène du TNF humain, expriment fortement le TNF et développent une polyarthrite décelable dès la 3-4ème semaine de vie par un œdème des chevilles[530]. De même, la lignée transgénique murine KRN, exprimant le TCR, croisée avec une lignée NOD, exhibe une inflammation articulaire prononcée avec l'apparition de déformations lors de l'avancée en âge des souris, et une dysrégulation des lymphocytes B[531]. En 2003, Sakagushi *et al* décrivent un modèle murin (modèle SKG) de polyartrhtite inflammatoire causée par une mutation spontanée du gène codant pour ZAP-70, une protéine impliquée dans l'activation lymphocytaire T, en lien avec la présence d'agents infectieux[532]. En effet, ce modèle développe une inflammation articulaire lente et imprévisible dans des conditions standards d'élevage, alors que les souris restent saines en l'absence d'agents pathogènes (conditions SPF, *specified pathogen-free*). Cette arthrite peut être alors induite de manière reproductible par injection intra-péritonéale de différents β-glycans, zymosan A, ou des mannans[533]. La mutation Y759 du gène codant pour la sous-unité gp130 du récepteur de l'IL-6 chez la souris cause une atteinte articulaire spontanée ressemblant à la PR, chronique et progressive, avec production d'auto-anticorps et anomalies des lymphocytes T[534]. Il est également décrit des lignées murines transgéniques Tg1706 surexprimant l'IL-1α[535] ou des lignées déficientes en IL-1 RA[536], un inhibiteur endogène de l'IL-1, qui développent une polyarthrite inflammatoire chronique.

En dehors de ces modèles murins spontanés, plusieurs modèles d'arthrite induite ont été décrits, l'induction permettant d'obtenir une atteinte articulaire plus rapide et plus aigue. Ainsi, l'arthrite induite par adjuvant (AIA) est un des premiers modèles développés et survient après une injection unique d'adjuvant à la base de la queue ou en intrapéritonéale chez le rat. Plusieurs adjuvants peuvent être utilisés, notamment l'adjuvant complet de Freunds (suspension de bactéries mortes de *Mycobacterium* dans une huile minérale)[537], ou l'adjuvant incomplet (sans la composante mycobacterium), l'avridine, le squalène ou la pristane[538]. L'induction peut se faire également avec un antigène du cartilage, à savoir le protéoglycane ou le collagène de type II qui est le modèle murin le plus fréquemment étudié[539]. Enfin, l'arthrite peut être provoquée par l'injection dans la voie systémique de fragments de la paroi de streptocoques du groupe A[540] ou par l'implantation de la membrane synoviale de patients PR chez des souris immunodéficientes (modèle PR/SCID). Ces modèles ne sont applicables que sur certaines lignées de rats ou de souris ayant la prédisposition génétique nécessaire au développement de l'arthrite. Parmi les lignées disponibles, les rats Lewis sont majoritairement utilisés dans le modèle AIA.

Modèle	Espèce	Mécanisme
ARTHRITES INDUITES		
- induction non spécifique d'antigène		
Arthrite à adjuvant	Rat lewis	auto-immunité, LT
Arthrite au pristane	Rat DA	auto-immunité, LT
- induction par un antigène du cartilage		
Arthrite au collagène	souris DBA/1, C57BL/6	auto-immunité, CII autoAg, Ac, LT
Arthrite au protéoglycane	souris BALB/c	auto-immunité, PG autoAg, Ac, LT
- induction par des antigènes exogènes		
Arthrite à paroi de Streptocoque	Rat lewis	immunité anti-Ag bactérien, LT
- induction par des complexes immuns		
Arthrite à Ac anti-collagène	souris DBA/1, C57BL/6	Ac anti-CII
Arthrite spontanée	souris KRN (voir plus bas)	Ac anti-GPI
MODÈLES TRANSGÉNIQUES SPONTANÉS		
Arthrite souris KRN	souris KRN/NOD	auto-immunité anti-GPI, Ac, LT
Arthrite souris SKG	souris SKG	déficit LT ZAP-70
Arthrite souris tg TNF	souris C57BL/6	surexpression de TNF
Arthrite souris KO IL-1Ra	souris IL-1Ra$^{-/-}$	auto-immunité, LT

Figure 47: Exemples de modèles animaux utilisés dans l'étude de la PR[539].

En ce qui concerne les modèles animaux étudiant le rôle de PG dans l'induction de l'arthrite, plusieurs études ont démontré la capacité de PG, grâce à sa PAD, à provoquer une arthrite plus précoce, plus sévère, accompagnée d'une élévation des protéines citrullinées et des anticorps dirigés contre ces protéines, dans des modèles murins d'arthrite à collagène[541,542]. L'infection orale chronique par PG antérieurement à cette induction de l'arthrite augmente la réponse immunitaire Th17[543]. Cette différenciation des lymphocytes T en Th17 serait dépendante de l'expression du TLR2 sur les cellules présentatrices de l'antigène[544]. Néanmoins, toutes ces données ne répondent pas à la question du rôle de PG en tant qu'élément déclencheur de la PR puisque l'arthrite est induite par l'administration de collagène de type II dans ces modèles.

Afin de mieux cerner l'hypothèse physiopathologique de la PR, nous avons donc voulu mettre en place et caractériser un modèle de rat dont l'arthrite est induite par une infection à PG. Pour cela, des rats Lewis ont été choisis de part leur prédisposition à générer une arthrite après induction, et des femelles puisque la PR est principalement retrouvée chez les femmes.

Résultats préliminaires

La première étape a été de provoquer une parodontopathie par l'inoculation répétée par voie orale d'une solution de PG (souche ATCC33277) 4 fois par semaine pendant un mois chez des rats Lewis agés de 6 semaines. La parodontopathie a été évaluée en microscanner par la perte osseuse alvéolaire mesurée par la distance entre la jonction cément–émail (CEJ) de chaque racine et la crête de l'os alvéolaire (ABC). La distance CEJ-ABC est significativement augmentée chez les rats infectés par PG par rapport au groupe contrôle, au niveau de chaque racine de chaque molaire. Ce protocole d'induction est donc valable pour engendrer une parodontopathie chez le rat.

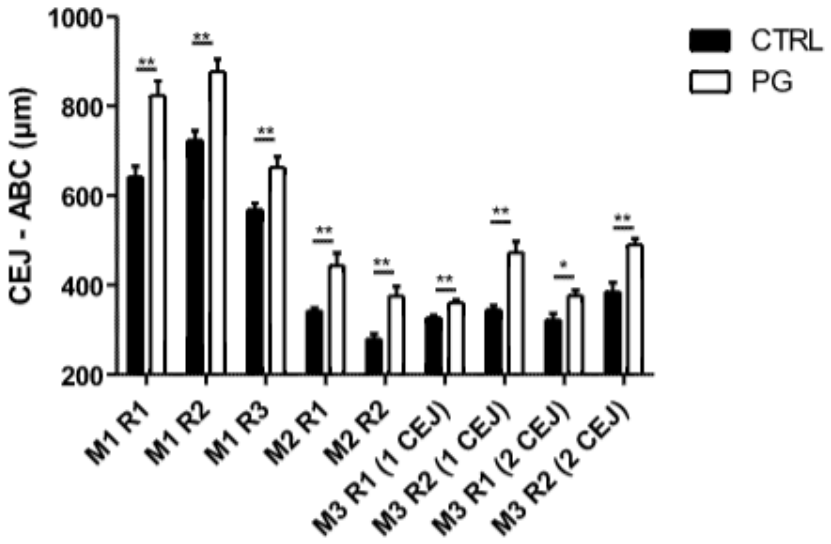


Figure 48 : Evaluation de la distance CEJ-ABC au niveau de la machoire droite de rats contrôles (CTRL) et infectés par PG (PG). M1 : molaire 1 ; M2 : molaire 2 ; M3 : molaire 3 ; R1 : racine 1 ; R2 : racine 2 ; R3 : racine 3.

Cette première étape a permis d'explorer également l'impact de cette parodontopathie au niveau des articulations des chevilles. Pour cela, les rats ont été sacrifiés 1 mois après la fin de l'inoculation de PG ou 2 mois après. Le faible nombre de rats (n=2) dans chaque groupe ne permet pas de conclure avec certitude mais des érosions ou un profil de porosité accrue sont observées au niveau radiologique sur les faces latérales de l'os naviculaire, au centre de la cheville, à 3 mois. Néanmoins, aucun signe clinique d'inflammation articulaire n'a pû être rapporté, avec un périmètre des chevilles non augmenté et un profil de prise de poids identique entre le groupe contrôle et le groupe infecté.

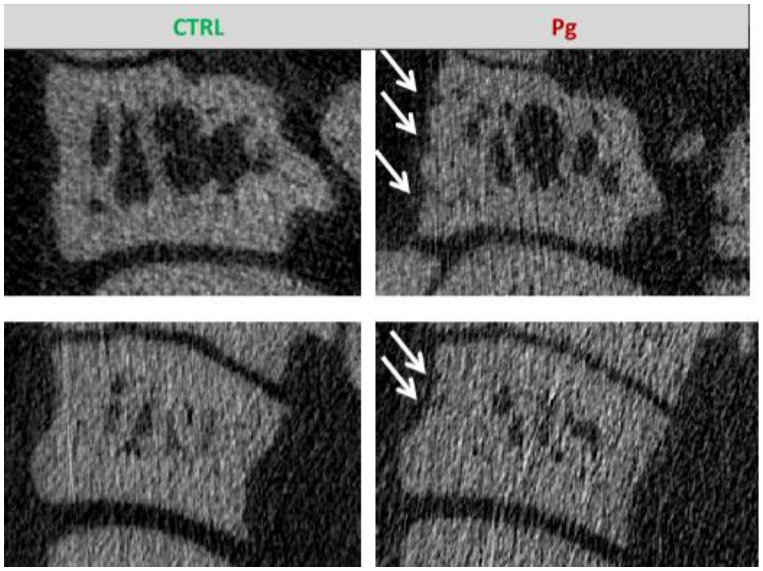


Figure 49: Visualisation radiographique des os naviculaires d'un rat contrôle et PG à 3 mois post infection

Au niveau sérologique, aucune différence statistiquement significative n'a pu être observée pour les taux d'Ac anti-PG et anti-CCP2 entre les 2 groupes de rats.

Cette étude préliminaire ne met pas en évidence l'apparition d'une arthrite franche après une exposition prolongée à PG, malgré la survenue d'une parodontopathie. Plusieurs points sont à considérer. Le premier étant le faible effectif des groupes de rats, cette première étude ayant été dessinée dans l'optique de valider un modèle de parodontopathie à PG chez les rats Lewis et non de suivre l'évolution d'une potentielle atteinte articulaire. Il est probable que l'inflammation articulaire n'apparaisse pas dans l'ensemble des rats infectés malgré leur terrain génétique identique. Un autre point est la durée d'exposition à PG et à la parodontopathie. Nous savons chez l'homme que les anticorps anti-peptides citrullinés sont détectables jusqu'à 10 ans avant l'apparition de l'arthrite. Il s'agit ainsi d'un phénomène lent, débuté bien avant l'apparition clinique d'une arthrite. Transposé au rat, le délai de 3 mois entre l'exposition à PG et le sacrifice peut être trop court pour constater des signes cliniques, sérologiques et radiologiques d'une arthrite constituée. Enfin, les conditions relatives à la parodontopathie par gavage oral de PG peuvent aussi être la source de l'absence du développement de l'arthrite. En effet, toutes les souches de PG ne présentent pas les mêmes facteurs de virulence ni les mêmes implications cliniques. Même si la souche ATCC 33277 exprime une PAD et est largement utilisée dans les études publiées, elle n'est pas responsable d'une forte destruction osseuse dans la parodontopathie[545]. De plus, la parodontopathie est une infection polybactérienne. La présence et l'intéraction des différentes bactéries de la plaque dentaire conditionnent la sévérité de l'atteinte parodontale par la potentialisation des facteurs de virulence bactériens. PG isolé est connu pour être un faible inducteur de la réponse immunitaire. Ce premier modèle animal que nous avons testé, n'utilisant que PG comme agent pathogène, pourrait être incapable de stimuler efficacement le système immunitaire du rat, aboutissant alors à une absence de réaction inflammatoire au niveau articulaire.

Dans le but d'améliorer ce modèle, nous avons donc procédé à une deuxième expérimentation dont les résultats sont en cours d'exploitation. Elle correspond à l'administration d'une souche de PG décrite comme plus virulente en termes d'atteinte osseuse (W50)[545], tout en étant également responsable d'une production d'anticorps spécifiques anti-PG. Un groupe contrôle recevant la bactérie *P. intermedia,* retrouvée dans le complexe orange des bactéries induisant la parodontopathie, a été induit en parallèle. Le délai avant le sacrifice sera au moins de 6 mois, avec un monitoring des sérologies anti-PG, anti-CCP2 tous les mois et une évaluation radiologique de l'atteinte articulaire des chevilles par microscanner.

Conclusion et perspectives

1. Résumé des objectifs et résultats obtenus

Mon travail de thèse a consisté dans un premier temps à étudier l'importance du développement d'une immunogénicité envers les anti-TNF comme cause de perte de réponse au traitement, et de valider un test ELISA pour la détermination en pratique quotidienne des anticorps anti-médicament. L'objectif secondaire de ma thèse a été d'explorer le rôle potentiel de la persistance d'une infection bactérienne dans la résistance au traitement. Pour approfondir les premières études cliniques réalisées au sein des services de gastro-entérologie et de rhumatologie du CHU de St Etienne, j'ai voulu également débuter la mise en place d'un modèle animal mimant l'induction de l'arthrite par PG et explorer au niveau transcriptomique la signature génique spécifique de ce germe.

Dans la première partie, j'ai pu démontrer que les taux d'ADAs déterminés par technique ELISA étaient inversement corrélés avec les taux résiduels d'anti-TNF dans les 2 familles de pathologies étudiées. Des taux élevés en ADAs étaient associés à une plus faible réponse clinique. De plus, dans les MICI, des seuils d'interpétation clinique de ces taux ont pu être établi pour l'infliximab (2 µg/ml) et les anticorps anti-infliximab (>200 mg/ml), de même que pour l'adalimumab (4.9 µg/ml). Ces seuils sont nécessaires à l'élaboration des algorithmes cliniques décisionnels que nous avons également testés. Un patient présentant un taux faible d'anti-TNF sans ADAs répond à une optimisation de dose avec obtention d'une cicatrisation muqueuse à l'inverse d'un patient ayant développé des ADAs chez qui un switch thérapeutique serait plus bénéfique. La corrélation des résultats obtenus en ELISA avec les tests cellulaires nous indiquent la pertinence de ces dosages au niveau fonctionnel, renforçant l'intérêt d'utiliser ces kits en pratique quotidienne. Dans la PR, outre la notion globale de perte d'efficacité corrélée aux taux d'ADA, la cinétique d'apparition de ces anticorps a pu être affinée, de même que l'impact d'un traitement par méthotrexate sur l'absence de leur développement.

Dans la deuxième partie, j'ai voulu évaluer l'importance du microbiote dans ces pathologies, tant sur le plan de la sévérité des formes cliniques rencontrées en cas de dysbiose marquée, que sur le plan de la réponse thérapeutique. Une forte immunisation envers la flore intestinale, représentée dans sa globalité par les anticorps anti-glycans, était liée à des formes instables et sévères de la maladie, que ça soit la MC ou la RCH. Par contre, la présence de PG semble plus liée à la physiopathologie de la PR qu'à la sévérité de la maladie. Aucune donnée n'est sortie concluante en terme de réponse clinique aux anti-TNF dans les MICI ou la PR. Parallèlement à ce travail, nous avons voulu explorer l'hypothèse de la PAD bactérienne en tant que facteur déclenchant la rupture de la tolérance immunitaire grâce à la mise au point d'un modèle de rat arthritique. Bien que très préliminaires, les premiers résultats sont encourageants puisque nous arrivons à provoquer une perte d'os alvéolaire chez les rats infectés et que cette infection semble se traduire par une atteinte osseuse infraclinique au

niveau de la cheville plusieurs semaines après l'inoculation. Même si l'action de la PAD semble intéressante dans le cadre de la PR et de la survenue des anticorps anti-CCP, nous avons voulu approfondir l'effet pathogène direct de PG sur les cellules cibles de cette maladie grâce à une étude transcriptomique par puce ADN, permettant l'analyse d'un grand nombre de transcrits. Pour déclencher une activation cellulaire, nous avons montré qu'il fallait utiliser des bactéries vivantes de PG, sans toutefois excéder une certaine concentration qui devenait alors toxique pour les synoviocytes.

2. Etudes complémentaires liées à l'immunogénicité

La détermination de facteurs prédictifs de réponse aux anti-TNF est une nécessité largement reconnue pour optimiser la prise en charge thérapeutique des patients. Parmi toutes les pistes explorées, l'apparition d'une immunogénicité contre le médicament semble prépondérante dans la perte de réponse au traitement. Il reste cependant plusieurs points non élucidés par ces anticorps anti-médicament. En effet, plusieurs patients ne vont pas présenter une réponse clinique malgré des taux sériques détectables en anti-TNF, taux pourtant liés le plus souvent à une efficacité thérapeutique. Le traitement devant bloquer le TNF au niveau local sur les sites inflammatoires pour être efficace, la question s'est alors posée de savoir si les taux sériques étaient le reflet de l'imprégnation tissulaire en anti-TNF. Une étude récente réalisée sur 30 patients MICI traités par infliximab ou adalimumab montre la corrélation des taux sériques et tissulaires en anti-TNF dans les zones non inflammatoires de la muqueuse intestinale[546]. Néanmoins, cette corrélation n'est pas décrite au niveau des échantillons de muqueuse inflammatoire, avec des taux d'anti-TNF retrouvés à des concentrations plus faibles. Les patients ayant une maladie active ont une plus grande différence entre la concentration sérique et locale en anti-TNF que les patients présentant une rémission clinique. Ces données suggèrent que l'inflammation tissulaire locale caractérisée par l'expression d'un taux élevé de TNF agit en consommant l'anti-TNF localement. Les taux tissulaires seraient alors insuffisants pour neutraliser la production locale de TNF au niveau intestinal.

L'optimisation de la dose d'anti-TNF serait alors intéressante à monitorer selon le taux local de médicament chez ces patients. Pour pouvoir répondre à cette hypothèse, il est maintenant nécessaire de réaliser une étude clinique sur chacune des MICI afin de déterminer si l'augmentation de la posologie en anti-TNF est suivie d'une augmentation de la concentration tissulaire de ces traitements, ainsi qu'une amélioration de la réponse clinique. Toutefois, l'obtention d'une biospie intestinale reste un act invasif et, de ce fait, plus difficilement réalisable qu'un prélèvement sanguin. L'inflammation intestinale étant mesurable dans les selles par le dosage de la calprotectine, une autre hytpothèse envisageable serait la détection du traitement (et des anticorps anti-médicament) sur le même support. La technique de dosage dans les tissues et dans les selles nécessitent encore une étape de mise au point dans le service. De même pour les patients PR, il serait sûrement intéressant de pouvoir étudier la concentration en anti-TNF au niveau du liquide synoviale afin de montrer si des différences existent entre les répondeurs et les non-répondeurs.

En dehors de l'évaluation tissulaire du taux d'anti-TNF, il y a encore des précisions à apporter au niveau du dosage sérique du médicament et de ses anticorps. Ainsi, il faudrait réaliser une comparaison inter techniques sur une large cohorte de patients afin de corréler des « cut-off »

entre les différentes méthodes de dosage pour une meilleure interprétation des taux. Dans la PR, il est maintenant nécessaire d'affiner les seuils en anti-TNF pouvant prédire une réponse thérapeutique afin de pouvoir élaborer des algorithmes décisionnels plus précis dans cette indication. De même, il serait judicieux de faire un suivi des patients et de leurs anticorps afin de déterminer si les patients PR développent des ADAs de manière transitoire ou permanente et quelles seraient les conséquences de ces types d'ADAs dans la perte de réponse au traitement. Enfin, il est rapporté que les patients ayant développés des anticorps anti-infliximab auront plus de probabilité pour s'immuniser envers l'adalimumab. Cependant, il serait également intéressant de voir si une première immunisation envers un anti-TNF serait prédictive d'une induction d'anticorps contre d'autres biothérapies, notamment le tocilizumab.

Références

1. Carswell, E. A. *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72,** 3666–3670 (1975).
2. Bradley, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.* **214,** 149–160 (2008).
3. NF-kB Target Genes » NF-kB Transcription Factors | Boston University. at <http://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/>
4. Mark, K. S., Trickler, W. J. & Miller, D. W. Tumor necrosis factor-alpha induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin release in brain microvessel endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **297,** 1051–1058 (2001).
5. Chen, X. *et al.* TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4+Foxp3+ regulatory T. cell phenotype in the inflammatory environment. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **190,** 1076–1084 (2013).
6. Palladino, M. A., Bahjat, F. R., Theodorakis, E. A. & Moldawer, L. L. Anti-TNF-alpha therapies: the next generation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2,** 736–746 (2003).
7. Robak, T., Gladalska, A. & Stepień, H. The tumour necrosis factor family of receptors/ligands in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *Eur. Cytokine Netw.* **9,** 145–154 (1998).
8. Nürnberger, W. *et al.* Definition of a new score for severity of generalized Neisseria meningitidis infection. *Eur. J. Pediatr.* **154,** 896–900 (1995).
9. Waage, A., Halstensen, A. & Espevik, T. Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet* **1,** 355–357 (1987).
10. Ware, C. F. NETWORK COMMUNICATIONS: Lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu. Rev. Immunol.* **23,** 787–819 (2005).

11. Sonje, M. B., Abram, M., Stenzel, W. & Deckert, M. Listeria monocytogenes (delta-actA mutant) infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient neonatal mice. *Microb. Pathog.* **49,** 186–195 (2010).

12. Roach, D. R. *et al.* TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **168,** 4620–4627 (2002).

13. Aoki, R. *et al.* Mast cells play a key role in host defense against herpes simplex virus infection through TNF-α and IL-6 production. *J. Invest. Dermatol.* **133,** 2170–2179 (2013).

14. Orange, J. S. & Biron, C. A. Characterization of early IL-12, IFN-alphabeta, and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **156,** 4746–4756 (1996).

15. Fell, H. B. & Jubb, R. W. The effect of synovial tissue on the breakdown of articular cartilage in organ culture. *Arthritis Rheum.* **20,** 1359–1371 (1977).

16. Saklatvala, J., Sarsfield, S. J. & Pilsworth, L. M. Characterization of proteins from human synovium and mononuclear leucocytes that induce resorption of cartilage proteoglycan in vitro. *Biochem. J.* **209,** 337–344 (1983).

17. Saklatvala, J. Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature* **322,** 547–549 (1986).

18. Shrivastava, A. K. *et al.* Inflammatory markers in patients with rheumatoid arthritis. *Allergol. Immunopathol. (Madr.)* **43,** 81–87 (2015).

19. Chu, C. Q., Field, M., Feldmann, M. & Maini, R. N. Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **34,** 1125–1132 (1991).

20. Brennan, F. M., Chantry, D., Jackson, A. M., Maini, R. N. & Feldmann, M. Cytokine production in culture by cells isolated from the synovial membrane. *J. Autoimmun.* **2 Suppl,** 177–186 (1989).

21. Bertolini, D. R., Nedwin, G. E., Bringman, T. S., Smith, D. D. & Mundy, G. R. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature* **319,** 516–518 (1986).

22. Teitelbaum, S. L. Bone resorption by osteoclasts. *Science* **289,** 1504–1508 (2000).

23. Schett, G. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Osteoclasts. *Arthritis Res. Ther.* **9,** 203 (2007).

24. Diarra, D. *et al.* Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat. Med.* **13,** 156–163 (2007).

25. Maruotti, N., Grano, M., Colucci, S., d' Onofrio, F. & Cantatore, F. P. Osteoclastogenesis and arthritis. *Clin. Exp. Med.* **11,** 137–145 (2011).

26. Amălinei, C., Căruntu, I. D., Giuşcă, S. E. & Bălan, R. A. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Romanian J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol.* **51,** 215–228 (2010).

27. Li, N.-G., Tang, Y.-P., Duan, J.-A. & Shi, Z.-H. Matrix metalloproteinase inhibitors: a patent review (2011 - 2013). *Expert Opin. Ther. Pat.* **24,** 1039–1052 (2014).

28. Fiedorczyk, M., Klimiuk, P. A., Sierakowski, S., Gindzienska-Sieskiewicz, E. & Chwiecko, J. Serum matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with early rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **33,** 1523–1529 (2006).

29. Lohmander, L. S., Hoerrner, L. A. & Lark, M. W. Metalloproteinases, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **36,** 181–189 (1993).

30. Tchetverikov, I. *et al.* MMP protein and activity levels in synovial fluid from patients with joint injury, inflammatory arthritis, and osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **64,** 694–698 (2005).

31. Galil, S. M. A., El-Shafey, A. M., Hagrass, H. A., Fawzy, F. & Sammak, A. E. Baseline serum level of matrix metalloproteinase-3 as a biomarker of progressive joint damage in rheumatoid arthritis patients. *Int. J. Rheum. Dis.* (2014). doi:10.1111/1756-185X.12434

32. Mamehara, A. *et al.* Serum matrix metalloproteinase-3 as predictor of joint destruction in rheumatoid arthritis, treated with non-biological disease modifying anti-rheumatic drugs. *Kobe J. Med. Sci.* **56,** E98–107 (2010).

33. Gravallese, E. M. & Walsh, N. C. Rheumatoid arthritis: Repair of erosion in RA--shifting the balance to formation. *Nat. Rev. Rheumatol.* **7,** 626–628 (2011).

34. Cavender, D., Saegusa, Y. & Ziff, M. Stimulation of endothelial cell binding of lymphocytes by tumor necrosis factor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **139,** 1855–1860 (1987).

35. Gamble, J. R., Harlan, J. M., Klebanoff, S. J. & Vadas, M. A. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82,** 8667–8671 (1985).

36. Keffer, J. *et al.* Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* **10,** 4025–4031 (1991).

37. Williams, R. O., Feldmann, M. & Maini, R. N. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89,** 9784–9788 (1992).

38. Williams, R. O., Marinova-Mutafchieva, L., Feldmann, M. & Maini, R. N. Evaluation of TNF-alpha and IL-1 blockade in collagen-induced arthritis and comparison with

combined anti-TNF-alpha/anti-CD4 therapy. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **165,** 7240–7245 (2000).

39. Haworth, C. *et al.* Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor-alpha. *Eur. J. Immunol.* **21,** 2575–2579 (1991).

40. Brennan, F. M., Chantry, D., Jackson, A., Maini, R. & Feldmann, M. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* **2,** 244–247 (1989).

41. Monaco, C., Nanchahal, J., Taylor, P. & Feldmann, M. Anti-TNF therapy: past, present and future. *Int. Immunol.* **27,** 55–62 (2015).

42. Murch, S. H., Lamkin, V. A., Savage, M. O., Walker-Smith, J. A. & MacDonald, T. T. Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease. *Gut* **32,** 913–917 (1991).

43. Owczarek, D., Cibor, D., Głowacki, M. K., Cieśla, A. & Mach, P. TNF-α and soluble forms of TNF receptors 1 and 2 in the serum of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Pol. Arch. Med. Wewnętrznej* **122,** 616–623 (2012).

44. Raddatz, D., Bockemühl, M. & Ramadori, G. Quantitative measurement of cytokine mRNA in inflammatory bowel disease: relation to clinical and endoscopic activity and outcome. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **17,** 547–557 (2005).

45. Olsen, T. *et al.* Tissue levels of tumor necrosis factor-alpha correlates with grade of inflammation in untreated ulcerative colitis. *Scand. J. Gastroenterol.* **42,** 1312–1320 (2007).

46. Neurath, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* **14,** 329–342 (2014).

47. Ma, T. Y. *et al.* TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **286,** G367–376 (2004).

48. Marchiando, A. M. *et al.* The epithelial barrier is maintained by in vivo tight junction expansion during pathologic intestinal epithelial shedding. *Gastroenterology* **140,** 1208–1218.e1–2 (2011).

49. Cunningham, K. E. & Turner, J. R. Myosin light chain kinase: pulling the strings of epithelial tight junction function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1258,** 34–42 (2012).

50. Blair, S. A., Kane, S. V., Clayburgh, D. R. & Turner, J. R. Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **86,** 191–201 (2006).

51. Zolotarevsky, Y. *et al.* A membrane-permeant peptide that inhibits MLC kinase restores barrier function in in vitro models of intestinal disease. *Gastroenterology* **123,** 163–172 (2002).

52. Clayburgh, D. R. *et al.* Epithelial myosin light chain kinase-dependent barrier dysfunction mediates T cell activation-induced diarrhea in vivo. *J. Clin. Invest.* **115,** 2702–2715 (2005).

53. Owczarek, D., Cibor, D., Głowacki, M. K., Cieśla, A. & Mach, P. TNF-α and soluble forms of TNF receptors 1 and 2 in the serum of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Pol. Arch. Med. Wewnętrznej* **122,** 616–623 (2012).

54. Mizoguchi, E. *et al.* Role of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in colonic epithelial hyperplasia and chronic intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology* **122,** 134–144 (2002).

55. Holtmann, M. H. *et al.* Tumor necrosis factor-receptor 2 is up-regulated on lamina propria T cells in Crohn's disease and promotes experimental colitis in vivo. *Eur. J. Immunol.* **32,** 3142–3151 (2002).

56. Goretsky, T. *et al.* p53 mediates TNF-induced epithelial cell apoptosis in IBD. *Am. J. Pathol.* **181,** 1306–1315 (2012).

57. Perrier, C. *et al.* Neutralization of membrane TNF, but not soluble TNF, is crucial for the treatment of experimental colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **19,** 246–253 (2013).

58. Holtmann, M. H. *et al.* Tumor necrosis factor-receptor 2 is up-regulated on lamina propria T cells in Crohn's disease and promotes experimental colitis in vivo. *Eur. J. Immunol.* **32,** 3142–3151 (2002).

59. these_Aline Schindele_Nov 2009 - SCDPHA_T_2009_SCHINDELE_ALINE.pdf. at <http://docnum.univ-lorraine.fr/public/SCDPHA_T_2009_SCHINDELE_ALINE.pdf>

60. RECEPTEUR D'ANTIGENE ET GENERATION DU REPERTOIRE DES LYMPHOCYTES B - page82-6.-anticorps.pdf. at <http://www.assim.refer.org/raisil/raisil/L02_files/page82-6.-anticorps.pdf>

61. Knight, D. M. *et al.* Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol. Immunol.* **30,** 1443–1453 (1993).

62. Liang, S. *et al.* Structural basis for treating tumor necrosis factor α (TNFα)-associated diseases with the therapeutic antibody infliximab. *J. Biol. Chem.* **288,** 13799–13807 (2013).

63. Salfeld, J. & Kupper, H. in *Biologics in General Medicine* (eds. MA, P. D. med W.-H. B. & Radeke, P. D. med H. H.) 14–31 (Springer Berlin Heidelberg, 2007). at <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-29018-6_3>

64. Rau, R. Adalimumab (a fully human anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) in the treatment of active rheumatoid arthritis: the initial results of five trials. *Ann. Rheum. Dis.* **61 Suppl 2,** ii70–73 (2002).

65. 3930B1_02_B-Abbott-Humira Prescribing Info.pdf. at <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/briefing/3930B1_02_B-Abbott-Humira%20Prescribing%20Info.pdf>

66. Nuñez-Prado, N. *et al.* The coming of age of engineered multivalent antibodies. *Drug Discov. Today* **20,** 588–594 (2015).

67. Goel, N. & Stephens, S. Certolizumab pegol. *mAbs* **2,** 137–147 (2010).

68. Nesbitt, A. *et al.* Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): in vitro comparison with other anti-tumor necrosis factor alpha agents. *Inflamm. Bowel Dis.* **13,** 1323–1332 (2007).

69. Mahadevan, U. *et al.* Placental Transfer of Anti-Tumor Necrosis Factor Agents in Pregnant Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **11,** 286–e24 (2013).

70. Mahadevan, U. & Abreu, M. T. 960 Certolizumab Use in Pregnancy: Low Levels Detected in Cord Blood. *Gastroenterology* **136,** A–146 (2009).

71. Mazumdar, S. & Greenwald, D. Golimumab. *mAbs* **1,** 422–431 (2009).

72. Microsoft Word - SIM11182011CPM.SNDS.doc - SIM11182011CPM.SNDS.pdf. at <http://www.mun.ca/pharmacy/aboutpharmacy/SIM11182011CPM.SNDS.pdf>

73. Goffe, B. & Cather, J. C. Etanercept: An overview. *J. Am. Acad. Dermatol.* **49,** 105–111 (2003).

74. Molta, C. T. in *Biologics in General Medicine* (eds. MA, P. D. med W.-H. B. & Radeke, P. D. med H. H.) 32–41 (Springer Berlin Heidelberg, 2007). at <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-29018-6_4>

75. Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E. H., Salfeld, J. G. & Tak, P. P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* **117,** 244–279 (2008).

76. Keystone, E. C. & Ware, C. F. Tumor necrosis factor and anti-tumor necrosis factor therapies. *J. Rheumatol. Suppl.* **85,** 27–39 (2010).

77. Jinesh, S. Pharmaceutical aspects of anti-inflammatory TNF-blocking drugs. *Inflammopharmacology* **23,** 71–77 (2015).

78. Scheen, A. J. & Moutschen, M. [Therapeutic monoclonal antibodies]. *Rev. Médicale Liège* **64,** 233–236 (2009).

79. Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A. & Oi, V. T. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81,** 6851–6855 (1984).

80. Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S. & Winter, G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* **321,** 522–525 (1986).

81. Monographie EPHE : Diplôme Audrey Stoessel - ephe_dip_stoessel-12.pdf. at <http://www.ephe.fr/images/stories/scd_ephe/monographies_svt/biol_cell_mol/ephe_dip_stoessel-12.pdf>

82. Traggiai, E. *et al.* An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat. Med.* **10,** 871–875 (2004).

83. Mitragotri, S., Burke, P. A. & Langer, R. Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13,** 655–672 (2014).

84. Dall'Acqua, W. F., Kiener, P. A. & Wu, H. Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *J. Biol. Chem.* **281,** 23514–23524 (2006).

85. Zalevsky, J. *et al.* Enhanced antibody half-life improves in vivo activity. *Nat. Biotechnol.* **28,** 157–159 (2010).

86. Vincent, K. J. & Zurini, M. Current strategies in antibody engineering: Fc engineering and pH-dependent antigen binding, bispecific antibodies and antibody drug conjugates. *Biotechnol. J.* **7,** 1444–1450 (2012).

87. Igawa, T. *et al.* Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization. *Nat. Biotechnol.* **28,** 1203–1207 (2010).

88. Grevys, A. *et al.* Fc Engineering of Human IgG1 for Altered Binding to the Neonatal Fc Receptor Affects Fc Effector Functions. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **194,** 5497–5508 (2015).

89. Lazar, G. A. *et al.* Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103,** 4005–4010 (2006).

90. Mössner, E. *et al.* Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* **115,** 4393–4402 (2010).

91. Xu, D. *et al.* In vitro characterization of five humanized OKT3 effector function variant antibodies. *Cell. Immunol.* **200,** 16–26 (2000).

92. Moore, G. L., Chen, H., Karki, S. & Lazar, G. A. Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *mAbs* **2,** 181–189 (2010).

93. Cimzia, INN-certolizumab pegol - WC500069763.pdf. at <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/001037/WC500069763.pdf>

94. Enbrel, INN-etanercept - WC500027361.pdf. at <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000262/WC500027361.pdf>

95. Humira, INN_adalimumab - WC500050870.pdf. at <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000481/WC500050870.pdf>

96. Remicade, INN-infliximab - WC500050888.pdf. at <http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000240/WC500050888.pdf>

97. Simponi, INN-golimumab - WC500052368.pdf. at <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000992/WC500052368.pdf>

98. Mozaffari, S., Nikfar, S., Abdolghaffari, A. H. & Abdollahi, M. New biologic therapeutics for ulcerative colitis and Crohn's disease. *Expert Opin. Biol. Ther.* **14,** 583–600 (2014).

99. Genovese, M. C. *et al.*, 20000223 Study Group. Combination therapy with etanercept and anakinra in the treatment of patients with rheumatoid arthritis who have been treated unsuccessfully with methotrexate. *Arthritis Rheum.* **50,** 1412–1419 (2004).

100. Press release_first biosimilar MAB - WC500144941.pdf. at <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2013/06/WC500144941.pdf>

101. Structural Comparison of Infliximab and a Biosimilar via Subunit Analysis Using the Waters Biopharmaceutical Platform with UNIFI - 720004796en.pdf. at <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004796en.pdf>

102. Rinaudo-Gaujous, M. *et al.* Review article: biosimilars are the next generation of drugs for liver and gastrointestinal diseases. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **38,** 914–924 (2013).

103. Amiot, A. & Peyrin-Biroulet, L. Current, new and future biological agents on the horizon for the treatment of inflammatory bowel diseases. *Ther. Adv. Gastroenterol.* **8,** 66–82 (2015).

104. Urech, D. M. *et al.* Anti-inflammatory and cartilage-protecting effects of an intra-articularly injected anti-TNF{alpha} single-chain Fv antibody (ESBA105) designed for local therapeutic use. *Ann. Rheum. Dis.* **69,** 443–449 (2010).

105. Chang, H. *et al.* A novel human scFv fragment against TNF-alpha from de novo design method. *Mol. Immunol.* **44,** 3789–3796 (2007).

106. Geng, S. *et al.* A novel anti-TNF scFv constructed with human antibody frameworks and antagonistic peptides. *Immunol. Res.* **62,** 377–385 (2015).

107. Coppieters, K. *et al.* Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **54,** 1856–1866 (2006).

108. Kratz, F. & Elsadek, B. Clinical impact of serum proteins on drug delivery. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **161,** 429–445 (2012).

109. Bhol, K. C. *et al.* AVX-470: a novel oral anti-TNF antibody with therapeutic potential in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **19,** 2273–2281 (2013).

110. Löwenberg, M. & D'Haens, G. Next-Generation Therapeutics for IBD. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **17,** 21 (2015).

111. Targan, S. R. *et al.* A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N. Engl. J. Med.* **337,** 1029–1035 (1997).

112. Lémann, M. *et al.*, Groupe d'Etude Therapeutique des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID). Infliximab plus azathioprine for steroid-dependent Crohn's disease patients: a randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterology* **130,** 1054–1061 (2006).

113. Colombel, J. F. *et al.*, SONIC Study Group. Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* **362,** 1383–1395 (2010).

114. Hanauer, S. B. *et al.*, ACCENT I Study Group. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* **359,** 1541–1549 (2002).

115. Rutgeerts, P. *et al.* Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease. *Gastroenterology* **117,** 761–769 (1999).

116. Sands, B. E., Blank, M. A., Diamond, R. H., Barrett, J. P. & Van Deventer, S. J. Maintenance infliximab does not result in increased abscess development in fistulizing Crohn's disease: results from the ACCENT II study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **23,** 1127–1136 (2006).

117. Sands, B. E., Blank, M. A., Patel, K. & van Deventer, S. J., ACCENT II Study. Long-term treatment of rectovaginal fistulas in Crohn's disease: response to infliximab in the ACCENT II Study. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **2,** 912–920 (2004).

118. UEG Week 2013 Oral Presentations. *United Eur. Gastroenterol. J.* **1,** A1–A134 (2013).

119. Paul, S., Roblin, X. & Peyrin-Biroulet, L. Letter: infliximab de-escalation based on trough levels in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **42,** 939–940 (2015).

120. Sands, B. E. *et al.* Infliximab in the treatment of severe, steroid-refractory ulcerative colitis: a pilot study. *Inflamm. Bowel Dis.* **7,** 83–88 (2001).

121. Probert, C. S. J. *et al.* Infliximab in moderately severe glucocorticoid resistant ulcerative colitis: a randomised controlled trial. *Gut* **52,** 998–1002 (2003).

122. Rutgeerts, P. *et al.* Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* **353,** 2462–2476 (2005).

123. Maini, R. *et al.* Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet* **354,** 1932–1939 (1999).

124. Smolen, J. S. *et al.*, ATTRACT Study Group. Evidence of radiographic benefit of treatment with infliximab plus methotrexate in rheumatoid arthritis patients who had no clinical improvement: a detailed subanalysis of data from the anti-tumor necrosis factor trial in rheumatoid arthritis with concomitant therapy study. *Arthritis Rheum.* **52,** 1020–1030 (2005).

125. Maini, R. N. *et al.*, Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. Sustained improvement over two years in physical function, structural damage, and signs and symptoms among patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab and methotrexate. *Arthritis Rheum.* **50,** 1051–1065 (2004).

126. Lipsky, P. E. *et al.*, Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. 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.* **343,** 1594–1602 (2000).

127. Hanauer, S. B. *et al.* Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. *Gastroenterology* **130,** 323–333; quiz 591 (2006).

128. Sandborn, W. J. *et al.* Adalimumab for maintenance treatment of Crohn's disease: results of the CLASSIC II trial. *Gut* **56,** 1232–1239 (2007).

129. Loftus, E. V. *et al.* Effects of adalimumab maintenance therapy on health-related quality of life of patients with Crohn's disease: patient-reported outcomes of the CHARM trial. *Am. J. Gastroenterol.* **103,** 3132–3141 (2008).

130. Sandborn, W. J. *et al.* Adalimumab induction therapy for Crohn disease previously treated with infliximab: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **146,** 829–838 (2007).

131. Reinisch, W. *et al.* Adalimumab for induction of clinical remission in moderately to severely active ulcerative colitis: results of a randomised controlled trial. *Gut* **60,** 780–787 (2011).

132. Sandborn, W. J. *et al.* Adalimumab induces and maintains clinical remission in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. *Gastroenterology* **142,** 257–265.e1–3 (2012).

133. Sandborn, W. J. *et al.* One-year maintenance outcomes among patients with moderately-to-severely active ulcerative colitis who responded to induction therapy with adalimumab: subgroup analyses from ULTRA 2. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **37,** 204–213 (2013).

134. Keystone, E. C. *et al.* Radiographic, clinical, and functional outcomes of treatment with adalimumab (a human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody) in patients

with active rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate therapy: a randomized, placebo-controlled, 52-week trial. *Arthritis Rheum.* **50,** 1400–1411 (2004).

135. Breedveld, F. C. *et al.* The PREMIER study: A multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis Rheum.* **54,** 26–37 (2006).

136. Kavanaugh, A. *et al.* Clinical, functional and radiographic consequences of achieving stable low disease activity and remission with adalimumab plus methotrexate or methotrexate alone in early rheumatoid arthritis: 26-week results from the randomised, controlled OPTIMA study. *Ann. Rheum. Dis.* **72,** 64–71 (2013).

137. Sandborn, W. J. *et al.* Etanercept for active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* **121,** 1088–1094 (2001).

138. Enbrel, INN-etanercept - WC500027361.pdf. at <http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000262/WC500027361.pdf>

139. Mathias, S. D. *et al.* Health-related quality of life and functional status of patients with rheumatoid arthritis randomly assigned to receive etanercept or placebo. *Clin. Ther.* **22,** 128–139 (2000).

140. Weinblatt, M. E. *et al.* Efficacy and safety of etanercept 50 mg twice a week in patients with rheumatoid arthritis who had a suboptimal response to etanercept 50 mg once a week: results of a multicenter, randomized, double-blind, active drug-controlled study. *Arthritis Rheum.* **58,** 1921–1930 (2008).

141. Klareskog, L. *et al.*, TEMPO (Trial of Etanercept and Methotrexate with Radiographic Patient Outcomes) study investigators. Therapeutic effect of the combination of etanercept

and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet* **363,** 675–681 (2004).

142. Smolen, J. S. *et al.* Maintenance, reduction, or withdrawal of etanercept after treatment with etanercept and methotrexate in patients with moderate rheumatoid arthritis (PRESERVE): a randomised controlled trial. *Lancet* **381,** 918–929 (2013).

143. Schreiber, S. *et al.*, CDP870 Crohn's Disease Study Group. A randomized, placebo-controlled trial of certolizumab pegol (CDP870) for treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology* **129,** 807–818 (2005).

144. Sandborn, W. J. *et al.*, PRECISE 1 Study Investigators. Certolizumab pegol for the treatment of Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* **357,** 228–238 (2007).

145. Sandborn, W. J. *et al.* Certolizumab pegol for active Crohn's disease: a placebo-controlled, randomized trial. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **9,** 670–678.e3 (2011).

146. Schreiber, S. *et al.*, PRECISE 2 Study Investigators. Maintenance therapy with certolizumab pegol for Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* **357,** 239–250 (2007).

147. Smolen, J. *et al.* Efficacy and safety of certolizumab pegol plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: the RAPID 2 study. A randomised controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* **68,** 797–804 (2009).

148. Keystone, E. *et al.* Certolizumab pegol plus methotrexate is significantly more effective than placebo plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: findings of a fifty-two-week, phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Arthritis Rheum.* **58,** 3319–3329 (2008).

149. Fleischmann, R. *et al.* Efficacy and safety of certolizumab pegol monotherapy every 4 weeks in patients with rheumatoid arthritis failing previous disease-modifying antirheumatic therapy: the FAST4WARD study. *Ann. Rheum. Dis.* **68,** 805–811 (2009).

150. Furst, D. E. *et al.* Two dosing regimens of certolizumab pegol in patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res.* **67,** 151–160 (2015).

151. Weinblatt, M. E. *et al.* Efficacy and safety of certolizumab pegol in a broad population of patients with active rheumatoid arthritis: results from the REALISTIC phase IIIb study. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **51,** 2204–2214 (2012).

152. Sandborn, W. J. *et al.*, PURSUIT-SC Study Group. Subcutaneous golimumab induces clinical response and remission in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. *Gastroenterology* **146,** 85–95; quiz e14–15 (2014).

153. Sandborn, W. J. *et al.*, PURSUIT-Maintenance Study Group. Subcutaneous golimumab maintains clinical response in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. *Gastroenterology* **146,** 96–109.e1 (2014).

154. Rutgeerts, P. *et al.*, PURSUIT-IV study group. Randomised clinical trial: a placebo-controlled study of intravenous golimumab induction therapy for ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **42,** 504–514 (2015).

155. Emery, P. *et al.* Golimumab, a human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, injected subcutaneously every four weeks in methotrexate-naive 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.* **60,** 2272–2283 (2009).

156. Keystone, E. *et al.* Golimumab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy: 52-week results of the GO-FORWARD study. *Ann. Rheum. Dis.* **69,** 1129–1135 (2010).

157. Smolen, J. S. *et al.*, GO-AFTER study investigators. Golimumab in patients with active rheumatoid arthritis after treatment with tumour necrosis factor alpha inhibitors

(GO-AFTER study): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. *Lancet* **374,** 210–221 (2009).

158. Aaltonen, K. J. *et al.* Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of existing TNF blocking agents in treatment of rheumatoid arthritis. *PloS One* **7,** e30275 (2012).

159. Singh, J. A. *et al.* Biologics for rheumatoid arthritis: an overview of Cochrane reviews. *São Paulo Med. J. Rev. Paul. Med.* **128,** 309–310 (2010).

160. Van Schie, K. A. *et al.* The antibody response against human and chimeric anti-TNF therapeutic antibodies primarily targets the TNF binding region. *Ann. Rheum. Dis.* **74,** 311–314 (2015).

161. Bendtzen, K. Immunogenicity of Anti-TNF-α Biotherapies: II. Clinical Relevance of Methods Used for Anti-Drug Antibody Detection. *Front. Immunol.* **6,** 109 (2015).

162. Carrascosa, J. M. Immunogenicity in biologic therapy: implications for dermatology. *Actas Dermo-Sifiliográficas* **104,** 471–479 (2013).

163. Van Schouwenburg, P. A., Rispens, T. & Wolbink, G. J. Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **9,** 164–172 (2013).

164. Moss, A. C., Brinks, V. & Carpenter, J. F. Review article: immunogenicity of anti-TNF biologics in IBD - the role of patient, product and prescriber factors. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **38,** 1188–1197 (2013).

165. Nanda, K. S., Cheifetz, A. S. & Moss, A. C. Impact of antibodies to infliximab on clinical outcomes and serum infliximab levels in patients with inflammatory bowel disease (IBD): a meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* **108,** 40–47; quiz 48 (2013).

166. Bartelds, G. M. *et al.* Anti-adalimumab antibodies in rheumatoid arthritis patients are associated with interleukin-10 gene polymorphisms. *Arthritis Rheum.* **60,** 2541–2542 (2009).

167. Hanauer, S. B. *et al.* Incidence and importance of antibody responses to infliximab after maintenance or episodic treatment in Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **2,** 542–553 (2004).

168. Vande Casteele, N. *et al.* Antibody response to infliximab and its impact on pharmacokinetics can be transient. *Am. J. Gastroenterol.* **108,** 962–971 (2013).

169. Steenholdt, C. *et al.* Pre-existing IgG antibodies cross-reacting with the Fab region of infliximab predict efficacy and safety of infliximab therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **37,** 1172–1183 (2013).

170. Vermeire, S. *et al.* Effectiveness of concomitant immunosuppressive therapy in suppressing the formation of antibodies to infliximab in Crohn's disease. *Gut* **56,** 1226–1231 (2007).

171. Van Schouwenburg, P. A., Rispens, T. & Wolbink, G. J. Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **9,** 164–172 (2013).

172. Ben-Horin, S. *et al.* Addition of an immunomodulator to infliximab therapy eliminates antidrug antibodies in serum and restores clinical response of patients with inflammatory bowel disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **11,** 444–447 (2013).

173. Kerbleski, J. F. & Gottlieb, A. B. Dermatological complications and safety of anti-TNF treatments. *Gut* **58,** 1033–1039 (2009).

174. Atzeni, F. *et al.* Investigating the potential side effects of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis: cause for concern? *Immunotherapy* **7,** 353–361 (2015).

175. Ali, T. *et al.* Clinical use of anti-TNF therapy and increased risk of infections. *Drug Healthc. Patient Saf.* **5,** 79–99 (2013).

176. Tolérance aux biothérapies | FMC-HGE. at <http://www.fmcgastro.org/postu-main/archives/postu-2012-paris/textes-postu-2012-paris/tolerance-aux-biotherapies/>

177. Williams, C. J. M., Peyrin-Biroulet, L. & Ford, A. C. Systematic review with meta-analysis: malignancies with anti-tumour necrosis factor-α therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **39,** 447–458 (2014).

178. Moulis, G. *et al.* Cancer risk of anti-TNF-α at recommended doses in adult rheumatoid arthritis: a meta-analysis with intention to treat and per protocol analyses. *PloS One* **7,** e48991 (2012).

179. Osterman, M. T. *et al.* Increased risk of malignancy with adalimumab combination therapy, compared with monotherapy, for Crohn's disease. *Gastroenterology* **146,** 941–949 (2014).

180. Zampeli, E., Gizis, M., Siakavellas, S. I. & Bamias, G. Predictors of response to anti-tumor necrosis factor therapy in ulcerative colitis. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* **5,** 293–303 (2014).

181. Sandborn, W. J. *et al.* Colectomy rate comparison after treatment of ulcerative colitis with placebo or infliximab. *Gastroenterology* **137,** 1250–1260; quiz 1520 (2009).

182. Gonzalez-Lama, Y. *et al.*, Group for the Study of Inflammatory Bowel Diseases from Madrid. Open-label infliximab therapy in ulcerative colitis: a multicenter survey of results and predictors of response. *Hepatogastroenterology.* **55,** 1609–1614 (2008).

183. Armuzzi, A. *et al.* with Italian Group for the Study of Inflammatory Bowel Disease. Adalimumab in active ulcerative colitis: a 'real-life' observational study. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* **45,** 738–743 (2013).

184. McDermott, E. *et al.* Efficacy of Adalimumab as a long term maintenance therapy in ulcerative colitis. *J. Crohns Colitis* **7,** 150–153 (2013).

185. Taxonera, C. *et al.* Adalimumab induction and maintenance therapy for patients with ulcerative colitis previously treated with infliximab. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **33,** 340–348 (2011).

186. Ferrante, M. *et al.* Long-term outcome after infliximab for refractory ulcerative colitis. *J. Crohns Colitis* **2,** 219–225 (2008).

187. Colombel, J. F. *et al.* Early mucosal healing with infliximab is associated with improved long-term clinical outcomes in ulcerative colitis. *Gastroenterology* **141,** 1194–1201 (2011).

188. Oussalah, A. *et al.* A multicenter experience with infliximab for ulcerative colitis: outcomes and predictors of response, optimization, colectomy, and hospitalization. *Am. J. Gastroenterol.* **105,** 2617–2625 (2010).

189. Lee, K.-M. *et al.*, IBD study Group of Korean Association for the Study of Intestinal Diseases. Efficacy, safety, and predictors of response to infliximab therapy for ulcerative colitis: a Korean multicenter retrospective study. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **28,** 1829–1833 (2013).

190. Fasanmade, A. A., Adedokun, O. J., Olson, A., Strauss, R. & Davis, H. M. Serum albumin concentration: a predictive factor of infliximab pharmacokinetics and clinical response in patients with ulcerative colitis. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **48,** 297–308 (2010).

191. Armuzzi, A. *et al.* Infliximab in steroid-dependent ulcerative colitis: effectiveness and predictors of clinical and endoscopic remission. *Inflamm. Bowel Dis.* **19,** 1065–1072 (2013).

192. De Vos, M. *et al.*, behalf of BIRD. Fast and sharp decrease in calprotectin predicts remission by infliximab in anti-TNF naïve patients with ulcerative colitis. *J. Crohns Colitis* **6,** 557–562 (2012).

193. Ferrante, M. *et al.* Predictors of early response to infliximab in patients with ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **13,** 123–128 (2007).

194. Jürgens, M. *et al.* Disease activity, ANCA, and IL23R genotype status determine early response to infliximab in patients with ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* **105,** 1811–1819 (2010).

195. Rismo, R. *et al.* Mucosal cytokine gene expression profiles as biomarkers of response to infliximab in ulcerative colitis. *Scand. J. Gastroenterol.* **47,** 538–547 (2012).

196. Olsen, T., Goll, R., Cui, G., Christiansen, I. & Florholmen, J. TNF-alpha gene expression in colorectal mucosa as a predictor of remission after induction therapy with infliximab in ulcerative colitis. *Cytokine* **46,** 222–227 (2009).

197. Li, Z. *et al.* Reciprocal changes of Foxp3 expression in blood and intestinal mucosa in IBD patients responding to infliximab. *Inflamm. Bowel Dis.* **16,** 1299–1310 (2010).

198. Arijs, I. *et al.* Mucosal gene signatures to predict response to infliximab in patients with ulcerative colitis. *Gut* **58,** 1612–1619 (2009).

199. García-Bosch, O. *et al.* Observational study on the efficacy of adalimumab for the treatment of ulcerative colitis and predictors of outcome. *J. Crohns Colitis* **7,** 717–722 (2013).

200. Steenholdt, C., Bendtzen, K., Brynskov, J., Thomsen, O. Ø. & Ainsworth, M. A. Cut-off levels and diagnostic accuracy of infliximab trough levels and anti-infliximab antibodies in Crohn's disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **46,** 310–318 (2011).

201. Triantafillidis, J. K. *et al.* Similar response to adalimumab in patients with active Crohn's disease either naive to biologic agents or with prior loss of response or intolerance to infliximab. *e . Med co- h r. oc. Med c t. n* **114,** 85–90 (2010).

202. Ungar, B. *et al.* Ashkenazi jewish origin protects against formation of antibodies to infliximab and therapy failure. *Medicine (Baltimore)* **94,** e673 (2015).

203. Vermeire, S. *et al.*, Belgian Group of Infliximab Expanded Access Program in Crohn's Disease. Demographic and clinical parameters influencing the short-term outcome of anti-

tumor necrosis factor (infliximab) treatment in Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* **97,** 2357–2363 (2002).

204. Grover, Z., Biron, R., Carman, N. & Lewindon, P. Predictors of response to Infliximab in children with luminal Crohn's disease. *J. Crohns Colitis* **8,** 739–746 (2014).

205. Groselj, D., Grabec, I., Seme, K., Ihan, A. & Ferkolj, I. Prediction of clinical response to anti-TNF treatment by oral parameters in Crohn's disease. *Hepatogastroenterology.* **55,** 112–119 (2008).

206. Af Björkesten, C.-G. *et al.* Mucosal healing at 3 months predicts long-term endoscopic remission in anti-TNF-treated luminal Crohn's disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **48,** 543–551 (2013).

207. Reinisch, W., Wang, Y., Oddens, B. J. & Link, R. C-reactive protein, an indicator for maintained response or remission to infliximab in patients with Crohn's disease: a post-hoc analysis from ACCENT I. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **35,** 568–576 (2012).

208. Jürgens, M. *et al.* Levels of C-reactive protein are associated with response to infliximab therapy in patients with Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **9,** 421–427.e1 (2011).

209. Kiss, L. S. *et al.*, Hungarian IBD Study Group. Early clinical remission and normalisation of CRP are the strongest predictors of efficacy, mucosal healing and dose escalation during the first year of adalimumab therapy in Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **34,** 911–922 (2011).

210. Cornillie, F. *et al.* Postinduction serum infliximab trough level and decrease of C-reactive protein level are associated with durable sustained response to infliximab: a retrospective analysis of the ACCENT I trial. *Gut* **63,** 1721–1727 (2014).

211. Schmidt, C. *et al.* Predictive value of mucosal TNF-alpha transcripts in steroid-refractory Crohn's disease patients receiving intensive immunosuppressive therapy. *Inflamm. Bowel Dis.* **13,** 65–70 (2007).

212. Vatansever, A. *et al.* Effects of mucosal TNF-alpha levels on treatment response in Crohn's disease patients receiving anti-TNF treatment. *Hepatogastroenterology.* **61,** 2277–2282 (2014).

213. Atreya, R. *et al.* In vivo imaging using fluorescent antibodies to tumor necrosis factor predicts therapeutic response in Crohn's disease. *Nat. Med.* **20,** 313–318 (2014).

214. Bouchaud, G. *et al.* Interleukin-15 and its soluble receptor mediate the response to infliximab in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **138,** 2378–2387 (2010).

215. Esters, N. *et al.*, Belgian Group of Infliximab Expanded Access Program in Crohn's Disease. Serological markers for prediction of response to anti-tumor necrosis factor treatment in Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* **97,** 1458–1462 (2002).

216. Rismo, R. *et al.* Normalization of mucosal cytokine gene expression levels predicts long-term remission after discontinuation of anti-TNF therapy in Crohn's disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **48,** 311–319 (2013).

217. Niess, J. H. *et al.* NOD2 polymorphism predicts response to treatment in Crohn's disease--first steps to a personalized therapy. *Dig. Dis. Sci.* **57,** 879–886 (2012).

218. Vermeire, S. *et al.*, Belgian Group of Infliximab Expanded Access Program and Fondation Jean Dausset CEPH, Paris, France. NOD2/CARD15 does not influence response to infliximab in Crohn's disease. *Gastroenterology* **123,** 106–111 (2002).

219. Mascheretti, S. *et al.* Response to infliximab treatment in Crohn's disease is not associated with mutations in the CARD15 (NOD2) gene: an analysis in 534 patients from two multicenter, prospective GCP-level trials. *Pharmacogenetics* **12,** 509–515 (2002).

220. Barreiro-de Acosta, M. *et al.* NOD2, CD14 and TLR4 mutations do not influence response to adalimumab in patients with Crohn's disease: a preliminary report. *Rev. Esp. Enfermedades Dig. Organo Of. Soc. Esp. Patol. Dig.* **102,** 591–595 (2010).

221. Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S., Tsukamoto, H. & Shimoda, T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **49,** 1215–1228 (2010).

222. Moroi, R. *et al.* FCGR3A-158 polymorphism influences the biological response to infliximab in Crohn's disease through affecting the ADCC activity. *Immunogenetics* **65,** 265–271 (2013).

223. Louis, E. J. *et al.* Polymorphism in IgG Fc receptor gene FCGR3A and response to infliximab in Crohn's disease: a subanalysis of the ACCENT I study. *Pharmacogenet. Genomics* **16,** 911–914 (2006).

224. Louis, E. *et al.* Association between polymorphism in IgG Fc receptor IIIa coding gene and biological response to infliximab in Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **19,** 511–519 (2004).

225. Willot, S. *et al.* No association between C-reactive protein gene polymorphisms and decrease of C-reactive protein serum concentration after infliximab treatment in Crohn's disease. *Pharmacogenet. Genomics* **16,** 37–42 (2006).

226. Louis, E. *et al.* A positive response to infliximab in Crohn disease: association with a higher systemic inflammation before treatment but not with -308 TNF gene polymorphism. *Scand. J. Gastroenterol.* **37,** 818–824 (2002).

227. Thomas, D. *et al.* Association of rs1568885, rs1813443 and rs4411591 polymorphisms with anti-TNF medication response in Greek patients with Crohn's disease. *World J. Gastroenterol. WJG* **20,** 3609–3614 (2014).

228. Hlavaty, T. *et al.* Polymorphisms in apoptosis genes predict response to infliximab therapy in luminal and fistulizing Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **22,** 613–626 (2005).

229. Arijs, I. *et al.* Predictive value of epithelial gene expression profiles for response to infliximab in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **16,** 2090–2098 (2010).

230. Yuasa, S. *et al.* Treatment responses and their predictors in patients with rheumatoid arthritis treated with biological agents. *J. Med. Investig. JMI* **60,** 77–90 (2013).

231. Atzeni, F. *et al.* Predicting response to anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis patients. *Autoimmun. Rev.* **8,** 431–437 (2009).

232. Canhão, H. *et al.* Comparative effectiveness and predictors of response to tumour necrosis factor inhibitor therapies in rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **51,** 2020–2026 (2012).

233. Klaasen, R., Wijbrandts, C. A., Gerlag, D. M. & Tak, P. P. Body mass index and clinical response to infliximab in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **63,** 359–364 (2011).

234. Heimans, L. *et al.* Association of high body mass index with decreased treatment response to combination therapy in recent-onset rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Care Res.* **65,** 1235–1242 (2013).

235. Di Lernia, V., Ricci, C., Lallas, A. & Ficarelli, E. Clinical predictors of non-response to any tumor necrosis factor (TNF) blockers: a retrospective study. *J. Dermatol. Treat.* **25,** 73–74 (2014).

236. Gremese, E. *et al.*, Gruppo Italiano di Studio sulle Early Arthritis (GISEA). Obesity and reduction of the response rate to anti-tumor necrosis factor α in rheumatoid arthritis: an approach to a personalized medicine. *Arthritis Care Res.* **65,** 94–100 (2013).

237. Söderlin, M. K., Petersson, I. F. & Geborek, P. The effect of smoking on response and drug survival in rheumatoid arthritis patients treated with their first anti-TNF drug. *Scand. J. Rheumatol.* **41,** 1–9 (2012).

238. Savioli, C. *et al.* Persistent periodontal disease hampers anti-tumor necrosis factor treatment response in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Rheumatol. Pract. Rep. Rheum. Musculoskelet. Dis.* **18,** 180–184 (2012).

239. Atzeni, F. *et al.* Predictors of response to anti-TNF therapy in RA patients with moderate or high DAS28 scores. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* **81,** 37–40 (2014).

240. Salgado, E., Maneiro, J. R., Carmona, L. & Gómez-Reino, J. Rheumatoid factor and response to TNF antagonists in rheumatoid arthritis: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* **81,** 41–50 (2014).

241. Yukawa, N. *et al.* Correlation of antinuclear antibody and anti-double-stranded DNA antibody with clinical response to infliximab in patients with rheumatoid arthritis: a retrospective clinical study. *Arthritis Res. Ther.* **13,** R213 (2011).

242. Matsudaira, R. *et al.* Anti-Ro/SSA antibodies are an independent factor associated with an insufficient response to tumor necrosis factor inhibitors in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **38,** 2346–2354 (2011).

243. Chen, D.-Y. *et al.* Significant associations of antidrug antibody levels with serum drug trough levels and therapeutic response of adalimumab and etanercept treatment in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **74,** e16 (2015).

244. Garcês, S., Demengeot, J. & Benito-Garcia, E. The immunogenicity of anti-TNF therapy in immune-mediated inflammatory diseases: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *Ann. Rheum. Dis.* **72,** 1947–1955 (2013).

245. Marotte, H. & Miossec, P. Biomarkers for prediction of TNFalpha blockers response in rheumatoid arthritis. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* **77,** 297–305 (2010).

246. Kawashima, M. & Miossec, P. Effect of treatment of rheumatoid arthritis with infliximab on IFN gamma, IL4, T-bet, and GATA-3 expression: link with improvement of systemic inflammation and disease activity. *Ann. Rheum. Dis.* **64,** 415–418 (2005).

247. Isgren, A. *et al.* High survivin levels predict poor clinical response to infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* **41,** 652–657 (2012).

248. Tsuzaka, K., Itami, Y., Takeuchi, T., Shinozaki, N. & Morishita, T. ADAMTS5 is a biomarker for prediction of response to infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **37,** 1454–1460 (2010).

249. Mavragani, C. P., La, D. T., Stohl, W. & Crow, M. K. Association of the response to tumor necrosis factor antagonists with plasma type I interferon activity and interferon-beta/alpha ratios in rheumatoid arthritis patients: a post hoc analysis of a predominantly Hispanic cohort. *Arthritis Rheum.* **62,** 392–401 (2010).

250. Van Baarsen, L. G. *et al.* Regulation of IFN response gene activity during infliximab treatment in rheumatoid arthritis is associated with clinical response to treatment. *Arthritis Res. Ther.* **12,** R11 (2010).

251. Ortea, I. *et al.* Discovery of serum proteomic biomarkers for prediction of response to infliximab (a monoclonal anti-TNF antibody) treatment in rheumatoid arthritis: an exploratory analysis. *J. Proteomics* **77,** 372–382 (2012).

252. Kapoor, S. R. *et al.* Metabolic profiling predicts response to anti-tumor necrosis factor α therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **65,** 1448–1456 (2013).

253. Lequerré, T. *et al.* Gene profiling in white blood cells predicts infliximab responsiveness in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **8,** R105 (2006).

254. Oliveira, R. D. R. *et al.* Differential gene expression profiles may differentiate responder and nonresponder patients with rheumatoid arthritis for methotrexate (MTX)

monotherapy and MTX plus tumor necrosis factor inhibitor combined therapy. *J. Rheumatol.* **39,** 1524–1532 (2012).

255. Lindberg, J. *et al.* The gene expression profile in the synovium as a predictor of the clinical response to infliximab treatment in rheumatoid arthritis. *PloS One* **5,** e11310 (2010).

256. McGeough, C. M. *et al.* Killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen-C genotypes in rheumatoid arthritis primary responders and non-responders to anti-TNF-α therapy. *Rheumatol. Int.* **32,** 1647–1653 (2012).

257. Pavy, S. *et al.* Tumour necrosis factor alpha -308G->A polymorphism is not associated with response to TNFalpha blockers in Caucasian patients with rheumatoid arthritis: systematic review and meta-analysis. *Ann. Rheum. Dis.* **69,** 1022–1028 (2010).

258. Lee, Y. H., Ji, J. D., Bae, S.-C. & Song, G. G. Associations between tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) -308 and -238 G/A polymorphisms and shared epitope status and responsiveness to TNF-alpha blockers in rheumatoid arthritis: a metaanalysis update. *J. Rheumatol.* **37,** 740–746 (2010).

259. Morales-Lara, M. J. *et al.* Effects of polymorphisms in TRAILR1 and TNFR1A on the response to anti-TNF therapies in patients with rheumatoid and psoriatic arthritis. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* **79,** 591–596 (2012).

260. Cañete, J. D. *et al.* Influence of variants of Fc gamma 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. *Ann. Rheum. Dis.* **68,** 1547–1552 (2009).

261. Morales-Lara, M. J. *et al.* Association between the FCGR3A V158F polymorphism and the clinical response to infliximab in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis patients. *Scand. J. Rheumatol.* **39,** 518–520 (2010).

262. Jančić, I. *et al.* -174G/C interleukin-6 gene promoter polymorphism predicts therapeutic response to etanercept in rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* **33,** 1481–1486 (2013).

263. Krintel, S. B. *et al.* CD6 and syntaxin binding protein 6 variants and response to tumor necrosis factor alpha inhibitors in Danish patients with rheumatoid arthritis. *PloS One* **7,** e38539 (2012).

264. Robinson, J. I. *et al.* with Coulthard, L. R., Taylor, J. C. & Eyre, S., Biologics in Rheumatoid Arthritis Genetics and Genomics. Genetic variants within the MAP kinase signalling network and anti-TNF treatment response in rheumatoid arthritis patients. *Ann. Rheum. Dis.* **70,** 98–103 (2011).

265. Barton, A. with Tan, R. J. L. *et al.*, BRAGGSS. Investigation of rheumatoid arthritis susceptibility genes identifies association of AFF3 and CD226 variants with response to anti-tumour necrosis factor treatment. *Ann. Rheum. Dis.* **69,** 1029–1035 (2010).

266. Isaacs, J. D. with Potter, C. *et al.*, Biologics in Rheumatoid Arthritis Genetics and Genomics Study Syndicate (BRAGGSS). Association between anti-tumour necrosis factor treatment response and genetic variants within the TLR and NF{kappa}B signalling pathways. *Ann. Rheum. Dis.* **69,** 1315–1320 (2010).

267. Suarez-Gestal, M., Perez-Pampin, E., Calaza, M., Gomez-Reino, J. J. & Gonzalez, A. Lack of replication of genetic predictors for the rheumatoid arthritis response to anti-TNF treatments: a prospective case-only study. *Arthritis Res. Ther.* **12,** R72 (2010).

268. Zervou, M. I. *et al.* Lack of association of variants previously associated with anti-TNF medication response in rheumatoid arthritis patients: results from a homogeneous Greek population. *PloS One* **8,** e74375 (2013).

269. Cui, J. *et al.* Rheumatoid arthritis risk allele PTPRC is also associated with response to anti-tumor necrosis factor alpha therapy. *Arthritis Rheum.* **62,** 1849–1861 (2010).

270. Cui, J. *et al.* Genome-wide association study and gene expression analysis identifies CD84 as a predictor of response to etanercept therapy in rheumatoid arthritis. *PLoS Genet.* **9,** e1003394 (2013).

271. Mesko, B. *et al.* Peripheral blood derived gene panels predict response to infliximab in rheumatoid arthritis and Crohn's disease. *Genome Med.* **5,** 59 (2013).

272. Krintel, S. B. *et al.* Investigation of single nucleotide polymorphisms and biological pathways associated with response to TNFα inhibitors in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenet. Genomics* **22,** 577–589 (2012).

273. Toonen, E. J. M. *et al.* Validation study of existing gene expression signatures for anti-TNF treatment in patients with rheumatoid arthritis. *PloS One* **7,** e33199 (2012).

274. Umićević Mirkov, M. *et al.* Genome-wide association analysis of anti-TNF drug response in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **72,** 1375–1381 (2013).

275. Item 118 : Maladie de Crohn et rectocolite hémorragique - cours.pdf. at <http://campus.cerimes.fr/hepato-gastro-enterologie/enseignement/item118/site/html/cours.pdf>

276. Strober, W., Fuss, I. & Mannon, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* **117,** 514–521 (2007).

277. Molodecky, N. A. & Kaplan, G. G. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Hepatol.* **6,** 339–346 (2010).

278. Sartor, R. B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **134,** 577–594 (2008).

279. Abreu, M. T. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol.* **10,** 131–144 (2010).

280. Peterson, L. W. & Artis, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **14,** 141–153 (2014).

281. Turner, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9,** 799–809 (2009).

282. Kalla, R., Ventham, N. T., Satsangi, J. & Arnott, I. D. R. Crohn's disease. *BMJ* **349,** g6670 (2014).

283. Buhner, S. *et al.* Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* **55,** 342–347 (2006).

284. Hering, N. A., Fromm, M. & Schulzke, J.-D. Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. *J. Physiol.* **590,** 1035–1044 (2012).

285. Rosenthal, R. *et al.* Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J. Cell Sci.* **123,** 1913–1921 (2010).

286. Kiesslich, R. *et al.* Local barrier dysfunction identified by confocal laser endomicroscopy predicts relapse in inflammatory bowel disease. *Gut* **61,** 1146–1153 (2012).

287. Merga, Y., Campbell, B. J. & Rhodes, J. M. Mucosal barrier, bacteria and inflammatory bowel disease: possibilities for therapy. *Dig. Dis. Basel Switz.* **32,** 475–483 (2014).

288. Boltin, D., Perets, T. T., Vilkin, A. & Niv, Y. Mucin function in inflammatory bowel disease: an update. *J. Clin. Gastroenterol.* **47,** 106–111 (2013).

289. Leiper, K. *et al.* Interaction between bacterial peptides, neutrophils and goblet cells: a possible mechanism for neutrophil recruitment and goblet cell depletion in colitis. *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979* **101,** 395–402 (2001).

290. Johansson, M. E. V. *et al.* Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut* **63,** 281–291 (2014).

291. Moehle, C. *et al.* Aberrant intestinal expression and allelic variants of mucin genes associated with inflammatory bowel disease. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **84,** 1055–1066 (2006).

292. Philpott, D. J., Sorbara, M. T., Robertson, S. J., Croitoru, K. & Girardin, S. E. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **14,** 9–23 (2014).

293. Wehkamp, J. *et al.* Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102,** 18129–18134 (2005).

294. Girardin, S. E. *et al.* Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* **278,** 8869–8872 (2003).

295. Koslowski, M. J., Beisner, J., Stange, E. F. & Wehkamp, J. Innate antimicrobial host defense in small intestinal Crohn's disease. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **300,** 34–40 (2010).

296. Wehkamp, J. *et al.* The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179,** 3109–3118 (2007).

297. Koslowski, M. J. *et al.* Genetic variants of Wnt transcription factor TCF-4 (TCF7L2) putative promoter region are associated with small intestinal Crohn's disease. *PloS One* **4,** e4496 (2009).

298. Cadwell, K. *et al.* A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* **456,** 259–263 (2008).

299. Eckburg, P. B. *et al.* Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308,** 1635–1638 (2005).

300. Cho, I. & Blaser, M. J. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat. Rev. Genet.* **13,** 260–270 (2012).

301. Scanlan, P. D., Shanahan, F., O'Mahony, C. & Marchesi, J. R. Culture-independent analyses of temporal variation of the dominant fecal microbiota and targeted bacterial subgroups in Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* **44,** 3980–3988 (2006).

302. Ananthakrishnan, A. N. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **12,** 205–217 (2015).

303. Manichanh, C. *et al.* Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* **55,** 205–211 (2006).

304. Sokol, H. *et al.* Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105,** 16731–16736 (2008).

305. Eckburg, P. B. & Relman, D. A. The role of microbes in Crohn's disease. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **44,** 256–262 (2007).

306. Geremia, A., Biancheri, P., Allan, P., Corazza, G. R. & Di Sabatino, A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun. Rev.* **13,** 3–10 (2014).

307. Frosali, S. *et al.* How the Intricate Interaction among Toll-Like Receptors, Microbiota, and Intestinal Immunity Can Influence Gastrointestinal Pathology. *J. Immunol. Res.* **2015,** 489821 (2015).

308. Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P. J. & Strober, W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat. Immunol.* **5,** 800–808 (2004).

309. Noguchi, E., Homma, Y., Kang, X., Netea, M. G. & Ma, X. A Crohn's disease-associated NOD2 mutation suppresses transcription of human IL10 by inhibiting activity of the nuclear ribonucleoprotein hnRNP-A1. *Nat. Immunol.* **10,** 471–479 (2009).

310. Cua, D. J. & Tato, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **10,** 479–489 (2010).

311. Geremia, A. *et al.* IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J. Exp. Med.* **208,** 1127–1133 (2011).

312. Bernink, J. H. *et al.* Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat. Immunol.* **14,** 221–229 (2013).

313. Monteleone, G. *et al.* Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* **112,** 1169–1178 (1997).

314. Zhou, L. *et al.* IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat. Immunol.* **8,** 967–974 (2007).

315. Annunziato, F. *et al.* Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* **204,** 1849–1861 (2007).

316. Rovedatti, L. *et al.* Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease. *Gut* **58,** 1629–1636 (2009).

317. O'Garra, A. & Vieira, P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat. Med.* **10,** 801–805 (2004).

318. Chamouard, P. *et al.* Diminution of Circulating CD4+CD25 high T cells in naïve Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* **54,** 2084–2093 (2009).

319. Maul, J. *et al.* Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **128,** 1868–1878 (2005).

320. Israeli, E. *et al.* Anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic antibodies as predictors of inflammatory bowel disease. *Gut* **54,** 1232–1236 (2005).

321. Walker, L. J. *et al.* Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA) in Crohn's disease are associated with disease severity but not NOD2/CARD15 mutations. *Clin. Exp. Immunol.* **135,** 490–496 (2004).

322. Dotan, I. *et al.* Antibodies against laminaribioside and chitobioside are novel serologic markers in Crohn's disease. *Gastroenterology* **131,** 366–378 (2006).

323. Zholudev, A., Zurakowski, D., Young, W., Leichtner, A. & Bousvaros, A. Serologic testing with ANCA, ASCA, and anti-OmpC in children and young adults with Crohn's disease and ulcerative colitis: diagnostic value and correlation with disease phenotype. *Am. J. Gastroenterol.* **99,** 2235–2241 (2004).

324. Riis, L. *et al.*, European Collaborative Study Group on Inflammatory Bowel Disease. The prevalence of genetic and serologic markers in an unselected European population-based cohort of IBD patients. *Inflamm. Bowel Dis.* **13,** 24–32 (2007).

325. Dotan, I. *et al.* Antibodies against laminaribioside and chitobioside are novel serologic markers in Crohn's disease. *Gastroenterology* **131,** 366–378 (2006).

326. Annese, V. *et al.* Familial expression of anti-Saccharomyces cerevisiae Mannan antibodies in Crohn's disease and ulcerative colitis: a GISC study. *Am. J. Gastroenterol.* **96,** 2407–2412 (2001).

327. Lakatos, P. L. with Papp, M. *et al.*, Hungarian IBD Study Group. New serological markers for inflammatory bowel disease are associated with earlier age at onset, complicated disease behavior, risk for surgery, and NOD2/CARD15 genotype in a Hungarian IBD cohort. *Am. J. Gastroenterol.* **103,** 665–681 (2008).

328. Cohavy, O. *et al.* Colonic bacteria express an ulcerative colitis pANCA-related protein epitope. *Infect. Immun.* **68,** 1542–1548 (2000).

329. Landers, C. J. *et al.* Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens. *Gastroenterology* **123,** 689–699 (2002).

330. Zholudev, A., Zurakowski, D., Young, W., Leichtner, A. & Bousvaros, A. Serologic testing with ANCA, ASCA, and anti-OmpC in children and young adults with Crohn's

disease and ulcerative colitis: diagnostic value and correlation with disease phenotype. *Am. J. Gastroenterol.* **99,** 2235–2241 (2004).

331. Mow, W. S. *et al.* Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* **126,** 414–424 (2004).

332. Ferrante, M. *et al.* New serological markers in inflammatory bowel disease are associated with complicated disease behaviour. *Gut* **56,** 1394–1403 (2007).

333. Sutton, C. L. *et al.* Identification of a novel bacterial sequence associated with Crohn's disease. *Gastroenterology* **119,** 23–31 (2000).

334. Spivak, J. *et al.* Antibodies to I2 predict clinical response to fecal diversion in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **12,** 1122–1130 (2006).

335. Lodes, M. J. *et al.* Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J. Clin. Invest.* **113,** 1296–1306 (2004).

336. Targan, S. R. *et al.* Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease. *Gastroenterology* **128,** 2020–2028 (2005).

337. Marth, J. D. & Grewal, P. K. Mammalian glycosylation in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **8,** 874–887 (2008).

338. Seow, C. H. *et al.* Novel anti-glycan antibodies related to inflammatory bowel disease diagnosis and phenotype. *Am. J. Gastroenterol.* **104,** 1426–1434 (2009).

339. Rieder, F. *et al.* Association of the novel serologic anti-glycan antibodies anti-laminarin and anti-chitin with complicated Crohn's disease behavior. *Inflamm. Bowel Dis.* **16,** 263–274 (2010).

340. Rieder, F. *et al.* Serum anti-glycan antibodies predict complicated Crohn's disease behavior: a cohort study. *Inflamm. Bowel Dis.* **16,** 1367–1375 (2010).

341. Item 121 : Polyarthrite rhumatoïde - cours.pdf. at <http://campus.cerimes.fr/rhumatologie/enseignement/rhumato16/site/html/cours.pdf>

342. Smolen, J. S. & Steiner, G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2,** 473–488 (2003).

343. S., O., Staunton, L., FitzGerald, O. & R., S. in *Genes and Autoimmunity - Intracellular Signaling and Microbiome Contribution* (ed. Stanilova, S.) (InTech, 2013). at <http://www.intechopen.com/books/genes-and-autoimmunity-intracellular-signaling-and-microbiome-contribution/biomarkers-of-inflammatory-arthritis-and-proteomics>

344. Parodontopathies_recos.doc - Parodontopathies_recos.pdf. at <http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/Parodontopathies_recos.pdf>

345. Berthelot, J.-M. & Le Goff, B. Rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* **77,** 537–541 (2010).

346. la maladie parodontale. at <http://www.lookfordiagnosis.com>

347. Bourgeois, D. & Baehni, P. Surveillance, épidémiologie et maladies parodontales. *Datatraitesod123-29361* at <http://www.em-consulte.com/en/article/20575>

348. Zijnge, V. *et al.* Oral biofilm architecture on natural teeth. *PloS One* **5,** e9321 (2010).

349. Nishihara, T. & Koseki, T. Microbial etiology of periodontitis. *Periodontol. 2000* **36,** 14–26 (2004).

350. 6. SIMAIN Biofilm (5).pdf. at <http://orbi.ulg.ac.be/bitstream/2268/75782/1/6.%20SIMAIN%20Biofilm%20(5).pdf>

351. Hannig, M. & Joiner, A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr. Oral Sci.* **19,** 29–64 (2006).

352. Kolenbrander, P. E. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **54,** 413–437 (2000).

353. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* **25,** 134–144 (1998).

354. Ximénez-Fyvie, L. A., Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **27,** 648–657 (2000).

355. Association between periodontitis and the development of systemic diseases - 2053-5775-2-4.pdf. at <http://www.hoajonline.com/journals/pdf/2053-5775-2-4.pdf>

356. Janket, S.-J., Baird, A. E., Chuang, S.-K. & Jones, J. A. Meta-analysis of periodontal disease and risk of coronary heart disease and stroke. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **95,** 559–569 (2003).

357. Ishihara, K. *et al.* Correlation between detection rates of periodontopathic bacterial DNA in coronary stenotic artery plaque [corrected] and in dental plaque samples. *J. Clin. Microbiol.* **42,** 1313–1315 (2004).

358. Nakano, K. *et al.* Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens. *Oral Microbiol. Immunol.* **24,** 64–68 (2009).

359. Paraskevas, S., Huizinga, J. D. & Loos, B. G. A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **35,** 277–290 (2008).

360. Popławska-Kita, A. *et al.* Association between type 1 diabetes and periodontal health. *Adv. Med. Sci.* **59,** 126–131 (2014).

361. Taylor, G. W., Burt, B. A., Becker, M. P., Genco, R. J. & Shlossman, M. Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. *Ann. Periodontol. Am. Acad. Periodontol.* **3,** 30–39 (1998).

362. Wu, Y.-Y., Xiao, E. & Graves, D. T. Diabetes mellitus related bone metabolism and periodontal disease. *Int. J. Oral Sci.* **7,** 63–72 (2015).

363. Makiura, N. *et al.* Relationship of Porphyromonas gingivalis with glycemic level in patients with type 2 diabetes following periodontal treatment. *Oral Microbiol. Immunol.* **23,** 348–351 (2008).

364. Rhodus, N. L. & Johnson, D. K. The prevalence of oral manifestations of systemic lupus erythematosus. *Quintessence Int. Berl. Ger. 1985* **21,** 461–465 (1990).

365. Novo, E., García-Mac Gregor, E., Nava, S. & Perini, L. A possible defective estimation of antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus due to the coexistence of periodontitis: preliminary observations. *P. R. Health Sci. J.* **16,** 369–373 (1997).

366. Kobayashi, T. *et al.* Risk of periodontitis in systemic lupus erythematosus is associated with Fcgamma receptor polymorphisms. *J. Periodontol.* **74,** 378–384 (2003).

367. Meyer, U. *et al.* [Oral manifestations in patients with systemic lupus erythematosus]. *Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie MKG* **1,** 90–94 (1997).

368. Fabbri, C. *et al.* Periodontitis treatment improves systemic lupus erythematosus response to immunosuppressive therapy. *Clin. Rheumatol.* **33,** 505–509 (2014).

369. Ratz, T. *et al.* A possible link between ankylosing spondylitis and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **54,** 500–510 (2015).

370. Ogrendik, M. Periodontal pathogens are likely to be responsible for the development of ankylosing spondylitis. *Curr. Rheumatol. Rev.* (2015).

371. Vavricka, S. R. *et al.* Periodontitis and gingivitis in inflammatory bowel disease: a case-control study. *Inflamm. Bowel Dis.* **19,** 2768–2777 (2013).

372. Stein, J. M. *et al.* Clinical periodontal and microbiologic parameters in patients with Crohn's disease with consideration of the CARD15 genotype. *J. Periodontol.* **81,** 535–545 (2010).

373. Habashneh, R. A., Khader, Y. S., Alhumouz, M. K., Jadallah, K. & Ajlouni, Y. The association between inflammatory bowel disease and periodontitis among Jordanians: a case-control study. *J. Periodontal Res.* **47,** 293–298 (2012).

374. Schulz, S. *et al.* Tumor necrosis factor-α and oral inflammation in patients with Crohn disease. *J. Periodontol.* **85,** 1424–1431 (2014).

375. Wu, Z. & Nakanishi, H. Connection between periodontitis and Alzheimer's disease: possible roles of microglia and leptomeningeal cells. *J. Pharmacol. Sci.* **126,** 8–13 (2014).

376. Noble, J. M. *et al.* Periodontitis is associated with cognitive impairment among older adults: analysis of NHANES-III. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **80,** 1206–1211 (2009).

377. Kamer, A. R. *et al.* TNF-alpha and antibodies to periodontal bacteria discriminate between Alzheimer's disease patients and normal subjects. *J. Neuroimmunol.* **216,** 92–97 (2009).

378. Sparks Stein, P. *et al.* Serum antibodies to periodontal pathogens are a risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* **8,** 196–203 (2012).

379. Poole, S., Singhrao, S. K., Kesavalu, L., Curtis, M. A. & Crean, S. Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *J. Alzheimers Dis. JAD* **36,** 665–677 (2013).

380. Meyer, M. S., Joshipura, K., Giovannucci, E. & Michaud, D. S. A review of the relationship between tooth loss, periodontal disease, and cancer. *Cancer Causes Control CCC* **19,** 895–907 (2008).

381. Michaud, D. S., Joshipura, K., Giovannucci, E. & Fuchs, C. S. A prospective study of periodontal disease and pancreatic cancer in US male health professionals. *J. Natl. Cancer Inst.* **99,** 171–175 (2007).

382. Abnet, C. C. *et al.* Prospective study of tooth loss and incident esophageal and gastric cancers in China. *Cancer Causes Control CCC* **12,** 847–854 (2001).

383. Pendyala, G., Joshi, S., Chaudhari, S. & Gandhage, D. Links demystified: Periodontitis and cancer. *Dent. Res. J.* **10,** 704–712 (2013).

384. Offenbacher, S. *et al.* Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J. Periodontol.* **67,** 1103–1113 (1996).

385. Hasegawa, K. *et al.* Associations between systemic status, periodontal status, serum cytokine levels, and delivery outcomes in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor. *J. Periodontol.* **74,** 1764–1770 (2003).

386. Bingham, C. O. & Moni, M. Periodontal disease and rheumatoid arthritis: the evidence accumulates for complex pathobiologic interactions. *Curr. Opin. Rheumatol.* **25,** 345–353 (2013).

387. Potikuri, D. *et al.* Periodontal disease is significantly higher in non-smoking treatment-naive rheumatoid arthritis patients: results from a case-control study. *Ann. Rheum. Dis.* **71,** 1541–1544 (2012).

388. Chen, H.-H. *et al.* Association between a history of periodontitis and the risk of rheumatoid arthritis: a nationwide, population-based, case-control study. *Ann. Rheum. Dis.* **72,** 1206–1211 (2013).

389. Mikuls, T. R. *et al.* Periodontitis and Porphyromonas gingivalis in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **66,** 1090–1100 (2014).

390. Arunachalam, L. T. Autoimmune correlation of rheumatoid arthritis and periodontitis. *J. Indian Soc. Periodontol.* **18,** 666–669 (2014).

391. Perricone, C., Ceccarelli, F. & Valesini, G. An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: a never-ending story. *Autoimmun. Rev.* **10,** 599–608 (2011).

392. Kobayashi, T. *et al.* The interleukin-1 and Fcgamma receptor gene polymorphisms in Japanese patients with rheumatoid arthritis and periodontitis. *J. Periodontol.* **78,** 2311–2318 (2007).

393. Kobayashi, T. *et al.* Cytokine gene polymorphisms associated with rheumatoid arthritis and periodontitis in Japanese adults. *J. Periodontol.* **80,** 792–799 (2009).

394. Kobayashi, T. & Yoshie, H. Host Responses in the Link Between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis. *Curr. Oral Health Rep.* **2,** 1–8 (2015).

395. Mori, Y. *et al.* Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.* **18,** 54–58 (2003).

396. Iwahashi, M. *et al.* Expression of Toll-like receptor 2 on CD16+ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **50,** 1457–1467 (2004).

397. Torrisani, J. & Lopez, F. Méthylation de l'ADN et régulation épigénétique des cancers. *Hépato-Gastro Oncol. Dig.* **10,** 455–467 (2003).

398. Ishida, K. *et al.* Interleukin-6 gene promoter methylation in rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. *J. Periodontol.* **83,** 917–925 (2012).

399. Bakakos, P. *et al.* Simultaneous analysis of T cell clonality and cytokine production in rheumatoid arthritis using three-colour flow cytometry. *Clin. Exp. Immunol.* **129,** 370–378 (2002).

400. Leung, K. P. & Torres, B. A. Prevotella intermedia stimulates expansion of Vbeta-specific CD4(+) T cells. *Infect. Immun.* **68,** 5420–5424 (2000).

401. Cardoso, C. R. *et al.* Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol. Immunol.* **24,** 1–6 (2009).

402. Arunachalam, L. T. Autoimmune correlation of rheumatoid arthritis and periodontitis. *J. Indian Soc. Periodontol.* **18,** 666–669 (2014).

403. Carriere, V. *et al.* IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104,** 282–287 (2007).

404. Malcolm, J. *et al.* IL-33 Exacerbates Periodontal Disease through Induction of RANKL. *J. Dent. Res.* **94,** 968–975 (2015).

405. Kaur, S., Bright, R., Proudman, S. M. & Bartold, P. M. Does periodontal treatment influence clinical and biochemical measures for rheumatoid arthritis? A systematic review and meta-analysis. *Semin. Arthritis Rheum.* **44,** 113–122 (2014).

406. Savioli, C. *et al.* Persistent periodontal disease hampers anti-tumor necrosis factor treatment response in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Rheumatol. Pract. Rep. Rheum. Musculoskelet. Dis.* **18,** 180–184 (2012).

407. O'Dell, J. R. *et al.* Treatment of early seropositive rheumatoid arthritis: doxycycline plus methotrexate versus methotrexate alone. *Arthritis Rheum.* **54,** 621–627 (2006).

408. Ogrendik, M. & Karagoz, N. Treatment of rheumatoid arthritis with roxithromycin: a randomized trial. *Postgrad. Med.* **123,** 220–227 (2011).

409. Ogrendik, M. Effects of clarithromycin in patients with active rheumatoid arthritis. *Curr. Med. Res. Opin.* **23,** 515–522 (2007).

410. Reichert, S. *et al.* Detection of oral bacterial DNA in synovial fluid. *J. Clin. Periodontol.* **40,** 591–598 (2013).

411. Martinez-Martinez, R. E. *et al.* Detection of periodontal bacterial DNA in serum and synovial fluid in refractory rheumatoid arthritis patients. *J. Clin. Periodontol.* **36,** 1004–1010 (2009).

412. Ogrendik, M., Kokino, S., Ozdemir, F., Bird, P. S. & Hamlet, S. Serum antibodies to oral anaerobic bacteria in patients with rheumatoid arthritis. *MedGenMed Medscape Gen. Med.* **7,** 2 (2005).

413. Holt, S. C. & Ebersole, J. L. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the ‘red complex’, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol. 2000* **38,** 72–122 (2005).

414. Bostanci, N. & Belibasakis, G. N. Porphyromonas gingivalis: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol. Lett.* **333,** 1–9 (2012).

415. Clais, S. *et al.* Comparison of viable plate count, turbidity measurement and real-time PCR for quantification of Porphyromonas gingivalis. *Lett. Appl. Microbiol.* **60,** 79–84 (2015).

416. SCDPHA_TD_2007_CRITON_MARIE.pdf. at <http://docnum.univ-lorraine.fr/public/SCDPHA_TD_2007_CRITON_MARIE.pdf>

417. Chapter 2 Gram-Negative Bacteria: The cell Membranes. at <http://www.springer.com/cda/content/document/cda_downloaddocument/9783642305252-c2.pdf?SGWID=0-0-45-1340530-p174508197>

418. Yoshino, T., Laine, M. L., van Winkelhoff, A. J. & Dahlén, G. Genotype variation and capsular serotypes of Porphyromonas gingivalis from chronic periodontitis and periodontal abscesses. *FEMS Microbiol. Lett.* **270,** 75–81 (2007).

419. Laine, M. L., Appelmelk, B. J. & van Winkelhoff, A. J. Prevalence and distribution of six capsular serotypes of Porphyromonas gingivalis in periodontitis patients. *J. Dent. Res.* **76,** 1840–1844 (1997).

420. Nishida, E. *et al.* Bone resorption and local interleukin-1alpha and interleukin-1beta synthesis induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide. *J. Periodontal Res.* **36,** 1–8 (2001).

421. Bostanci, N. *et al.* Interleukin-1alpha stimulation in monocytes by periodontal bacteria: antagonistic effects of Porphyromonas gingivalis. *Oral Microbiol. Immunol.* **22,** 52–60 (2007).

422. Kato, H., Taguchi, Y., Tominaga, K., Umeda, M. & Tanaka, A. Porphyromonas gingivalis LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells. *Arch. Oral Biol.* **59,** 167–175 (2014).

423. Paramonov, N. A., Aduse-Opoku, J., Hashim, A., Rangarajan, M. & Curtis, M. A. Structural analysis of the core region of O-lipopolysaccharide of Porphyromonas gingivalis from mutants defective in O-antigen ligase and O-antigen polymerase. *J. Bacteriol.* **191,** 5272–5282 (2009).

424. Bostanci, N. & Belibasakis, G. N. Porphyromonas gingivalis: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol. Lett.* **333,** 1–9 (2012).

425. Paramonov, N. *et al.* Structural analysis of a novel anionic polysaccharide from Porphyromonas gingivalis strain W50 related to Arg-gingipain glycans. *Mol. Microbiol.* **58,** 847–863 (2005).

426. Dierickx, K. *et al.* Viability of cultured periodontal pocket epithelium cells and Porphyromonas gingivalis association. *J. Clin. Periodontol.* **29,** 987–996 (2002).

427. D' Empaire, G., Baer, M. T. & Gibson, F. C. The K1 serotype capsular polysaccharide of Porphyromonas gingivalis elicits chemokine production from murine macrophages that facilitates cell migration. *Infect. Immun.* **74,** 6236–6243 (2006).

428. Vernal, R. *et al.* Differential cytokine expression by human dendritic cells in response to different Porphyromonas gingivalis capsular serotypes. *J. Clin. Periodontol.* **36,** 823–829 (2009).

429. Enersen, M., Nakano, K. & Amano, A. Porphyromonas gingivalis fimbriae. *J. Oral Microbiol.* **5,** (2013).

430. Amano, A., Nakagawa, I., Okahashi, N. & Hamada, N. Variations of Porphyromonas gingivalis fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J. Periodontal Res.* **39,** 136–142 (2004).

431. Ogawa, T., Uchida, H. & Hamada, S. Porphyromonas gingivalis fimbriae and their synthetic peptides induce proinflammatory cytokines in human peripheral blood monocyte cultures. *FEMS Microbiol. Lett.* **116,** 237–242 (1994).

432. Jotwani, R., Eswaran, S. V. K., Moonga, S. & Cutler, C. W. MMP-9/TIMP-1 imbalance induced in human dendritic cells by Porphyromonas gingivalis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **58,** 314–321 (2010).

433. Umemoto, T. & Hamada, N. Characterization of biologically active cell surface components of a periodontal pathogen. The roles of major and minor fimbriae of Porphyromonas gingivalis. *J. Periodontol.* **74,** 119–122 (2003).

434. Sharma, A., Honma, K., Evans, R. T., Hruby, D. E. & Genco, R. J. Oral immunization with recombinant Streptococcus gordonii expressing porphyromonas gingivalis FimA domains. *Infect. Immun.* **69,** 2928–2934 (2001).

435. Wang, M. *et al.* Fimbrial proteins of porphyromonas gingivalis mediate in vivo virulence and exploit TLR2 and complement receptor 3 to persist in macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179,** 2349–2358 (2007).

436. Yasuhara, R. & Miyamoto, Y. Roles of Gingipains in Periodontal Bone Loss. *J. Oral Biosci.* **53,** 197–205 (2011).

437. Pathirana, R. D., O'Brien-Simpson, N. M., Brammar, G. C., Slakeski, N. & Reynolds, E. C. Kgp and RgpB, but not RgpA, are important for Porphyromonas gingivalis virulence in the murine periodontitis model. *Infect. Immun.* **75,** 1436–1442 (2007).

438. Rajapakse, P. S., O'Brien-Simpson, N. M., Slakeski, N., Hoffmann, B. & Reynolds, E. C. Immunization with the RgpA-Kgp proteinase-adhesin complexes of Porphyromonas

gingivalis protects against periodontal bone loss in the rat periodontitis model. *Infect. Immun.* **70,** 2480–2486 (2002).

439. Kitamura, Y., Matono, S., Aida, Y., Hirofuji, T. & Maeda, K. Gingipains in the culture supernatant of Porphyromonas gingivalis cleave CD4 and CD8 on human T cells. *J. Periodontal Res.* **37,** 464–468 (2002).

440. Belibasakis, G. N., Bostanci, N. & Reddi, D. Regulation of protease-activated receptor-2 expression in gingival fibroblasts and Jurkat T cells by Porphyromonas gingivalis. *Cell Biol. Int.* **34,** 287–292 (2010).

441. Fagundes, J. A. G. *et al.* Porphyromonas gingivalis is associated with protease-activated receptor-2 upregulation in chronic periodontitis. *J. Periodontol.* **82,** 1596–1601 (2011).

442. Kuula, H. *et al.* Human beta-defensin-1 and -2 and matrix metalloproteinase-25 and -26 expression in chronic and aggressive periodontitis and in peri-implantitis. *Arch. Oral Biol.* **53,** 175–186 (2008).

443. Casiano-Colón, A. & Marquis, R. E. Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* **54,** 1318–1324 (1988).

444. Wegner, N. *et al.* Peptidylarginine deiminase from Porphyromonas gingivalis citrullinates human fibrinogen and α-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **62,** 2662–2672 (2010).

445. Montgomery, A. B. *et al.* Crystal structure of Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* (2015). doi:10.1136/annrheumdis-2015-207656

446. Konig, M. F., Paracha, A. S., Moni, M., Bingham, C. O. & Andrade, F. Defining the role of Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase (PPAD) in rheumatoid

arthritis through the study of PPAD biology. *Ann. Rheum. Dis.* (2014). doi:10.1136/annrheumdis-2014-205385

447. Citrullinated Peptide Synthesis. at <http://www.biosyn.com/tew/Citrullinated-Peptide-Synthesis.aspx>

448. Valesini, G. *et al.* Citrullination and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* **14,** 490–497 (2015).

449. Baka, Z. *et al.* Citrullination under physiological and pathological conditions. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* **79,** 431–436 (2012).

450. György, B., Tóth, E., Tarcsa, E., Falus, A. & Buzás, E. I. Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38,** 1662–1677 (2006).

451. Foulquier, C. *et al.* 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 Rheum.* **56,** 3541–3553 (2007).

452. Proost, P. *et al.* Citrullination of CXCL8 by peptidylarginine deiminase alters receptor usage, prevents proteolysis, and dampens tissue inflammation. *J. Exp. Med.* **205,** 2085–2097 (2008).

453. Liu, G.-Y. *et al.* Overexpression of peptidylarginine deiminase IV features in apoptosis of haematopoietic cells. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **11,** 183–196 (2006).

454. Utz, P. J., Gensler, T. J. & Anderson, P. Death, autoantigen modifications, and tolerance. *Arthritis Res.* **2,** 101–114 (2000).

455. Li, P. *et al.* PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* **207,** 1853–1862 (2010).

456. Baka, Z., Buzás, E. & Nagy, G. Rheumatoid arthritis and smoking: putting the pieces together. *Arthritis Res. Ther.* **11,** 238 (2009).

457. Lee, D. M. *et al.* Quantifying anti-cyclic citrullinated peptide titres: clinical utility and association with tobacco exposure in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **68,** 201–208 (2009).

458. Damgaard, D. *et al.* Smoking is associated with increased levels of extracellular peptidylarginine deiminase 2 (PAD2) in the lungs. *Clin. Exp. Rheumatol.* **33,** 405–408 (2015).

459. Makrygiannakis, D. *et al.* Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann. Rheum. Dis.* **67,** 1488–1492 (2008).

460. Lugli, E. B. *et al.* Expression of citrulline and homocitrulline residues in the lungs of non-smokers and smokers: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **17,** 9 (2015).

461. Hitchon, C. A. *et al.* Antibodies to porphyromonas gingivalis are associated with anticitrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis and their relatives. *J. Rheumatol.* **37,** 1105–1112 (2010).

462. Goulas, T. *et al.* Structure and mechanism of a bacterial host-protein citrullinating virulence factor, Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase. *Sci. Rep.* **5,** 11969 (2015).

463. Shimada, A. *et al.* Expression of anti-Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase immunoglobulin G and peptidylarginine deiminase-4 in patients with rheumatoid arthritis and periodontitis. *J. Periodontal Res.* (2015). doi:10.1111/jre.12288

464. Hajishengallis, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **15,** 30–44 (2015).

465. Szarka, E. *et al.* Recognition of new citrulline-containing peptide epitopes by autoantibodies produced in vivo and in vitro by B cells of rheumatoid arthritis patients. *Immunology* **141,** 181–191 (2014).

466. Wagner, C. A. *et al.* Identification of anticitrullinated protein antibody reactivities in a subset of anti-CCP-negative rheumatoid arthritis: association with cigarette smoking and HLA-DRB1 'shared epitope' alleles. *Ann. Rheum. Dis.* **74,** 579–586 (2015).

467. Performance_Charcteristics_EliA_CCP.pdf. at <http://www.phadia.com/Global/A%20Document%20Library/Autoimmunity/Promotion%20Material/Product%20-%20Peformance%20-%20Detailer%20Info/Performance_Charcteristics_EliA_CCP.pdf>

468. Aletaha, D. *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* **62,** 2569–2581 (2010).

469. Renner, N. *et al.* Anti–citrullinated protein antibody positivity correlates with cartilage damage and proteoglycan levels in patients with rheumatoid arthritis in the hand joints. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **66,** 3283–3288 (2014).

470. Humphreys, J. H. *et al.* Rheumatoid factor and anti-citrullinated protein antibody positivity, but not level, are associated with increased mortality in patients with rheumatoid arthritis: results from two large independent cohorts. *Arthritis Res. Ther.* **16,** 483 (2014).

471. Fox, D. A. Citrullination: A Specific Target for the Autoimmune Response in Rheumatoid Arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **195,** 5–7 (2015).

472. Arkema, E. V. *et al.* Anti-citrullinated peptide autoantibodies, human leukocyte antigen shared epitope and risk of future rheumatoid arthritis: a nested case-control study. *Arthritis Res. Ther.* **15,** R159 (2013).

473. Rombouts, Y. *et al.* Anti-citrullinated protein antibodies acquire a pro-inflammatory Fc glycosylation phenotype prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **74,** 234–241 (2015).

474. James, E. A. *et al.* HLA-DR1001 presents 'altered-self' peptides derived from joint-associated proteins by accepting citrulline in three of its binding pockets. *Arthritis Rheum.* **62,** 2909–2918 (2010).

475. Cambridge, G. *et al.* The effect of B-cell depletion therapy on serological evidence of B-cell and plasmablast activation in patients with rheumatoid arthritis over multiple cycles of rituximab treatment. *J. Autoimmun.* **50,** 67–76 (2014).

476. Zhao, X. *et al.* Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **10,** R94 (2008).

477. El Bannoudi, H., Ioan-Facsinay, A. & Toes, R. E. M. Bridging autoantibodies and arthritis: the role of Fc receptors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **382,** 303–319 (2014).

478. Harre, U. *et al.* Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J. Clin. Invest.* **122,** 1791–1802 (2012).

479. Kleyer, A. *et al.* Bone loss before the clinical onset of rheumatoid arthritis in subjects with anticitrullinated protein antibodies. *Ann. Rheum. Dis.* **73,** 854–860 (2014).

480. Schett, G. & Gravallese, E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat. Rev. Rheumatol.* **8,** 656–664 (2012).

481. Khandpur, R. *et al.* NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* **5,** 178ra40 (2013).

482. Lundberg, K. *et al.* Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis Rheum.* **58,** 3009–3019 (2008).

483. Thomas, S. S. *et al.* Comparative Immunogenicity of TNF Inhibitors: Impact on Clinical Efficacy and Tolerability in the Management of Autoimmune Diseases. A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* (2015). doi:10.1007/s40259-015-0134-5

484. Janeway, C. A. *Immunobiologie: le système immunitaire fondamental et pathologique*. (De Boeck Supérieur, 2003).

485. Hanauer, S. B. *et al.* Clinical scenarios in IBD: optimizing the use of conventional and biologic agents. *Inflamm. Bowel Dis.* **16 Suppl 1,** S1–11 (2010).

486. Bendtzen, K. Personalized medicine: theranostics (therapeutics diagnostics) essential for rational use of tumor necrosis factor-alpha antagonists. *Discov. Med.* **15,** 201–211 (2013).

487. Wang, S.-L. *et al.* Development and validation of a homogeneous mobility shift assay for the measurement of infliximab and antibodies-to-infliximab levels in patient serum. *J. Immunol. Methods* **382,** 177–188 (2012).

488. HEK-Dual TNF-alpha cells TDS - HEK_Dual_TNFa_TDS.pdf. at <http://www.invivogen.com/PDF/HEK_Dual_TNFa_TDS.pdf>

489. Lallemand, C. *et al.* Reporter gene assay for the quantification of the activity and neutralizing antibody response to TNFα antagonists. *J. Immunol. Methods* **373,** 229–239 (2011).

490. Florholmen, J. Mucosal healing in the era of biologic agents in treatment of inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **50,** 43–52 (2015).

491. Cicatrisation muqueuse endoscopique - MICI_cicatrisationmuqueuse.pdf. at <http://www.sfed.org/sites/sfed.prod/files/documents_sfed/files/recommandations/MICI_cicatrisationmuqueuse.pdf>

492. D'Incà, R. & Caccaro, R. Measuring disease activity in Crohn's disease: what is currently available to the clinician. *Clin. Exp. Gastroenterol.* **7,** 151–161 (2014).

493. Theede, K. *et al.* Level of Fecal Calprotectin Correlates With Endoscopic and Histologic Inflammation and Identifies Patients with Mucosal Healing of Ulcerative Colitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* (2015). doi:10.1016/j.cgh.2015.05.038

494. Mao, R. *et al.* Fecal calprotectin in predicting relapse of inflammatory bowel diseases: a meta-analysis of prospective studies. *Inflamm. Bowel Dis.* **18,** 1894–1899 (2012).

495. Sipponen, T. *et al.* Faecal calprotectin and lactoferrin are reliable surrogate markers of endoscopic response during Crohn's disease treatment. *Scand. J. Gastroenterol.* **45,** 325–331 (2010).

496. Mooiweer, E. *et al.* Low fecal calprotectin predicts sustained clinical remission in inflammatory bowel disease patients: a plea for deep remission. *J. Crohns Colitis* **9,** 50–55 (2015).

497. Steenholdt, C. *et al.* Comparison of techniques for monitoring infliximab and antibodies against infliximab in Crohn's disease. *Ther. Drug Monit.* **35,** 530–538 (2013).

498. Steenholdt, C., Bendtzen, K., Brynskov, J., Thomsen, O. Ø. & Ainsworth, M. A. Clinical implications of measuring drug and anti-drug antibodies by different assays when optimizing infliximab treatment failure in Crohn's disease: post hoc analysis of a randomized controlled trial. *Am. J. Gastroenterol.* **109,** 1055–1064 (2014).

499. Yanai, H. *et al.* Levels of drug and antidrug antibodies are associated with outcome of interventions after loss of response to infliximab or adalimumab. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **13,** 522–530.e2 (2015).

500. Khanna, R. *et al.* Review article: a clinician's guide for therapeutic drug monitoring of infliximab in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **38,** 447–459 (2013).

501. ALD_22_GM_Polyarthrite_VD - gm_polyarthrite_web.pdf. at <http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/gm_polyarthrite_web.pdf>

502. Van Gestel, A. M. *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.* **39,** 34–40 (1996).

503. Mulleman, D. *et al.* Should anti-TNF-α drug levels and/or anti-drug antibodies be assayed in patients treated for rheumatoid arthritis? *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* **79,** 109–112 (2012).

504. Mulleman, D. *et al.*, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 6239 GICC. Infliximab concentration monitoring improves the control of disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **11,** R178 (2009).

505. Ducourau, E. *et al.* Antibodies toward infliximab are associated with low infliximab concentration at treatment initiation and poor infliximab maintenance in rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* **13,** R105 (2011).

506. Ungar, B. *et al.*, ABIRISK consortium. The temporal evolution of antidrug antibodies in patients with inflammatory bowel disease treated with infliximab. *Gut* **63,** 1258–1264 (2014).

507. Bartelds, G. M. *et al.* Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. *JAMA* **305,** 1460–1468 (2011).

508. Steenholdt, C. *et al.* Clinical implications of variations in anti-infliximab antibody levels in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **18,** 2209–2217 (2012).

509. Roblin, X. *et al.* Combination of C-reactive protein, infliximab trough levels, and stable but not transient antibodies to infliximab are associated with loss of response to infliximab in inflammatory bowel disease. *J. Crohns Colitis* **9,** 525–531 (2015).

510. Weise, M., Kurki, P., Wolff-Holz, E., Bielsky, M.-C. & Schneider, C. K. Biosimilars: the science of extrapolation. *Blood* **124,** 3191–3196 (2014).

511. Dörner, T. & Kay, J. Biosimilars in rheumatology: current perspectives and lessons learnt. *Nat. Rev. Rheumatol.* (2015). doi:10.1038/nrrheum.2015.110

512. Quand débuter un traitement anti-TNF ? *FMC-HGE* at <http://www.fmcgastro.org/textes-postus/postu-2014/quand-debuter-un-traitement-anti-tnf/>

513. Yurkovetskiy, L. A., Pickard, J. M. & Chervonsky, A. V. Microbiota and autoimmunity: exploring new avenues. *Cell Host Microbe* **17,** 548–552 (2015).

514. Rieder, F. *et al.* Characterization of changes in serum anti-glycan antibodies in Crohn's disease--a longitudinal analysis. *PloS One* **6,** e18172 (2011).

515. Bonneau, J. *et al.* Systematic review: new serological markers (anti-glycan, anti-GP2, anti-GM-CSF Ab) in the prediction of IBD patient outcomes. *Autoimmun. Rev.* **14,** 231–245 (2015).

516. Totaro, M. C. *et al.* Porphyromonas gingivalis and the pathogenesis of rheumatoid arthritis: analysis of various compartments including the synovial tissue. *Arthritis Res. Ther.* **15,** R66 (2013).

517. Mikuls, T. R. *et al.* Antibody responses to Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis) in subjects with rheumatoid arthritis and periodontitis. *Int. Immunopharmacol.* **9,** 38–42 (2009).

518. Herath, T. D. K. *et al.* The expression and regulation of matrix metalloproteinase-3 is critically modulated by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide with heterogeneous lipid A structures in human gingival fibroblasts. *BMC Microbiol.* **13,** 73 (2013).

519. Trindade, S. C. *et al.* Porphyromonas gingivalis antigens differently participate in the proliferation and cell death of human PBMC. *Arch. Oral Biol.* **57,** 314–320 (2012).

520. Pers, J.-O., Saraux, A., Pierre, R. & Youinou, P. Anti-TNF-alpha immunotherapy is associated with increased gingival inflammation without clinical attachment loss in subjects with rheumatoid arthritis. *J. Periodontol.* **79,** 1645–1651 (2008).

521. Okada, M. *et al.* Periodontal treatment decreases levels of antibodies to Porphyromonas gingivalis and citrulline in patients with rheumatoid arthritis and periodontitis. *J. Periodontol.* **84,** e74–84 (2013).

522. Rogers, G. B. Germs and joints: the contribution of the human microbiome to rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* **21,** 839–841 (2015).

523. Zhang, X. *et al.* The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat. Med.* **21,** 895–905 (2015).

524. Sun, S. *et al.* The active form of MMP-3 is a marker of synovial inflammation and cartilage turnover in inflammatory joint diseases. *BMC Musculoskelet. Disord.* **15,** 93 (2014).

525. Litinsky, I. *et al.* The effects of leflunomide on clinical parameters and serum levels of IL-6, IL-10, MMP-1 and MMP-3 in patients with resistant rheumatoid arthritis. *Cytokine* **33,** 106–110 (2006).

526. Funahashi, K. *et al.* Efficacy of tocilizumab and evaluation of clinical remission as determined by CDAI and MMP-3 level. *Mod. Rheumatol. Jpn. Rheum. Assoc.* **19,** 507–512 (2009).

527. Urata, Y., Uesato, R., Tanaka, D., Nakamura, Y. & Motomura, S. Treating to target matrix metalloproteinase 3 normalisation together with disease activity score below 2.6 yields better effects than each alone in rheumatoid arthritis patients: T-4 Study. *Ann. Rheum. Dis.* **71,** 534–540 (2012).

528. Lequerré, T. *et al.* Autoantibodies, metalloproteinases and bone markers in rheumatoid arthritis patients are unable to predict their responses to infliximab. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **46,** 446–453 (2007).

529. Handfield, M. *et al.* Distinct transcriptional profiles characterize oral epithelium-microbiota interactions. *Cell. Microbiol.* **7,** 811–823 (2005).

530. Keffer, J. *et al.* Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* **10,** 4025–4031 (1991).

531. Kouskoff, V. *et al.* Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* **87,** 811–822 (1996).

532. Sakaguchi, N. *et al.* Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* **426,** 454–460 (2003).

533. Keller, K. K. *et al.* SKG arthritis as a model for evaluating therapies in rheumatoid arthritis with special focus on bone changes. *Rheumatol. Int.* **33,** 1127–1133 (2013).

534. Atsumi, T. *et al.* A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. *J. Exp. Med.* **196,** 979–990 (2002).

535. Niki, Y. *et al.* Membrane-associated IL-1 contributes to chronic synovitis and cartilage destruction in human IL-1 alpha transgenic mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **172,** 577–584 (2004).

536. Horai, R. *et al.* Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J. Exp. Med.* **191,** 313–320 (2000).

537. 052911 Rat AIA.indd - Rat AIA.pdf. at <http://www.chondrex.com/protocol/Rat%20AIA.pdf>

538. Holmdahl, R. *et al.* Arthritis induced in rats with nonimmunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* **184,** 184–202 (2001).

539. CHATENOUD & BACH. *Immunologie - 6e édition*. (Lavoisier, 2012).

540. Anderle, S. K., Greenblatt, J. J., Cromartie, W. J., Clark, R. & Schwab, J. H. Modulation of the susceptibility of inbred and outbred rats to arthritis induced by cell walls of group A streptococci. *Infect. Immun.* **25,** 484–490 (1979).

541. Gully, N. *et al.* Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase, a key contributor in the pathogenesis of experimental periodontal disease and experimental arthritis. *PloS One* **9,** e100838 (2014).

542. Maresz, K. J. *et al.* Porphyromonas gingivalis facilitates the development and progression of destructive arthritis through its unique bacterial peptidylarginine deiminase (PAD). *PLoS Pathog.* **9,** e1003627 (2013).

543. Marchesan, J. T. *et al.* Porphyromonas gingivalis oral infection exacerbates the development and severity of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **15,** R186 (2013).

544. De Aquino, S. G. *et al.* Periodontal pathogens directly promote autoimmune experimental arthritis by inducing a TLR2- and IL-1-driven Th17 response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **192,** 4103–4111 (2014).

545. Baker, P. J., Dixon, M., Evans, R. T. & Roopenian, D. C. Heterogeneity of Porphyromonas gingivalis strains in the induction of alveolar bone loss in mice. *Oral Microbiol. Immunol.* **15,** 27–32 (2000).

546. Yarur, A. J. *et al.* The association of tissue anti-TNF drug levels with serological and endoscopic disease activity in inflammatory bowel disease: the ATLAS study. *Gut* (2015). doi:10.1136/gutjnl-2014-30809

ANNEXES

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

Current Drug Targets, **2014**, *15*, **1049-1055** **1049**

Pharmacokinetics in IBD: Ready for Prime Time?

Xavier Roblin[1,*], Melanie Rinaudo[2], Miles Peter Sparrow[3], Amelie Moreau[2], Jean Marc Phelip[1], Christian Genin[2], Dominique Lamarque[4] and Stephane Paul[2]

[1]*Service de Gastro-Entérologie-Hépatologie, CHU de Saint-Etienne, France;* [2]*Laboratoire d Immunologie and Immunomonitoring, CIC INSERM 1408, CHU de Saint-Etienne, France;* [3]*Monash University, Melbourne, Australia;* [4]*Service Gastroenterologie, CHU Lariboisiére Paris, France*

Abstract: This review discusses the rationale behind recommending immunopharmacological guidance of long-term therapies with anti-TNF-a specific biotherapies. "Arguments why therapeutic decision-making should not rely on clinical outcomes alone are presented. Central to this is that the use of theranostics (i.e., monitoring circulating levels of functional anti-TNF-a drugs and antidrug antibodies) would markedly improve treatment because therapies can be tailored to individual patients and provide more effective and economical long-term clinical benefits while minimising risk of side effects. Large-scale immunopharmacological knowledge of the pharmacokinetics of TNF-a biopharmaceuticals in individual patients would also help industry to develop more effective and safer TNF-a inhibitors" [1].

Keywords: Antibodies to anti TNF, anti TNF treatment, Crohn's disease, optimisation, trough levels of anti TNF, ulcerative colitis.

INTRODUCTION

The monitoring of inflammatory bowel disease (IBD) based on clinical symptoms and activity scores alone has major drawbacks. Despite clinical remission as assessed by disease activity scores many patients have ongoing low-grade intestinal inflammation, in part because the subjective components of activity scores may underestimate IBD activity [2]. In the last two decades, with the development of biological (anti-TNFa) therapy, the treatment paradigms for Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) have evolved, with a continuously increasing role of biological agents, as demonstrated in large industry-sponsored clinical trials (Accent 1, ACT1-2, CHARM, Pursuit) [3-5]. Some patients, however, experience lack- or loss of response (LOR) to treatment, and management of such patients to date has been empirical [6]. The measurement of biomarkers has become increasingly used to assess both disease activity and reasons for LOR to therapies. "C-reactive protein might identify patients with low-grade inflammation, especially in CD, but sensitivity remains limited. Recently, fecal markers of inflammation have been shown to correlate with endoscopic disease activity and to predict relapse. However, data on serial measurements of serum or fecal biomarkers to guide therapy are scarce. The role of measuring serum levels of anti-TNF-a antibodies and plasma TNF-aconcentrations in IBD therapy is currently unclear and needs to be defined further" [7]. Monitoring trough drug levels and anti-drug antibodies is expected to play an emerging role in the management of LOR (i.e., to confirm adherence, allow for dose adjustment, or provide a rationale for switching to another anti-TNF agent or to a different class of biological agent) in the coming years [7, 8]. The optimal use of therapeutic drug monitoring is however not clear to date. Therefore in clinical practice today, meticulous assessment of clinical symptoms, confirmation of disease activity by endoscopic or radiological imaging, and exclusion of fibrostenotic, perforating or other disease complications remains necessary.

The available data regarding the relationship between serum anti-TNF drug concentrations, antibodies against anti-TNF agents, and clinical efficacy, as well as the development of adverse events and the management of LOR will be presented in this review.

THE ASSOCIATION BETWEEN TROUGH LEVELS AND CLINICAL REMISSION

Regarding the use of infliximab (IFX) trough levels, all industry studies have demonstrated that higher trough levels of infliximab (TRI) were associated with clinical remission. In a cohort study, we showed that average TRI was significantly higher in the case of clinical remission in both CD and UC [9]. In this work based on the use of a commercial kit for measure of TRI (Lisa-Tracker premium, Theradiag), and after an AUROC analysis, the discriminant threshold was determined at 2 µg/ml. This threshold varies depending on the assay used. Thus, the cut off chosen by Leuven's team with a home-made immunoassay was about 3 µg/ml [10].

For trough levels of adalimumab (TRA), Karmiris *et al.* noticed "that average levels were significantly higher in CD patients with a clinical response at 24 weeks" [11]. Conversely, TRA were not predictive of short term response [11]. As demonstrated by Roblin *et al.*, "these levels were

*Address correspondence to this author at the Department of Gastroenterology, CHU de Saint-Etienne, 42023 Saint-Etienne, France;
Tel: 0033-477-82-8619; Fax: 0033-477-82-8457;
E-mail: xavier.roblin@chu-st-etienne.fr

1873-5592/14 $58.00+.00 © 2014 Bentham Science Publishers

Reprint Preview

significantly higher in the case of clinical remission with ADA, both in CD and UC" [12].

In a meta-analysis, anti-infliximab antibodies (ATI) were associated with a loss of clinical response to infliximab and with an increase of side effects [13]. In CD patients, ATI rates were significantly associated with treatment failure (OR: 3,2 [1, 89–5,5], p < 0,01). The results were not significant in UC, probably due to a lack of statistical power. We must note that this meta-analysis was characterized by a high statistical heterogeneity amongst studies. Regarding TRA rates, West *et al.*, showed that, in CD, the percentage of clinical response under ADA was higher than 80% in TRA absence, and less than 20% when these antibodies were present (p<0.05) [14].

The incidence of ATI formation over time is estimated to be 46%, with 90% of patients developing ATI within the first 12 months of therapy [15]. In contrast, transient ATI, which are presumed to be of little clinical significance, could appear spontaneously at any time during treatment. ATI incidence was similar between patients who received IFX previously (episodic, interrupted therapy) and scheduled-therapy patients. In many patients (54%), the detection of ATI preceded the onset of clinical loss of response and in 30% the two events were detected simultaneously.

In a very recent paper submitted to IBD, we have performed a meta-analysis on the correlation between the use of TRA and AAA. The presence of AAA is associated with a significantly higher risk of loss of clinical response to ADA in CD while high TRA are associated with greater clinical response rates in CD [32].

In the PURSUIT study, the authors performed a phase 3 double-blind trial of patients who completed golimumab induction and maintenance trials. "Patients who responded to induction therapy with golimumab were assigned randomly to groups given placebo or injections of 50 or 100 golimumab every 4 weeks through W52" [16, 17]. The primary endpoint was clinical response maintained through week 54. Serum drug levels were assessed by quartile analysis. Among randomized patients in the combined golimumab (50mg and 100mg), greater proportions of patients in the higher serum golimumab concentration quartiles achieved clinical response through W54 or clinical remission at both W30 and W54 when compared with those in the lower serum concentration quartiles.

ASSOCIATION BETWEEN TROUGH LEVELS AND MUCOSAL HEALING

In an observational study of 210 CD patients, Leuven's team showed that TRI were significantly higher in cases with mucosal healing than in those with endoscopically active disease (5.0 µg/mL *vs* 0.95 µg/mL respectively, p=0.006) [18]. In a prospective study, we have demonstrated "an association between TRI and mucosal healing (MH) [9]. Following IFX dose intensification, half of CD and UC patients achieved MH. Increase in infliximab trough levels (called "delta IFX", µg/ml) was associated with MH in both CD and UC (p=0.001). A "delta IFX" > 0.5 µg/ml was associated with MH (sensitivity (se): 0.88, specificity (sp): 0.77; p=0.0001, AUROC: 0.89). On multivariate analysis, the only factor associated with MH after IFX optimization was a delta IFX>0.5µg/mL in IBD patients" [9].

Therapeutic drug monitoring of IFX strongly predicts the likelihood of achieving MH following IFX dose intensification in both CD and UC. For ADA, the situation is similar as we have reported in a study of 40 IBD patients in whom "mean TRA were significantly higher in patients with MH, in both CD and UC (p<0.05)" [12].

ASSOCIATION BETWEEN ANTI-DRUG ANTIBODIES AND ADVERSE EFFECTS

The development of ATI has been linked in some studies to infusion reactions for many years. Patients who experience this adverse effect are more likely to stop therapy. In a recent meta-analysis involving 8 studies and 1185 patients, O'Meara *et al.*: "found an association between ATI and acute infusion reactions to IFX. Patients on IFX therapy who develop ATI had a 2-fold higher increased risk of acute infusion reactions, and a 6-fold higher risk of serious infusion reactions compared with those who did not develop ATI" [19]. Rates of ATI development and acute infusion reactions were lower in patients on concurrent immunomodulators.

PREDICTION OF THERAPEUTIC LONG-TERM RESPONSE ACCORDING TO SERUM DRUG LEVELS

Bortlik *et al.*, analyzed TRI at week 14 in 84 CD patients treated with infliximab induction therapy [20]. For those who had a TRI >3 µg/ml, the cumulative probability of remaining in remission under treatment was significantly higher than those with a TRI under this threshold (p<0.001). These results are comparable in UC. Thus, in a cohort of 1335 UC patients, TRI at week 14 were very predictive of sustained clinical remission under IFX therapy (p=0.002) [21].

Therapeutic optimization is commonly required during anti-TNF treatment. For IFX, loss of response was estimated at 30% during the first year then at 13% per year and for ADA at 20% per year. After therapeutic optimization, two studies have shown that patients who responded to IFX had a delta IFX (TRI after minus before optimization) significantly higher than non-responders for which the delta IFX remained at 0 [9]. For ADA, Karmiris *et al.* found similar results with a delta significantly higher in patients responding to therapeutic optimization [11].

However, the clinical impact of the use of such "a posteriori" delta IFX remains weak in daily practice to date, although it could help identify patients in whom non-TNF driven escape mechanisms are the reason for loss of response to anti-TNF therapies.

Many patients are currently treated by combination therapy combining an anti-TNF and an immunosuppressive drug. Given the risks of combination therapy the possibility of withdrawal of either therapy at some point should be discussed with patients.

In the STORI study, the authors included patients treated by combination therapy for at least 12 months who were in clinical remission for at least 6 months. "In this open-label study, patients stopped infliximab" [22]. The aim of this study was to analyze medium-term rate of relapse under

Archive Libre

thiopurine monotherapy and to isolate factors associated with relapse. Half of the patients will relapse within 18 months. Several independent factors were associated with relapse. Among them, a rate of TRI > 2 µg/ml at the time of stopping IFX was an independent factor significantly associated with relapse during follow up. In a separate study, Leuven's team stopped the immunosuppressant in cases of combination therapy. In this study the recurrence rate at medium-term under IFX monotherapy for patients with a TRI > 5µg/ml was zero. When TRI was detectable but < 5µg/ml, the authors noted a recurrence rate of about 30%. Conversely, all patients with undetectable TRI relapsed at short-term.

THE USE OF THERAPEUTIC DRUG MONITORING IN CLINICAL PRACTICE

Currently, consensus opinion recommends treatment optimization of each agent before switching therapy in a patient with loss of response, however data from the literature are highly variable. In the presence of ATI without TRI, the Mayo clinic team shows a clear superiority switching to another anti TNF treatment compared to optimization with higher doses of the same ant-TNF agent. Ben-Horin *et al.*, demonstrated in a small case series that adding an immunosuppressant can reduce ATI production, increase TRI and therefore recover clinical remission without increasing IFX doses [6, 23]. By contrast, in the absence of ATI and TRI, therapeutic optimization with the same agent is the treatment of choice. Finally, in the case of patients presenting loss of response but with high trough levels of anti-TNF, it is advisable to switch out of class to an agent with a different mechanism of action. This algorithm is comparable for IFX and ADA. In Fig. (**1**), we summarize optimization proposals for IFX and ADA according to these biomarkers (trough levels and anti-drug antibodies) [9, 24].

In a recent study, the authors "reported that early trough levels and antibodies to IFX predicted safety and success of re-initiation of IFX therapy" [25]. In total, 128 patients were included, after a median period of 15 months of discontinuation of IFX therapy. Absence of antibodies to infliximab at the time of treatment re-commencement (hazard ratio [HR]=0.14; 95% confidence interval [CI], 0.026-0.74; P=0.021) was associated with short-term treatment response (HR=6.0; 95% CI, 1.3-27; P=0.019) and with the safety of re-initiating therapy (HR for infusion reaction with detectable ATI (HR=7.7; 95% CI, 1.88-31.3; P=0.004). Moreover, higher trough levels at the time of treatment restart (HR=2.94; 95% CI, 1.18-7.69; P=0.021) were associated with long-term response.

Current Limitations of Therapeutic Drug Monitoring

Limitations due to difference in the technique of measurement and due to considerable variability and overlap between patients with and without remission:

Measurements of residual trough levels of anti-TNF drugs and their antibodies appear useful in clinical practice and have led to the development of treatment algorithms applicable in cases of loss of efficacy to the molecules. However, the methods used are different depending on the published studies which make comparisons highly difficult. Currently, different immunoassays are commercially available or "home made". Identified thresholds for both trough levels and anti-drugs specific antibodies are highly variable from one technique to another, meaning thresholds are not common into one specific treatment algorithm. Moreover, using ELISA techniques, the specificity of anti-drugs antibodies measurement is low when anti-TNF levels are present in serum of the patients. Due to pre-existing complexes between drug and anti-drug antibodies, many samples remain as ATI or AAA inconclusive. Such results have been reported in 25-79% of patients treated by anti-TNF [26, 27]. Methods have evolved to address this problem. Substitution of HRP-labeled IFX with anti-human lambda chain conjugated in the detector phase resulted in the identification of 6.3% patients with positive ATI in the presence of IFX [28]. Alternatively, acid-dissociation of ADA/AAA complexes prior to capture allowed the detection of AAA in 27.6% of samples compared with 3.4% with a conventional ELISA [29]. Moreover, these techniques have some false positive AAA results due to binding of low affinity antibodies (rheumatoid factors, heterophilic antibodies) and activated complement. Radioimmunoassay seems more reliable. This utilizes the fact that IFX is an IgG construct with murine kappa light chains, hence discriminating between free circulating IFX and that bound to any class of delta containing human Ig [30] but is complicated to use in daily practice. High Mobility Shift Assay (HMSA) is also cumbersome but seems more convenient as it allows the measure of anti-drug antibodies independently of anti-TNF levels. This seems crucial as in the presence of residual anti-TNF, ATI levels are predictive for a loss of response. In a recent study, Feagan *et al.*, "investigated 1487 serum samples from 483 CD patients from four randomized prospective controlled trials or cohort study to evaluate relationship between TRI and ATI with disease activity assessed by CRP" [31]. They showed "that both TRI and ATI were noted to be related to median CRP levels". Patients with ATI (independently of the trough levels of infliximab) had significantly higher CRP levels than those without ATI (p=0.0038). However, to date it is unclear how to manage the scenario of therapeutic TRI with detectable ATI.

Recently, the Leuven team compared three ELISA techniques and concluded that they techniques were generally equivalent [33]. More recently, the authors compared HMSA and ELISA immunoassay over 1232 consecutive serum samples. Only the appearance of ATI in patients was found earlier by HMSA. The authors therefore concluded that the choice of technique should take into account the cost of analysis as well as the clinical differences applicable to each type of assay [34].

Another limitation of therapeutic drug monitoring is the considerable variability and overlap between patients with and without remission, as shown in two recent studies [35]. These studies used two different techniques but in both cases analyzed TRA [36]. This variability was not reported in two large Belgian cohorts for both IFX and ADA [11, 33]. However, further prospective studies are required until therapeutic target levels become better defined.

Moreover we don't know if the relationship between trough levels and clinical response demonstrates causality or merely an association. While most studies and meta-analyses

Author Proof

report an association between high trough levels of IFX, ADA or certolizumab and clinical response, it does not prove any relation between cause and effect. It is unclear whether a high trough level of IFX is the cause of remission or the consequence of quiescent disease that will therefore produce less TNF, thus reducing drug clearance. In two controlled studies on IFX and ADA, the patient group with undetectable trough levels of anti-TNF had clinical remission rates of 58 and 55% respectively [11, 27]. The cellular mechanism underlying these cases is currently unknown. Are these patients in spontaneous remission independent of the biologic? Could a very low anti-TNF trough level be sufficient in these patients? In addition, it would be interesting to study the clinical impact of discontinuation of anti-TNFs in this group of patients.

Limitations in knowledge due to the permanent or transient nature of ATIs?

The clinical significance of transient ADAs remains unknown. Vande Casteele *et al.*, clearly showed that the presence of some ATI were transient and without clinical consequences, unlike permanent ATI [34]. Transient ATI are believed to occur at any time during therapy whilst permanent ATI appear early after anti-TNF commencement. Consistent with this, in a recent prospective study, we confirmed the results of the Leuven team but by showing that the presence of ATI during the two consecutive months of therapy was independently associated to loss of response (HR: 3.2 ; p=0.004) [37].

We measure a trough level but not the functionality of the drug and anti-drug antibodies!

Our current techniques allow us to measure only residual trough levels of anti-TNF and antibodies but we cannot analyze their functional activity. To date, we don't know if a high level of anti-TNF is equivalent to a high functional activity of the molecule at the tissue level? Does the measure of trough levels reflect its ability to neutralize the TNF? We demonstrated in a cohort of 100 patients that IFX trough levels were comparable to the measure of TNF bioactivity using a "home made" cellular assay [38]. In a recent study, the authors "created a fluorescent antibody for molecular membrane-bound TNF in CD mTNF(+)" [39]. "Patients with high numbers of mTNF(+) cells showed significantly higher response rates at week 12 upon subsequent anti TNF therapy (92%) as compared to patients with low amounts of mTNF(+) cells (15%)(p=0.0002)".

What is the target trough levels?

One of the current goals of therapeutic drug monitoring is to identify an effective IFX trough level threshold for IBD patients that is associated with improved clinical outcomes. TAXIT was a prospective, randomized study comparing two strategies; first a clinical strategy with dose adjustment based on clinical parameters following an optimization phase and a second strategy based on pharmacology (treat to target levels) with the goal to maintain trough levels in patients between 3 and 7 µg/ml [40]. The primary endpoint was clinical and biochemical remission in each arm at one year. This rate was identical between the two strategies (69% *vs* 72%; p=0.7). At 12 months, more patients in the drug level group reached target TRI compared to clinical adjustment (78% *vs*56% ; p<0.0001).Also, ATI were more common in the group with clinical adjustment compared with the level based dose adjustment (RR: 3.3 95% CI : 1.4-7.7; p<0.01). Despite an excellent trial design these negative data raise more questions than answers.

"The standard dose for maintenance therapy is probably not uniformly optimal for all patients in remission. The optimal cut-off value could be modified according to the severity and duration of active disease. This situation is reflected by patients with surgically-induced remission, in whom standard but also lower doses of infliximab have proven efficacious for preventing disease recurrence" [41]. However, the follow-up of the study was short and biochemical differences were reported between groups meaning these results could be different in the long term. In fact, it is possible that optimizing a patient in clinical remission with low trough level has no benefits. Colombel *et al.*, reported that 58% of patients with undetectable trough levels of infliximab were in clinical remission [27]. It is possible that the target TRI necessary to obtain is different depending on the time of patient follow up. Thus during the induction or active phase, the presence of high levels of TNF will rapidly decrease the TRI, suggesting that it's important to have very high TRI. Conversely, for the maintenance of quiescent disease, maybe low TRI could be sufficient to maintain clinical remission. The Tayforix current study will help confirm or refute these findings. With the limitations of current knowledge these assays appear useful in the assessment of loss of response and probably when discussing the option of dose reduction.

A decreased trough level of anti TNF is not always linked solely to an immunologic explanation

There are many factors that may influence the pharmacokinetics of anti-TNF. These include the presence of anti-drug antibodies which decrease drug concentration and increase clearance, as well as the concomitant use of immunosuppressive drugs which reduces anti-drug antibodies formation and therefore increases drug concentration and decreases drug clearance. "In addition low serum albumin concentration, high baseline CRP concentration and high baseline TNF concentration may also decrease drug concentration by increasing clearance" [7]. High body mass index or the sex of the patient may also affect drug clearance [7, 8]. We report in Table **1** factors that influence the PK of TNF antagonists [7, 8].

Are pharmacokinetics in IBD cost-effective?

Currently, these assays have a significant cost, which varies depending on the method and they are not reimbursed by most health care systems. However, recently two studies have shown that therapeutic drug monitoring of anti-TNFs may be cost-effective. In a modeling study, Velayos *et al.*, showed "that a testing-based strategy was a cost-effective alternative to the current strategy of empiric dose escalation for managing patients with CD who have lost responsiveness to IFX" [42]. "The basis for this difference was lower cost at similar outcomes". In a randomized prospective monocentric study, Steennhold *et al.*, have reported that" treatment of secondary IFX failure using an algorithm based on combined TRI and ATI measurements significantly reduced average

Not for distribution

Annexes

treatment costs per patient compared with routine IFX dose escalation and without any apparent negative effect on clinical efficacy" [43].

Table 1. Factors that influence the PK of TNF antagonists.

	Impact on TNF Antagonists' PK
Presence of ADAs	Decreases drug concentration Increases clearance Worse clinical outcomes
Concomitant use of immunosuppressive	Reduces ADAs formation Increases drug concentration Decreases drug clearance Better clinical outcomes
Low serum albumin concentration	Increases drug clearance Worse clinical outcome
High baseline CRP	Increases drug clearance
High baseline TNF	May decrease drug concentration by increasing clearance
High body size	May increase drug clearance
Gender	Males have higher clearance

Adapted from Ordás *et al.* Clinical Pharmacology and Therapeutics 2012; 91(4): 635-46 [7].

Limits of our Algorithm (Fig. 1)

In the case of patients presenting loss of response but with high trough levels of anti-TNF, it is advisable to switch out of class to an agent with a different mechanism of action. Currently, several new therapeutic classes are being tested (ustekinumab, vedolizumab, anti-MADCAM-1). In clinical practice today, such options for patients with adequate anti-TNF levels include vedolizumab which recently obtained authorization of treatment for CD and UC in Europe and the USA. For patients with high anti-TNF levels therapeutic optimization with the same agent was only effective for 25 % of cases with IFX or ADA, as shown in two recent studies, one retrospective and the other prospective, [9, 44]. In the future, accurate quantification of ATI status by HMSA techniques could be helpful in identifying subgroups of patients more likely to respond to optimization with the same anti-TNF agent (eg. patients with low levels of ATIs).

If patients have low trough levels in the presence of anti-drug antibodies, a switch within class is recommended. However if no alternative anti-TNF molecule is available another option is the addition of an IS without dose escalation of the anti TNF. Currently however we have no controlled trials comparing these two strategies. Finally if patients have low trough levels without anti-drug antibodies, optimization with the same agent should be recommended.

The main limitation of these algorithms is linked to the absence of therapeutic options in some cases. The future should allow us to facilitate our therapeutic choices based on pharmacological models. Large, prospective studies that implement algorithms based of pharmacokinetics are underway, the results of which are eagerly awaited.

CONCLUSION

Immunogenicity, in the form of anti-drug antibodies, can occur with any of the biologic agents used in IBD. To date, the mechanisms involved in the induction of immunogenicity are not well understood. Moreover, humanization of antibodies does not prevent this risk. The impact of immunogenicity is important and can modify drug pharmacokinetics resulting in suboptimal levels and loss of response. The presence of anti-drug antibodies has also been associated with intolerance in the form of infusion reactions. The induction of im-

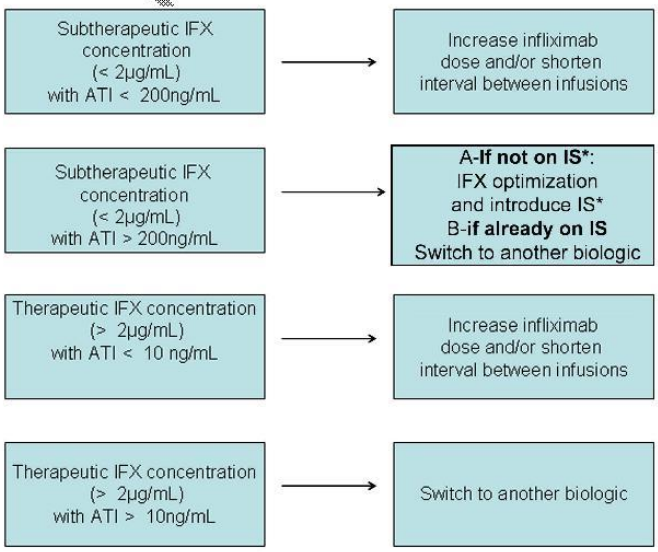


Fig. (1). Algorithm based on trough levels and antibodies against anti TNF in IBD patients presenting loss of response under therapy.

munogenicity differs with each agent however anti-drug antibodies can develop not only with chimeric IFX but also with humanized ADA or certolizumab. The incidence of anti-drug antibodies ranges from 14 to 73% for IFX, 0-17% for ADA and 2-13% for certolizumab. Methods used to measure anti-drug antibodies as well as the influence of patient specific factors (severity of disease, concomitant treatment, schedule of treatment, clearance) could be involved in these variations. The induction of anti-drug antibodies has important clinical features in IBD patients including shortened clinical response, mucosal healing and infusion reactions. Accumulating evidence from recent studies have led to the development of new algorithms in IBD patients losing response to anti TNF treatment based on trough levels and anti drugs antibodies. "Because it is important to maintain clinically effective concentrations to provide optimal clinical response and drug exposure is affected by various patient factors, a better understanding of the pharmacology of anti TNF treatment will ultimately result in better clinical outcomes" [8].

ABBREVIATIONS

IBD = Inflammatory bowel disease

CD = Crohn's disease

UC = Ulcerative colitis

TRI = Trough levels of infliximab

ATI = Antibodies to infliximab

TRA = Trough levels of adalimumab

AAA = Antibodies against adalimumab

IFX = Infliximab

ADA = Adalimumab

MH = Mucosal healing

CONFLICT OF INTEREST

S. Paul, M. Rinaudo, A. Moreau, C. Genin, J.M. Phelip, D. Lamarque: no conflicts of interests.

X. Roblin: lecturing and consulting fees: MSD, Abbvie, Theradiag, Takeda, Hospira.

M.P. Sparrow: lecturing and consulting fees: Janssen/MSD, Abbvie, Takeda.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

REFERENCES

[1] Bendtzen K. Anti-TNF-a biotherapies: perspectives for evidence-based personalized medicine. Immunotherapy 2012; 4(11): 1167-79.

[2] Peyrin-Biroulet L, Reinisch W, Colombel JF, *et al.* Clinical disease activity, C-reactive protein normalisation and mucosal healing in Crohn's disease in the SONIC trial. Gut 2014, 63: 88-95.

[3] Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, *et al.* Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. Lancet 2002; 359: 1541-9.

[4] Sandborn WJ, Rutgeerts P, Feagan BG, *et al.* Colectomy rate comparison after treatment of ulcerative colitis with placebo or infliximab. Gastroenterology 2009; 137: 1250-1260; quiz 1520.

[5] Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P, *et al.* Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial. Gastroenterology 2007; 132: 52-65.

[6] Ben-Horin S, Chowers Y. Review article: loss of response to anti-TNF treatments in Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther 2011; 33: 987-95.

[7] Ordas I, Feagan BG, Sandborn WJ. Therapeutic drug monitoring of tumor necrosis factor antagonists in inflammatory bowel disease. Clin Gastroenterol Hepatol 2012; 10: 1079-1087; quize1085-1076.

[8] Ordas I, Mould DR, Feagan BG, Sandborn WJ. Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. Clin Pharmacol Ther 2012; 91: 635-46.

[9] Paul S, Del Tedesco E, Marotte H, *et al.* Therapeutic drug monitoring of infliximab and mucosal healing in inflammatory bowel disease: a prospective study. Inflamm Bowel Dis 2013; 19: 2568-76.

[10] Vermeire S, Gabriels F, Ballet V. The effect of dose escalation on trough levels in patients who lost response to infliximab. Gut 2010, 59: A81.

[11] Karmiris K, Paintaud G, Noman M, *et al.* Influence of trough serum levels and immunogenicity on long-term outcome of adalimumab therapy in Crohn's disease. Gastroenterology 2009; 137: 1628-40.

[12] Roblin X, Marotte H, Rinaudo M, *et al.* Association Between Pharmacokinetics of Adalimumab and Mucosal Healing in Patients with Inflammatory Bowel Diseases. Clin Gastroenterol Hepatol 2013.

[13] Nanda KS, Cheifetz AS, Moss AC. Impact of antibodies to infliximab on clinical outcomes and serum infliximab levels in patients with inflammatory bowel disease (IBD): a meta-analysis. Am J Gastroenterol 2013; 108: 40-47; quiz 48.

[14] West RL, Zelinkova Z, Wolbink GJ, Kuipers EJ, Stokkers PC, van der Woude CJ. Immunogenicity negatively influences the outcome of adalimumab treatment in Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther 2008; 28: 1122-6.

[15] Ungar B, Chowers Y, Yavzori M, *et al.* The temporal evolution of antidrug antibodies in patients with inflammatory bowel disease treated with infliximab. Gut 2014; 63(8): 1258-64.

[16] Sandborn WJ, Feagan BG, Marano C, *et al.* Subcutaneous golimumab induces clinical response and remission in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. Gastroenterology 2014; 146: 85-95; quiz e14-85.

[17] Sandborn WJ, Feagan BG, Marano C, *et al.* Subcutaneous golimumab maintains clinical response in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. Gastroenterology 2014; 146: 96-109e101.

[18] Van Moerkeroke W, Ackaert C, Compernolle G. High infliximab trough levels are associated with mucosal healing in Crohn's disease. Gastroenterology 2010; 5: S60.

[19] O'Meara S, Nanda KS, Moss AC. Antibodies to Infliximab and Risk of Infusion Reactions in Patients With Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. Inflamm Bowel Dis 2014; 20: 1-6.

[20] Bortlik M, Duricova D, Malickova K. Infliximab trough levels may predict sustained response ton infliximab in patients with Crohn's disease: a single cohort study. J Crohn's & Colitis 2012; 6: S153.

[21] Arias MVC, Drobne D. Importance of trough levels and antibodies on the long-term efficacy of infliximab therapy in ulcerative colitis. J Crohn's & Colitis 2012; 6: S5.

[22] Louis E, Mary JY, Vernier-Massouille G, *et al.* Maintenance of remission among patients with Crohn's disease on antimetabolite therapy after infliximab therapy is stopped. Gastroenterology 2012; 142: 63-70 e65; quiz e31.

[23] Ben-Horin S, Mazor Y, Yanai H, *et al.* The decline of anti-drug antibody titres after discontinuation of anti-TNFs: implications for predicting re-induction outcome in IBD. Aliment Pharmacol Ther 2012; 35: 714-722.

[24] Roblin X, Rinaudo M, Del Tedesco E, *et al.* Development of an algorithm incorporating pharmakinetics of adalimumab in IBD. In IMMI. Edited by. Nice; 2014.

[25] Baert F, Drobne D, Gils A, *et al.* Early Trough Levels and Antibodies to Infliximab Predict Safety and Success of Re-initiation of Infliximab Therapy. Clin Gastroenterol Hepatol 2014; 12(9): 1474-81.

[26] Afif W, Loftus EV, Jr., Faubion WA, *et al.* Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations

Be In Proof

in patients with inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 2010, 105: 1133-9.

[27] Colombel JF, Sandborn WJ, Reinisch W, *et al.* Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. N Engl J Med 2010; 362: 1383-95.

[28] Kopylov U, Mazor Y, Yavzori M, *et al.* Clinical utility of antihuman lambda chain-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) versus double antigen ELISA for the detection of anti-infliximab antibodies. Inflamm Bowel Dis 2012, 18: 1628-33.

[29] Imaeda H, Takahashi K, Fujimoto T, *et al.* Clinical utility of newly developed immunoassays for serum concentrations of adalimumab and anti-adalimumab antibodies in patients with Crohn's disease. J Gastroenterol 2014; 49(1):100-9.

[30] Bendtzen K, Geborek P, Svenson M, Larsson L, Kapetanovic MC, Saxne T. Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor alpha inhibitor infliximab. Arthritis Rheum 2006; 54: 3782-89.

[31] Feagan B, Singh S., Lockton S. Novel infliximab and antibody to infliximab assays are predictive of disease activity in patients with crohn's disease. Gastroenterology 2012; 5: 505.

[32] Paul S, Rinaudo M, Del Tedesco E. *et al.* Pharmacokinetics of Adalimumab in Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review and Meta-analysis. Inflamm Bowel Dis 2014; 20: 1288-95

[33] Vande Casteele N, Buurman DJ, Sturkenboom MG, *et al.* Detection of infliximab levels and anti-infliximab antibodies: a comparison of three different assays. Aliment Pharmacol Ther 2012; 36: 765-71.

[34] Vande Casteele N, Gils A, Singh S, *et al.* Antibody response to infliximab and its impact on pharmacokinetics can be transient. Am J Gastroenterol 2013; 108: 962-971.

[35] Chiu YL, Rubin DT, Vermeire S, *et al.* Serum adalimumab concentration and clinical remission in patients with Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 2013; 19: 1112-22.

[36] Velayos FS, Sheibani S, Lockton S, *et al.* Prevalence of antibodies to adalimumab (ATA) and correlation between ATA and low serum drug concentration on CRP and clinical symptoms in a prospective sample of IBD patients. In DDW 2013. Edited by Hepatology Ga. Orlando; 2013: 4-5. vol 9 (8).]

[37] Leclerc M. P, S., and Roblin, X.: Cinétiques des ATI prédit la perte de réponse clinique au cours des MICI. In JFHOD. Edited by. Paris; 2014: P479.

[38] Rinaudo M, Paul S, Del Tedesco E, *et al.* Corrélation entre le taux d'infliximab évalué par technique Elisa et la bioactivité de l'infliximab chez des patients atteints de la maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique. In JFHOD. Edited by. Paris; 2014.

[39] Atreya R, Neumann H, Neufert C, *et al. In vivo* imaging using fluorescent antibodies to tumor necrosis factor predicts therapeutic response in Crohn's disease. Nat Med 2014; 20: 313-8.

[40] Vande Casteele N. Individualised infliximab regimen using therapeutic drug monitoring: a prospective controlled trough level adapted infliximab treatment trial (TAXIT). In UEGW 2013. Edited by: Journal of Crohn's and Colitis 2013: S6.

[41] Sorrentino D, Paviotti A, Terrosu G, Avellini C, Geraci M, Zarifi D. Low-dose maintenance therapy with infliximab prevents postsurgical recurrence of Crohn's disease. Clin Gastroenterol Hepatol 2010; 8: 591-599 e591; quiz e578-599.

[42] Velayos FS, Kahn JG, Sandborn WJ, Feagan BG. A test-based strategy is more cost effective than empiric dose escalation for patients with Crohn's disease who lose responsiveness to infliximab. Clin Gastroenterol Hepatol 2013; 11: 654-66.

[43] Steenholdt C, Brynskov J, Thomsen OO, *et al.* Individualised therapy is more cost-effective than dose intensification in patients with Crohn's disease who lose response to anti-TNF treatment: a randomised, controlled trial. Gut 2014; 63(6): 919-27.

[44] Pariente B, Pineton de Chambrun G, Krzysiek R, *et al.* Trough levels and antibodies to infliximab may not predict response to intensification of infliximab therapy in patients with inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2012; 18: 1199-206.

Received: February 16, 2014 **Revised: July 29, 2014** **Accepted: July 30, 2014**

Be a r P o al U n D

PMID: 25173707

Alimentary Pharmacology and Therapeutics

Review article: biosimilars are the next generation of drugs for liver and gastrointestinal diseases

M. Rinaudo-Gaujous*, S. Paul*, E. D. Tedesco†, C. Genin*, X. Roblin† & L. Peyrin-Biroulet‡

*Laboratoire d'Immunologie et d'Immunomonitoring, CIC CIE3, GIMAP EA3064, CHU de Saint-Etienne, France.
†Service de Gastrologie-Ent´erologie-H´epatologie, CHU de Saint-Etienne, France.
‡Inserm U954 et Service de Gastroent´erologie, CHU de Nancy, France.

Correspondence to:
Dr L. Peyrin-Biroulet, Inserm U954 and Department of Hepato-Gastroenterology, University Hospital of Nancy-Brabois, Universit´e Henri Poincar´e 1, All´ee du Morvan, 54511 Vandoeuvre-l`es-Nancy, France.
E-mail: peyrinbiroulet@gmail.com

Publication data
Submitted 15 July 2013
First decision 12 August 2013
Resubmitted 17 August 2013
Accepted 17 August 2013
EV Pub Online 3 September 2013

This commissioned review article was subject to full peer-review and the author received an honorarium from Wiley, on behalf of AP&T.

SUMMARY

Background
A biosimilar is a copy version of an approved original biological medicine whose data protection has expired.

Aim
To provide an overview of the development of biosimilars worldwide.

Methods
Literature review of manufacturing processes of biosimilars, differences and similarities between biosimilars and the reference product, approval path- ways for biosimilars, challenges in clinical trial study design and available data from clinical trials.

Results
Biosimilars have the same amino acid sequence and highly similar glycosyl- ation patterns that overlap with the originator product. Both efficacy and toxicity are difficult to predict due to subtle molecular changes that might have profound effects on clinical efficacy, safety and immunogenicity. Their main advantage is related to cost savings. Direct evidence of safety and benefit from clinical trials, post-marketing pharmacoviligance and unequiv- ocal identification of the product as a biosimilar are requirements before approval. Non-inferiority or equivalence trials are required by regulatory agencies. Over the past years, several biosimilars have been approved such as erythropoietin or growth factors. Recently, two monoclonal antibodies, Remsima and Inflectra, have been shown to be equivalent to infliximab (INX) in safety and efficacy in rheumatologic conditions. Interchangeability, automatic substitution and switching are key issues when treating patients with biosimilars in clinical practice.

Conclusions
Biosimilars represent a new generation of drugs in liver and gastrointestinal diseases. On June 27, 2013, Hospira's Inflectra (INX) was the first biosimi- lar monoclonal antibody to receive positive opinion from European Medi- cines Agency's Committee for Medicinal Products for Human Use for rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease and plaque psoriasis.

Aliment Pharmacol Ther 2013; 38: 914–924

© 2013 John Wiley & Sons Ltd
doi: 10.1111/apt.12477

INTRODUCTION

A similar biological medicinal product, commonly referred to as biosimilar, is a copy version of an approved original biological medicine whose data protection has expired.[1] Since the implementation of a biosimilar approval pathway in 2005, several biosimilars, including somatropins, filgrastims and epoetins, have been approved by Food and Drug Administration (FDA) and European Medicines Agency (EMA), and numerous other biosimilars, including monoclonal antibodies, are being developed.[2] All approved biologics are relatively expensive for the health care system, even though cost-efficacy analysis should also take into account their impact on disease-related and patient-related outcomes.[3]

Development of generics for small-molecule drugs has offered price reductions up to 80% compared with their branded counterparts.[4] A recent report by the Generic Pharmaceutical Association indicates that the use of generics saved the United States health care system an estimated $824 billion during the previous decade.[5] However, biosimilars have a different economic paradigm than that of generics. Because of higher development, facility and manufacturing costs, biosimilar savings are expected to be less important. A Congressional Budget Office estimate suggested a discount of up to 40%.[6] In the European Union (EU), erythropoiesis stimulating agents (ESA) biosimilars confer an estimated 25–30% cost savings compared with their innovator products, which also led to a decrease in innovator ESA prices.[7] Although cost savings for biosimilars will not be as great as for small-molecule generics, this should continue to increase access to biological drugs in the EU.[8]

Several major issues were raised by clinicians regarding biosimilars, relating to their pharmaceutical quality, safety and their interchangeability with the reference product. Whether data from clinical trials in a given condition should be extrapolated to other diseases is also a matter of debate.[9]

Herein, we review manufacturing processes of biosimilars as well as differences and similarities between biosimilars and the reference product, approval pathways for biosimilars, challenges in clinical trial study design and available data from clinical trials.

ARE BIOSIMILARS SIMILAR TO THE REFERENCE PRODUCT?

Biological agents are derived from living cells or micro-organisms and are based on relatively large and often highly complex molecular entities that may be difficult to fully characterise.[8] Because of inherent variability in the biological system and the manufacturing process, any resulting biological will display a certain degree of heterogeneity, even between different batches of the same product.[10] Because of unavoidable differences in the manufacturing processes, a biosimilar and it respective drug product will not be entirely identical.[11, 12] Protein sequence is expected to be the same, and only small differences in the structural pattern of the molecule may be acceptable. A very intensive comparison of the structural and functional characteristics, and the product and process-related impurities of the biosimilar and the reference product will be necessary.[9]

The National Comprehensive Cancer Network Biosimilars Work Group recognised that substantial differences exist between biologics (i.e. drugs produced by living systems) and traditional small-molecule drugs (i.e. chemical drugs) in terms of basic chemical structure, molecular weight and manufacturing processes.[13] Generic small-molecule drugs can be replicated in an exact way, so that they are atomically identical to their reference drug. Biologics are complex products produced by living systems; they will inherently exhibit some physiochemical differences in addition to the varying production processes that will also modify the products (e.g. purification methods, post-traductional modification as glycosylation or sialylation, tertiary or quaternary structures) (Figure 1).[14, 15]

The basic components of biologics are glycoproteins (i.e. amino acids and sugar molecules). Biological manufacturing processes involve many steps from cloning the desired gene via selection of a suitable cell type, fermentation and purification to formulation of the end product. Even small changes in the folding of the protein can manifest into a clinically meaningful difference in efficacy or toxicity.[16] The glycosylation pattern of a biological is important because it can influence the biological activity of a protein and contributes to its clinical profile. Glycosylation is notably sensitive to cell growth conditions. Changes in culture pH, the availability of precursors and nutrients, and the presence or absence of various cytokines and hormones can each affect the extent of glycosylation.[14]

It is the reason why different lots of any biological product manufactured by the same process are not 100% identical.[17] Furthermore, the complex process for manufacturing the reference biological is often proprietary. Therefore, demonstrating analytically that a biosimilar is highly similar to its reference product and showing that any small differences in the molecule comparison do not have any clinically meaningful differences is a practical and appropriate policy.[18]

© 2013 John Wiley & Sons Ltd

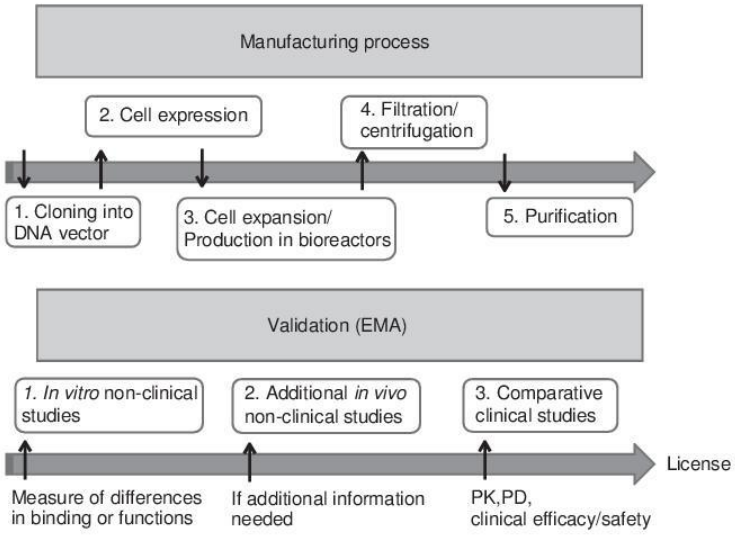


Figure 1 | Manufacturing processes of biosimilars, and approval pathways for biosimilars.

The BPCI Act (Bundled Payments for Care Improvement initiative) stated that biosimilars may be further determined to be interchangeable products. To be interchangeable with the reference product, the biosimilar is expected to produce the same clinical results.[19] The law also defines interchangeable to mean 'that the biological product may be substituted for the reference product without the intervention of the health care provider who prescribed the reference product.' For biologics that are administered more than once to a patient, the risks in terms of safety and efficacy of alternating or switching between use of the reference product and biosimilar must be equal to the risk of using only the reference product.[20] However, methods for adequate switching/ alternating studies have not yet been defined.[12]

REGISTRATION OF BIOSIMILARS BY REGULATORY AGENCIES

The EMA has established the first regulatory framework for assessing biosimilars.[21] This is distinct from the process required for generics[22, 23] and less extensive than the process required for registration of a new biological product or a new chemical product.[24–26] The reference product must be an innovator product, which is already authorised in the EU, with a similar active substance. Pharmaceutical form, strength and route of administration should be the same as that of the reference product. Comparability must be demonstrated in terms of quality, efficacy and safety.[27, 28] Comparability of quality is assessed for the active substance and the finished medicinal product and must be demonstrated for analytical methods, physico-chemical characterisation, biological activity and purity of the similar biological medicinal product.[28] Comparability of efficacy is assessed via non-clinical comparative in vitro and in vivo studies, and a repeat-dose toxicology study of sufficient length to allow detection of relevant differences in toxicity.[27] Com- parable clinical efficacy is evaluated through a stepwise procedure beginning with clinical pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) studies, followed by two or three-arm clinical efficacy studies; in certain cases, PK/ PD studies alone may be sufficient. Finally, clinical safety should be compared in clinical studies assessing the adverse event profile and immunogenicity. Plans for post-marketing surveillance – pharmacovigilance and risk management – should be also provided.[27] The data requirements and studies necessary to demonstrate comparability differ between product classes and are laid out in specific guidelines for somatropin, human soluble insulin, interferon alpha, erythropoietins (EPOs), granulocyte colony-stimulating factor, and most recently for biosimilar low molecular weight heparins.[29]

In May 2012, new EMA guidelines listed nonclinical and clinical requirements for monoclonal antibody (mAb) containing medicinal products claiming to be similar to another one already authorised.[30]

Comparative ***in vitro*** nonclinical studies to measure differences in binding or functions should be done first with an appropriate number of batches of product representative of that intended to be used in the clinical trial.[30] These studies should include relevant assays on the binding to target antigen(s), the binding to relevant isoforms of the

© 2013 John Wiley & Sons Ltd

three Fc gamma receptors (Fc*c*RI, Fc*c*RII and Fc*c*RIII), FcRn (neonatal Fc receptor) and complement (C1q), the measure of Fab-associated functions (e.g. neutralisation of a soluble ligand, receptor activation or blockade), the measure of Fc-associated functions (e.g. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC; complement-dependent cytotoxicity, CDC; complement activation).[30]

In a second step, it should be determined whether additional ***in vivo*** nonclinical work is necessary. If an ***in vivo*** study is highly recommended, the focus of the study depends on the need for additional information, and the availability of a relevant animal model. Factors to be considered when the need for additional ***in vivo*** nonclinical studies is evaluated include but are not restricted to the presence of relevant quality attributes that have not been detected in the reference product (e.g. new post-translational modification structure, which could modify the immunogenicity of the product), the presence of quality attributes in significantly different amounts than those measured in the reference product, the rele- vant differences in formulation (e.g. use of excipients not widely used for mAbs).[30]

Finally, comparative clinical studies between the biosimilar and the reference medicinal product should always be conducted. The comparison of the PK properties of the biosimilar product and the reference medicinal product forms is normally the first step of a biosimilar mAb development. PK studies can be also combined with PD endpoints if available. This could add valuable information for the overall comparability exercise. If dose comparative and highly sensitive PD studies cannot be performed convincingly showing comparability in a clinically relevant manner, similar clinical efficacy between the similar and the reference product should be demonstrated in adequately powered equivalence trials.[30] Clinical safety is important throughout the clinical development programme and is captured during initial PK and/or PD evaluations and also as part of the pivotal clinical study establishing comparability. Care should be given to compare the type, severity and frequency of the adverse reactions between the biosimilar mAb and the reference, particularly those described for the reference product. Systematic and comparative evaluation and discussion of immunogenicity is important, due to clinical consequences like loss of efficacy and also likely resistance against further treatment with the reference mAb.[30] The Agency's evaluations do not include recommendations on whether a biosimilar should be used interchangeably with its reference medicine. For questions related to switching from one biological medicine to another, patients should speak to their doctor and pharmacist.

For the FDA, the purpose of a biosimilar development programme is to support a demonstration of 'biosimilarity' between a proposed product and a reference product including an assessment of the effects of any observed differences between the products, but not to independently establish the safety and effectiveness of the proposed product.[31] As for the EMA, the stepwise approach should start with extensive structural and functional characterisation of both the proposed product and the reference product, which serves as the foundation of a biosimilar development programme. The sponsor should then consider the role of animal data in assessing toxicity and, in some cases, in providing additional support for demonstrating biosimilarity and in contributing to the immunogenicity assessment. The sponsor should then conduct comparative human PK studies, and PD studies if there is a clinically relevant PD measure, in an appropriate study population.[31] If the proposed product meets the statutory requirements for licensure as a biosimilar product under Public Health Service Act based on, among other things, data derived from a clinical study sufficient to demonstrate safety, purity and potency in an appropriate condition of use, the potential exists for the biosimilar product to be licensed for one or more additional conditions of use for which the reference product is licensed. Such scientific justification for extrapolation should be addressed as the mechanism(s) of action in each condition of use for which licensure is sought, the PK and bio-distribution of the product in different patient populations, differences in expected toxicities in each condition of use and patient population and any other factor that may affect the safety or efficacy of the product in each condition of use and patient population for which licensure is sought.[31]

The World Health Organization (WHO) has also recognised that the approach established for generic medicines is not suitable for development, evaluation and licensing of Similar Biotherapeutic Products (SBPs).[32] Similar to the EMA and FDA, the WHO advocates a stepwise approach for the licensing of an SBP that depends on demonstrated similarity in quality, nonclinical and clinical parameters to a suitable Reference Biotherapeutic Product (RBP). The RBP must be an innovator product of similar active substance, with the same dosage form and route of administration, licensed on the basis of a full registration dossier. The comparability exercise between the SBP and the RBP in the quality part represents an additional element to the

© 2013 John Wiley & Sons Ltd

'traditional' full quality dossier. Nonclinical evaluation of new biotherapeutics normally encompasses a spectrum of PD, PK and toxicological studies. Clinical evaluation is also via a stepwise procedure, beginning with PK and PD studies followed by pivotal clinical trials, although in certain cases, comparative PK/PD studies may suffice. Similar efficacy (equivalence designs) will usually have to be demonstrated; however, non-inferior study design may be considered if appropriately justified.[32] Safety data should be obtained in a sufficient number of patients, preferably in a comparative design. Pre-licensing safety data obtained from clinical trials can be expected to detect frequent and short-term adverse events/reactions; however, additional post-marketing monitoring of an SBP will be necessary. Immunogenicity should be investigated before human used. Extrapolation of efficacy and safety data to other indications may be possible if certain prerequisites are met, e.g. the clinically relevant mode of action and/or involved receptor(s) are the same, and no unique/additional safety issues are expected for the extrapolated indication(s).[32]

CHALLENGES IN CLINICAL TRIALS DESIGN

FDA: non-inferiority trials (Table 1)

The FDA recommends that the manufacturer conducts a non-inferiority study with a two-sided test with the null hypothesis being that the biosimilar product is inferior to the reference drug based on a pre-specified equivalence margin.[31] The margins should be scientifically supported by available data to allow clinically meaningful differences in safety and efficacy to be detected. Under certain circumstances, the FDA would allow a one-sided non-inferiority design, which would generally require a smaller sample size than a two-sided trial.

Superiority trials attempt to determine if the experimental group is better than the control. The intent of an equivalence design is to see if the new treatment is as good as the comparator or if it falls within a predefined clinical margin of effectiveness.[33] Non-inferiority trials are a hybrid of these two former designs because they can simultaneously test two hypotheses pertaining to the new drug and the control group.[34] The first hypothesis is tested, namely, if the new treatment is at least non-inferior to the control. If it is, the superiority hypothesis can then be evaluated. If the new therapy is neither superior nor equivalent, then it is highly likely to be inferior relative to the a priori trial criteria. Non-inferiority trials require that a non-inferiority margin be established, which is analogous to the d required in equivalence trials.[34, 35]

EMA: equivalence trials (Table 1)

The EMA has a preference for adequately powered randomised, parallel-group equivalence trials. The null hypothesis in equivalence trials is that the two treatments are not equivalent (either better or worse) and the alternative hypothesis is that they are equivalent. Therefore, the intent of an equivalence trial is to reject the null hypothesis of non-equivalence and accept the alternative hypothesis that the treatments are indeed equivalent.[36, 37] In an equivalence trial, it is only possible to assess for equivalence. Superiority or inferiority cannot be tested. The determination of sample size in an equivalence trial is similar to that of a superiority design with one major difference. The former design must incorporate an equivalence margin, often termed d, into the sample size calculation. This term d is also called the 'minimally clinically important difference' and has been defined as the difference that physicians or patients are willing to accept between two competing therapies before they deem them to be clinically different.[33]

CLINICAL DATA

Erythropoietin (Table 2)

One of the first approved biosimilar was HX575 (Epoetin alfa) in August 2007, which mimics EPO. Several biosimilars have been produced and have been tested in clinical trials (Abseamed, Medice Arzneimittel Putter, Iserlohn, Germany; Binocrit, Sandoz GmbH, Kundl, Austria; Epoetin alfa Hexal, Hexal Biotech, Holkirchen, Germany). HX575 has the same amino acid sequence as the reference product (Eprex, Erypo, Janssen-Cilag, New York, NY, USA), but has a greater number of phosphorylated high mannose-6-phosphate glycans, and lower levels of N-glycolylneuraminic acid and diacetylated neuraminic acids.[38] The pivotal intravenous (IV) PK/PD study compared HX575 and epoetin alfa (both 100 IU/kg) three times weekly for 4 weeks.[39] The two products could be considered pharmacokinetically bioequivalent if the 90% Cis of HX575 epoetin area under curve (AUC) were within 80–125% of the reference product, and pharmacodynamically bioequivalent if the 90% CI for the AUEC haemoglobin ratio was within 96.8–103.2%. Based on these criteria, the hematopoietic profiles of HX575 and epoetin alpha were similar.[39] However, after only a single IV dose, some PK differences were noted, as demonstrated by the 18% lower AUC 0–12 h after HX575 vs. epoetin alfa administration.[39] The 10% reduction in exposure, as assessed by changes in HX575 AUC observed in this study, together with the more complicated manufac-

ª 2013 John Wiley & Sons Ltd

Table 1 | Clinical trials design

Non-inferiority trials	Equivalence trials
Requested by the FDA	Requested by the EMA
Hybrid of equivalence trials and superiority trials	Opposite of superiority trials
Null hypothesis: biosimilar inferior to the reference drug	Null hypothesis: two drugs are not equivalent
Alternative hypothesis: biosimilar superior to the reference drug	Alternative hypothesis: drugs are equivalent
Non-inferiority margin needs to be established Analogous to the *d* of equivalence trials	Equivalence margin (termed *d*) needs to be established, critical because of its direct effect on sample size
Efficiency: equivalence, inferiority and superiority tested	Only assess equivalence. Superiority or inferiority cannot be tested

turing process of biopharmaceuticals, further supports EMA guidance that PK profile alone is insufficient to support the similar efficacy and safety of two biotechnology-derived medicinal products.[21]

One maintenance study in clinically stable adult dialysis patients was conducted with HX575.[40] HX575 and epoetin alfa are considered to be clinically equivalent if the 95% CI of the haemoglobin difference was within the pre-specified equivalence limit (0.5 g/dL). Based on this criterion, HX575 was deemed equivalent to epoetin alfa. The haemoglobin difference was 0.084 g/dL (95% CI —0.170 to 0.338). As part of post-authorisation risk management plans required by the EMA, an open-label, prospective single-arm study was conducted on more than 1500 patients with chronic kidney disease.[41] Safety was assessed in the full patient population and was reported to be in line with expectations, with no patient developing pure red cell aplasia. None of the pre-registration IV epoetin biosimilar studies had reported the presence of neutralising anti-epoetin antibodies. However, the immunogenicity risk associated with biosimilar epoetins could not be excluded[42] and the evaluation of subcutaneous HX575 has reported that two patients developed neutralising anti-epoetin antibodies in the HX575 arm.[7] These results were reinforced by the study of 30 patients treated with subcutaneous biosimilar EPO who developed a sudden loss of efficacy in Thailand; sera from 23 of 30 patients were positive for neutralising anti-epoetin antibodies.[43]

Trials with other biosimilars, including SB309 (Epoetin zeta) with Retacrit (Hospira, Lake Forest, IL, USA) and Silapro (Stada, Bad Vilbel, Germany), have been completed and have led to their approval in 2007.

Granulocyte colony-stimulating factor (Table 2)

The biosimilar granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) XM02 (Ratiograstim, ratiopharm GmbH, Ulm, Germany; Tevagrastim, Teva Generics GmbH, Philadelphia, PA, USA; and Biograstim, CT Arzeimittel, Ulm, Germany) was fully approved in 2008 by the EMA for all indications of the reference filgrastim (Neupogen, Amgen, Thousand Oaks, CA, USA): chemother- apy-induced neutropenia, mobilisation of stem cells in the autologous and allogeneic settings, agranulocytosis and HIV-related neutropenia.[44] A recent prospective cohort study has explored the efficacy and safety of PBSC mobilisation by either biosimilar G-CSF or refer- ence G-CSF.[45] In this pilot study, the efficacy of the G-CSF biosimilar XM02 was similar for yield and engraftment as well as for the frequency of side effects in the context of allo-stem cell transplantation when com- pared with the reference G-CSF.[45]

Another direct comparison has been done between the G-CSF biosimilar Ratiograstim and its originator G-CSF Neupogen.[46] Data were retrospectively collected from 154 consecutive patients undergoing peripheral blood stem cell harvest between January 2009 and December 2011 using the biosimilar G-CSF. One hun- dred and thirty-one consecutive patients from the pre- ceding 3 years, who had received Neupogen, were used as controls. There was no difference between the two groups regarding CD34 predictors, total number of CD34+ stem cells collected, number of days required for collection and time to engraftment.[46]

CD20 specific mAbs (Table 2)

Rituximab (MabThera, Roche, Boulogne-Billancourt, France/Rituxan, Biogen Idec, Weston, FL, USA) is currently indicated for the treatment of patients with non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia, as well as rheumatoid arthritis (RA) and other autoimmune conditions. The proposed biosimilar product, GP2013, was produced in-house at Sandoz Biopharmaceuticals. GP2013 was shown to be physico-chemically highly similar to originator rituximab at the level of primary and higher order structure,

a 2013 John Wiley & Sons Ltd

Table 2 | Biosimilars approved by the EMA

INN (International Nonproprietary Name)	Originator	Molecule	Brand name	Manufacturer	EU licence date
Epoetin alpha	Eprex	HX575	Abseamed	Medice Azneimittel Putter GmbH	August 28, 2007
			Binocrit	Sandoz GmbH	
			Epoetin *a*Hexal	Hexal AG	
Epoetin Zeta	Eprex	SB 309	Retacrit	Hospira enterprisesB.v.	December 18, 2007
			Silapo	STADA Arzneimittel AG	
Filgrastim (G-CSF)	Neupogen	XM02	Biograstim	CT Arzeimittel	September 15, 2008
			Filgrastim Ratiopharm	Ratiopharm GmbH	
			Ratiograstim	Ratiopharm GmbH	
			Tevagrastim	TevaGenerics GmbH	
Filgrastim (G-CSF)	Neupogen	EP2006	Filgrastim Hexal	Hexal AG	February 6, 2009
			Zarzio	Sandoz GmbH	
Filgrastim (G-CSF)	Neupogen	PLD108	Nivestim	HospiraUKlimited	June 8, 2010
Somatropine	Genotropin		Omnitrope	Sandoz GmbH	April 12, 2006
Somatropine	Humatrope		Valtropin	BioPartners GmbH	April 24, 2006 (withdrawn on May 10, 2012 for commercial reasons)

post-translational modifications and size variants. An extensive functional characterisation package indicated that GP2013 has the same biological properties as the originator rituximab.[47]

Interferons

A retrospective cohort study was conducted in brazilian patients with HCV genotypes 2 or 3 infection to compare the sustained virological response (SVR) rates following treatment with biosimilar standard interferon (IFN) plus ribavirin (RBV) vs. Peg-IFN plus RBV.[48] In patients with HCV genotypes 2 or 3 infection, a higher SVR was observed in patients receiving Peg-IFN plus RBV related to patients treated with biosimilar standard IFN plus RBV. Despite the limitations due to the retrospective nature of this study, it shows a lack of efficiency of biosimilar IFN in comparison with Peg-IFN. This provides an example of clinical trial's importance in assessing biosimilars.

Tumour necrosis factor antagonists (Table 3)

The infliximab (INX)'s biosimilar has been recently evaluated in rheumatologic diseases. CT-P13 is an IgG1 chimeric human-murine mAb biosimilar to INX[49] developed by CELLTRION INC (Remsima, Celltrion Inc, Incheon, Korea) or HOSPIRA (Inflectra, Hospira, Lake Forest, CA, USA). CT-P13 is produced in the same type of cell line (Sp2/0-AG1 purchased from ATCC) and has an identical amino acid sequence to INX. CT-P13 and INX have demonstrated comparable *in vitro* primary PDs in a range of studies.[50] CT-P13 and INX showed comparable binding affinities to monomeric and trimeric forms of human tumour necrosis factor alpha (hTNF*a*), transgenic mouse hTNF*a* (tmhTNF*a*) expressed by Jurkat cells and to Fc*c* receptors and FcRn. They also had comparable hTNF*a* neutralising activity against a TNF*a* sensitive mouse sarcoma cell line (WEHI-164). CT-P13 and INX are also comparable in terms of the lack of binding activity to human TNF*b* and TNF*a* from a range of different species known not to bind to infliximab, relative binding affinities to complement protein C1q and complement-dependent cytotoxicity effects and apoptotic effects against a Jurkat T-cell line expressing tmhTNF*a*. There were comparable cytotoxic activities when evaluating antibody-dependent cellular cytotoxicity evaluation of human peripheral blood mononuclear cells against tmhTNF-Jurkat T cells, further demonstrating biosimilarity of CT-P13 and INX. Highly comparable human tissue cross-reactivity results have also been observed for biotinylated CT-P13 and INX.

Ankylosing spondylitis (AS) patients were randomised to receive 5 mg/kg of CT-P13 (Remsima) (n = 125) or INX (n = 125) in a phase 1 randomised, double-blind, multicentre, multinational, parallel-group study.[51]

CT-P13 and INX were shown to be equivalent in terms of AUC and C_{max}, in patients with active AS. Clinical effi-

a 2013 John Wiley & Sons Ltd

Table 3 | Anti-TNF biosimilars

Originator	Biosimilar	Manufacturer	Stage of development	Patients	Main findings
Infliximab	CTP13	Celltrion	Phase 1 complete	125 AS	PK, efficacy and safety profiles equivalent to originator
			Phase 3 complete	302 RA	Efficacy, safety, PK profile and immunogenicity equivalent to originator
	CTP13	Hospira	Phase 3 complete	Unknown	Unpublished
Adalimumab	B1695501	Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals	Phase 1 complete	193 healthy subjects	Unpublished
	PF-06410293	Pfizer	Phase 1	210 healthy subjects	Unpublished
Etanercept	HD203	Hanwha chemical	Phase 1 complete	37 healthy volunteers	Safe and well tolerated; similar bioavailability as originator
			Phase 3	300 RA (estimated)	Unpublished
	TuNEX	Mycenax Biotech	Phase 1 complete	24 healthy patients	Unpublished
			Phase 3	RA	Unpublished
	LBEC0101	LG Life Sciences	Phase 1 complete	36 Healthy subjects	Unpublished
	Avent	Avesthagen	Pre-clinical	Mice	Same profile as the originator; effective in preventing arthritis in a mice model
	PR X 106	Protalix Biotherapeutics	Pre-clinical	Mice (CIA)	Same amino acid sequence; improve clinical arthritis parameters

AS, ankylosing spondylitis; RA, rheumatoid arthritis.

cacy endpoints, including ASAS20 and ASAS40 responses, were highly similar between CT-P13 and INX groups. CT-P13 was well tolerated with an immunogenicity and safety profile comparable to that of INX up to week 30.[51]

A phase III randomised, double-blind, multicentre, multinational, parallel-group study was conducted in RA patients with active disease despite methotrexate (MTX) treatment (12.5–25 mg/week).[52] They were randomised to receive 3 mg/kg of CT-P13 (Remsima) (n = 302) or INX (n = 304) with MTX and folic acid to compare the efficacy and safety of INX and CT-P13.[52]

CT-P13 demonstrated equivalent efficacy to INX at week 30, with a comparable PK profile and immunogenicity. CT-P13 was well tolerated, with a safety profile comparable to that of INX.[52]

Anti-TNF therapy has changed in treating inflammatory bowel disease (IBD) refractory to standard medications. Recently, the European Crohn's and Colits Organization position statement concluded that a biosimilar proven effective and safe for one indication may not necessarily be effective and safe for a second indication for which the reference biological has been shown to be safe and effective.[53] Specific evidence obtained in patients with IBD should be required to establish efficacy and safety for this specific indication, because experience with currently licensed biological medicines has already shown that clinical efficacy in IBD cannot be predicted by effectiveness in other indications, such as RA.[54] Post-marketing collection of data in both children and adults is necessary to confirm safety by recording less common but important potential adverse effects, as well as identifying any increase in frequency of predictable adverse events contingent on wider access to treatment.

Despite this position statement on 27 June 2013, the Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) adopted a positive opinion, recommending the granting of a marketing authorisation for the medicinal product Inflectra, 100 mg powder for concentrate for solu-

© 2013 John Wiley & Sons Ltd

tion for infusion intended for the treatment of RA, adult Crohn's disease, paediatric Crohn's disease, ulcerative colitis, paediatric ulcerative colitis, AS, psoriatic arthritis and psoriasis.[55] A pharmacovigilance plan for Inflectra will be implemented as part of the marketing authorisation.

Other biosimilars of monoclonal antibodies are under development (Table 3). Etanercept or its biosimilars (HD203, Hanwha Chemical, Seoul, Korea; TuNEX, Mycenax Biotech, Miaoli, Taiwan; LBEC0101, LG Life Sciences, Seoul, Korea) were subcutaneously injected to the periumbilical area of healthy volunteers in a randomised, open-label, single-dose, active-controlled, two-sequence, crossover study.[56] In this select group of Korean healthy male volunteers, the reference drug and the test biosimilar met the standard criteria for assuming bioequivalence as defined by Korean regulatory authorities. Because the reference drug is a biological product, further trials for assessment of its efficacy are still required by Korean authorities.[56] A single subcutaneous injection of HD203 or Enbrel into healthy volunteers appeared to be safe and well tolerated. Comparative PKs demonstrated that reconstituted lyophilised HD203 has bioavailability similar to that of Enbrel.[57]

Adalimumab and it biosimilar B1695501 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticials, Ingelhein, Germany) were also compared in a phase 1 clinical trial in healthy subjects. However, no data are available on the bioequivalence of adalimumab biosimilars in human diseases.

CONCLUSION

The use of biosimilars of monoclonal antibodies may dramatically increase in a near future, mainly due to cost savings. Recent clinical trials performed on RA and AS patients have established the equivalent efficacy and safety of INX biosimilars. Hospira's Inflectra (INX) was the first biosimilar monoclonal antibody to receive positive opinion from EMA's CHMP for RA, IBD and plaque psoriasis on June 27, 2013.

We will need to overcome patients and physicians' beliefs: the fear of low biosimilar quality, a less efficiency and safety for the patient, the concern about extrapolation for an indication not clinically tested in biosimilar development, or the interchangeability between a biosimilar and its originator product that will be discussed and decided at the country level, as well as automatic substitution by the pharmacist and switching by the treating physician.[9] Upcoming post-marketing studies will assess biosimilars' weaknesses in IBD in relation to extrapolation, switch, interchangeability and immunogenicity. Naming of biosimilars remains a matter of debate as it may influence their prescription. The next step may be biobetter antibodies that target the same validated epi- tope as a marketed antibody, but have been genetically modified to enhance their PKs properties, e.g. optimised glycosylation profiles to enhance effector functions or the exchange of Fc domains to increase the serum half--life or their ADCC activity (Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity).[58]

AUTHORSHIP

Guarantor of the article: Laurent Peyrin-Biroulet.
Author contributions: All authors wrote the paper and approved the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENT

Declaration of personal interests: LPB, consulting and/or lecture fees from Merck, Abbott, Janssen, Genentech, Mitsubishi, Ferring, Norgine, Tillots, Vifor, Shire, Therakos, Pharmacosmos. Pil`ege, BMS, UCB-pharma, Hospira, Takeda; the other authors declare no conflict of interest.
Declaration of funding interests: None.

REFERENCES

1. Kr€amer I. Pharmacy and pharmacology of biosimilars. *J Endocrinol Invest* 2008; 31: 479–88.
2. Schneider CK, Kalinke U. Toward biosimilar monoclonal antibodies. *Nat Biotechnol* 2008; 26:985–90.
3. McCamish M, Woollett G. The rise of the biosimilar. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2012; 5:597–9.
4. Malik NN. Controlling the cost of innovative cancer therapeutics. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6: 550–2.
5. 2010 report generic savings GPhA. Available at: http://www.prescriptionaccess.org/2010_Report_Generic_Savings_GPhA.pdf. Accessed July 10, 2013.
6. Congressional budget office cost estimate. Available at: http://www.cbo.gov/sites/default/files/cbofiles/ftpdocs/94xx/doc9496/s1695.pdf. Accessed July 10, 2013.
7. Jelkmann W. Biosimilar epoetins and other 'follow-on' biologics: update on the European experiences. *Am J Hematol* 2010; 85: 771–80.
8. Mellstedt H, Niederwieser D, Ludwig H. The challenge of biosimilars. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol Esmo* 2008; 19: 411–9.
9. Weise M, Bielsky M-C, De Smet K, *et al.* Biosimilars: what clinicians should know. *Blood* 2012; 120: 5111–7.
10. Quality considerations in demonstrating biosimilarity to a reference protein product. Available at: http://www.fda.

ª 2013 John Wiley & Sons Ltd

gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM291134.pdf. Accessed July 11, 2013.
11. Schellekens H. Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1:457–62.
12. Schellekens H, Ryff J-C. 'Biogenerics': the off-patent biotech products. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 119–21.
13. Zelenetz AD, Ahmed I, Braud EL, *et al.* NCCN Biosimilars White Paper: regulatory, scientific, and patient safety perspectives. *J Natl Compr Cancer Netw Jnccn* 2011; 9(Suppl. 4): S1–22.
14. Kuhlmann M, Covic A. The protein science of biosimilars. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc – Eur Ren Assoc* 2006; 21(Suppl. 5): v4–8.
15. Crommelin D, Bermejo T, Bissig M, *et al.* Biosimilars, generic versions of the first generation of therapeutic proteins: do they exist? *Contrib Nephrol* 2005; 149: 287–94.
16. Crommelin DJA, Storm G, Verrijk R, *et al.* Shifting paradigms: biopharmaceuticals versus low molecular weight drugs. *Int J Pharm* 2003; 266: 3–16.
17. Schiestl M, Stangler T, Torella C, *et al.* Acceptable changes in quality attributes of glycosylated biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol* 2011; 29: 310–2.
18. McCamish M, Woollett G. The state of the art in the development of biosimilars. *Clin Pharmacol Ther* 2012; 91: 405–17.
19. GPhAcomments. Available at: http://www.elsevierbi.com/~/media/Supporting%20Documents/The%20Pink%20Sheet/74/17/GPhAcomments.pdf. Accessed July 12, 2013.
20. Chow S-C, Wang J, Endrenyi L, *et al.* Scientific considerations for assessing biosimilar products. *Stat Med* 2013; 32: 370–81.
21. Guideline on similar biological medicinal products. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003517.pdf. Accessed July 11, 2013.
22. EMA procedural advice for users of the centralised procedure for generic/hybrid applications. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Regulatory_and_procedural_guideline/2009/10/WC500004018.pdf. Accessed July 11, 2013.
23. CHAPTER 1 marketing authorisation rev, 2005. Available at: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-2/a/vol2a_chap1_2005-11_en.pdf. Accessed July 11, 2013.
24. Test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002824.pdf. Accessed July 11, 2013.
25. Step 5 preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002828.pdf. Accessed July 11, 2013.
26. Quality of biotechnological products: stability testing of biotechnological/biological products. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002803.pdf. Accessed July 11, 2013.
27. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003920.pdf. Accessed July 11, 2013.
28. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003953.pdf. Accessed July 11, 2013.
29. Niederwieser D, Schmitz S. Biosimilar agents in oncology/haematology: from approval to practice. *Eur J Haematol* 2011; 86: 277–88.
30. Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies – non-clinical and clinical issues. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/06/WC500128686.pdf. Accessed July 11, 2013.
31. Scientific considerations in demonstrating biosimilarity to a reference product. Available at: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM291128.pdf. Accessed July 11, 2013.
32. WHO expert committee on biological standardization. Available at: http://www.who.int/biologicals/areas/biological_therapeutics/BIOTHERAPEUTICS_FOR_WEB_22APRIL2010.pdf. Accessed July 11, 2013.
33. Dranitsaris G, Dorward K, Hatzimichael E, *et al.* Clinical trial design in biosimilar drug development. *Invest New Drugs* 2013; 31: 479–87.
34. Schumi J, Wittes JT. Through the looking glass: understanding non-inferiority. *Trials* 2011; 12: 106.
35. Rothmann M, Li N, Chen G, *et al.* Design and analysis of non-inferiority mortality trials in oncology. *Stat Med* 2003; 22: 239–64.
36. Ware JH, Antman EM. Equivalence trials. *N Engl J Med* 1997; 337: 1159–61.
37. Blackwelder WC. 'Proving the null hypothesis' in clinical trials. *Control Clin Trials* 1982; 3: 345–53.
38. Brinks V, Hawe A, Basmeleh AHH, *et al.* Quality of original and biosimilar epoetin products. *Pharm Res* 2011; 28: 386–93.
39. S€orgel F, Thyroff-Friesinger U, Vetter A, *et al.* Bioequivalence of HX575 (recombinant human epoetin alfa) and a comparator epoetin alfa after multiple intravenous administrations: an open-label randomised controlled trial. *BMC Clin Pharmacol* 2009; 9: 10.
40. Haag-Weber M, Vetter A, Thyroff-Friesinger U, *et al.* Therapeutic equivalence, long-term efficacy and safety of HX575 in the treatment of anemia in chronic renal failure patients receiving hemodialysis. *Clin Nephrol* 2009; 72: 380–90.
41. H6rl WH, Locatelli F, Haag-Weber M, *et al.* Prospective multicenter study of HX575 (biosimilar epoetin-*a*) in patients with chronic kidney disease applying a target hemoglobin of 10–12 g/dl. *Clin Nephrol* 2012; 78: 24–32.
42. Mikhail A, Farouk M. Epoetin biosimilars in Europe: five years on. *Adv Ther* 2013; 30: 28–40.
43. Praditpornsilpa K, Tiranathanagul K, Kupatawintu P, *et al.* Biosimilar recombinant human erythropoietin induces the production of neutralizing antibodies. *Kidney Int* 2011; 80: 88–92.
44. European Medicines Agency. Assessment report for ratiograstim. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR__Public_assessment_report/human/000825/WC500047793.pdf. Accessed July 15, 2013.
45. Schmitt M, Xu X, Hilgendorf I, *et al.* Mobilization of PBSC for allogeneic transplantation by the use of the G-CSF biosimilar XM02 in healthy donors. *Bone Marrow Transplant* 2013; 48: 922–5.
46. Publicover A, Richardson DS, Davies A, *et al.* Use of a biosimilar granulocyte colony-stimulating factor for peripheral blood stem cell mobilization: an analysis of mobilization and engraftment. *Br J Haematol* 2013; 162: 107–11.

47. Visser J, Feuerstein I, Stangler T, *et al.* Physicochemical and functional comparability between the proposed biosimilar rituximab GP2013 and originator rituximab. *Biodrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther* 2013 (in press). PMID: 23649935.
48. Vigani AG, Gon,cales ES, Pavan MHP, *et al.* Therapeutic effectiveness of biosimilar standard interferon versus pegylated interferon for chronic hepatitis C genotypes 2 or 3. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis* 2012; 16: 232–6.
49. Therapy: biosimilar CT-P13 comparable to infliximab in active RA. *Nat Rev Rheumatol* 2013; 9: 382.
50. Appendix A PLANETAS study Ann Rheum Dis, 2013. Available at: http://ard.bmj.com.gate2.inist.fr/content/suppl/2013/05/16/annrheumdis-2012-203091.DC1/annrheumdis-2012-203091supp_appendixA.pdf. Accessed July 11, 2013.
51. Park W, Hrycaj P, Jeka S, *et al.* A randomised, double-blind, multicentre, parallel-group, prospective study comparing the pharmacokinetics, safety, and efficacy of CT-P13 and innovator infliximab in patients with ankylosing spondylitis: the PLANETAS study. *Ann Rheum Dis* 2013 (in press). PMID: 23687259.
52. Yoo DH, Hrycaj P, Miranda P, *et al.* A randomised, double-blind, parallel-group study to demonstrate equivalence in efficacy and safety of CT-P13 compared with innovator infliximab when coadministered with methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis: the PLANETRA study. *Ann Rheum Dis* 2013 (in press). PMID: 23687260.
53. Danese S, Gomollon F; Governing Board and Operational Board of ECCO. ECCO position statement: the use of biosimilar medicines in the treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *J Crohns Colitis* 2013; 7: 586-589.
54. Gecse KB, Khanna R, van den Brink GR, *et al.* Biosimilars in IBD: hope or expectation? *Gut* 2013; 62: 803–7.
55. EMA inflectra initial MAA – summary of opinion. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Summary_of_opinion_-_Initial_authorisation/human/002778/WC500144831.pdf. Accessed July 11, 2013.
56. Gu N, Yi S, Kim T-E, *et al.* Comparative pharmacokinetics and tolerability of branded etanercept (25 mg) and its biosimilar (25 mg): a randomized, open-label, single-dose, two-sequence, crossover study in healthy Korean male volunteers. *Clin Ther* 2011; 33: 2029–37.
57. Yi S, Kim SE, Park M-K, *et al.* Comparative pharmacokinetics of HD203, a biosimilar of etanercept, with marketed etanercept (Enbrel®): a double-blind, single-dose, crossover study in healthy volunteers. *Biodrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther* 2012; 26: 177–84.
58. Beck A. Biosimilar, biobetter and next generation therapeutic antibodies. *MAbs* 2011; 3: 107–10.

ª 2013 John Wiley & Sons Ltd

Author's personal copy

Autoimmunity Reviews 14 (2015) 231–245

Contents lists available at ScienceDirect

Autoimmunity Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/autrev

Review

Systematic review: New serological markers (anti-glycan, anti-GP2, anti-GM-CSF Ab) in the prediction of IBD patient outcomes

J. Bonneau [a], C. Dumestre-Perard [b], M. Rinaudo-Gaujous [a], C. Genin [a], M. Sparrow [c], X. Roblin [d], S. Paul [a,*]

[a] Laboratory of Immunology and Immunomonitoring, CIC 1408 INSERM, GIMAP EA3064, University Hospital of Saint-Etienne, France
[b] Laboratory of Immunology, UMR 5163, CNRS-UJF, University of Grenoble, France
[c] Department of Gastroenterology, The Alfred Hospital, Melbourne, Australia
[d] Department of Gastroenterology, University of Saint-Etienne, France

article info

Article history:
Received 1 November 2014
Accepted 8 November 2014
Available online 13 November 2014

Keywords:
IBD
Crohn's disease
Ulcerative colitis
Glycan
GP2
GM-CSF

Abstract

Traditionally, IBD diagnosis is based on clinical, radiological, endoscopic, and histological criteria. Biomarkers are needed in cases of uncertain diagnosis, or to predict disease course and therapeutic response. No guideline rec- ommends the detection of antibodies (including ASCA and ANCA) for diagnosis or prognosis of IBD to date. How- ever, many recent data suggest the potential role of new serological markers (anti-glycan (ACCA, ALCA, AMCA, anti-L and anti-C), anti-GP2 and anti-GM-CSF Ab). This review focuses on clinical utility of these new serological markers in diagnosis, prognosis and therapeutic monitoring of IBD. Literature review of anti-glycan, anti-GP2 and anti-GM-CSF Ab and their impact on diagnosis, prognosis and prediction of therapeutic response was performed in PubMed/MEDLINE up to June 2014. Anti-glycan, anti-GP2 and anti-GM-CSF Ab are especially associated with CD and seem to be correlated with complicated disease phenotypes even if results differ between studies. Although anti-glycan Ab and anti-GP2 Ab have low sensitivity in diagnosis of IBD, they could identify a small number of CD patients not detected by other tests such as ASCA. Anti-glycan Abs are associated with a progression to a more severe disease course and a higher risk for IBD-related surgery. Anti-GP2 Ab could particularly contribute to better stratify cases of pouchitis. Anti-GM-CSF Ab seems to be correlated with disease activity and could help predict relapses. These new promising biomarkers could particularly be useful in stratification of patients accord- ing to disease phenotype and risk of complications. They could be a valuable aid in prediction of disease course and therapeutic response but more prospective studies are needed.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction ... 232
2. Methodology ... 232
3. Results ... 234
3.1. Role of anti-glycan, anti-GP2 and anti-GM-CSF Ab in IBD diagnosis ... 234
3.1.1. Anti-glycan Ab ... 234
3.1.2. Anti-GP2 Ab ... 234
3.1.3. Anti-GM-CSF Ab ... 234
3.2. Role of anti-glycan, anti-GP2 and anti-GM-CSF Ab in disease stratification and prognosis ... 234
3.2.1. Association with disease location, disease behavior, age at diagnosis and duration of the disease ... 234
3.2.2. Association with risk of complications and surgery ... 240
3.2.3. Association with disease activity ... 240
3.2.4. Association with treatment ... 240
3.2.5. Behavior of Ab over time ... 241
3.3. Other antibody associations ... 241
3.3.1. With clinical and genetic characteristics ... 241
3.3.2. With other markers ... 242

* Corresponding author at: Laboratoire d'Immunologie, CHU de Saint-Etienne, 42023 Saint-Etienne, France.
E-mail address: stephane.paul@chu-st-etienne.fr (S. Paul).

http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2014.11.004
1568-9972/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Author's personal copy

4. Conclusions 242
Take-home messages 242
References 242

1. Introduction

Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are inflammatory bowel diseases (IBD) which are chronic diseases of the gastrointestinal tract. Although the etiology of IBD is still only partially understood, three factors seem to be involved in the pathogenesis of these diseases: environment (gut flora and microbial pathogens), genetic susceptibility (predisposing factors) and dysregulation of the immune system. The presence of environmental factors in a particular genetic background will lead to the activation of an inappropriate immune response inducing destruction of the mucosa and thus an increase in intestinal permeability which is one of the mechanisms that may explain the presence of antibodies (Abs) found in IBD and which could constitute biomarkers [1–4]. Traditionally, IBD diagnosis is based on clinical, endoscopic, radiological, and histological criteria [5,6]. In some cases, treatment of IBD could fail, so it is necessary to find predictors of non-response [7]. Biomarkers are needed in cases of uncertain diagnosis, or to predict disease course and therapeutic response. Their clinical utility is based on their effectiveness in distinguishing IBD compared to other non-IBD diseases with a similar clinical presentation and in the distinction between CD and UC. Their usefulness also includes their prognostic value and their role in the monitoring of disease activity reflecting therapeutic response.

Among many known serological markers, only anti-neutrophilic cytoplasmic antibodies (ANCA) and anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) have demonstrated a diagnostic utility. Their simultaneous use improves the specificity in the distinction between CD and UC. Thus, the ASCA+/ANCA− profile has a sensitivity of about 50% and specificity of more than 90% for the diagnosis of CD [8]. However, ASCA and ANCA have many limitations, especially their moderate sensitivity. In addition, these Abs are not established predictive markers of disease activity. In one study, baseline ASCA IgA positivity significantly predicted a more relapsing disease course in pediatric CD [9]. In 279 CD patients under infliximab therapy, patients who had a serologic profile ASCA−/ANCA+ before treatment showed a trend toward a lower response to infliximab but this finding lacked significance [10]. ANCA positivity has been reported to be associated with refractory left-sided UC [11]. However, there are conflicting results among studies [12]. The need to better diagnose and stratify IBD has led investigators to search for other serological markers such as anti-microbial antigen Ab [12]. These anti-microbial antigen antibodies, including anti-*Escherichia coli* outer membrane porin C (anti-OmpC) [13], anti-I2 *Pseudomonas fluorescens* sequence [14,15], and anti-CBir1 flagellin [16], are particularly associated with distinct CD phenotypes, especially those associated with fibrostenotic and penetrating complications. However, given their low sensitivities, the role of these antibodies in both the diagnosis and prognostication of IBD remains controversial [13,17–40] (Table 1). More recently, Abs against 2 other flagellins (A4-Fla2, Fla-X) have been identified and seem to be associated with complications [41].

Besides ASCA directed against *S. cerevisiae* mannan, new anti-glycan Abs have been recently described in IBD and include: anti-chitobioside carbohydrate Ab (GlcNAc (β1, 4) GlcNAc (β)) (ACCA) IgA, anti-laminaribioside carbohydrate Ab (Glc (β1, 3) Glc (β)) (ALCA) IgG, anti-mannobioside carbohydrate Ab (Man (α, 3) Manα) (AMCA) IgG, anti-laminarin Ab (Glc (β1, 3)) 3n (Glc (β1, 6))n (anti-L), and anti- chitin Ab (GlcNAc (β1, 4))n (anti-C) IgA. The evaluation of anti-glycan Ab is possible by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (IBDX/Glycominds ®) [42]. gASCA is an improved ASCA assay based on covalently immobilized purified mannan polysaccharide, found to be comparable with conventional ASCA and more recently studied [43].

More recently, other antibodies such as anti-glycoprotein 2 (anti-GP2) Ab and anti-granulocyte macrophage colony-stimulating factor (anti-GM-CSF) Ab have been identified in IBD and may play a key role in the pathogenesis of IBD.

Glycoprotein 2 (GP2) is the major autoantigen of exocrine pancreas auto-Ab (PAB) involved in IBD [44,45]. GP2 is present on the surface of microfold (M) cells of intestinal Peyer's patches (PP), and could play an immunomodulatory role in the intestinal immune system [46–48]. GP2 can interact with FimH adhesin of enterobacteria and may introduce the presentation of these pathogens to mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) via transcytosis and plays a role in the initiation of mucosal immune responses by mediating the bacteria uptake through intestinal M cells of PP [46,48–50]. Elevated expression of GP2 has been found in intestinal biopsy samples from CD patients in contrast to UC patients [44,46]. Anti-GP2 IgG may neutralize the immunomodulatory effect of GP2, and anti-GP2 IgA may facilitate the binding of the GP2-bacteria complex to M cells and thus promotes transcytosis, which may result in an increase of bacterial load in intestinal mucosa and causes an increased inflammatory phenomenon [46,48–50]. ELISA tests have been developed for the routine determination of anti-GP2 Ab using human recombinant GP2 as solid-phase antigen [51].

Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is a cytokine that promotes myeloid cell maturation and is necessary for anti-microbial functions of myeloid cells and homeostatic responses to tissue damage. It has an important role in the regulation of intestinal mucosal damage, and in intestinal immunity and inflammatory responses [52–55]. GM-CSF therapy improved mucosal repair and could have a role in clinical improvement in CD [52–56]. Jurickova et al. showed that anti-GM-CSF Abs were produced by *lamina propria* mononuclear cells isolated from CD ileal resection specimens and that peripheral blood contains GM-CSF neutralizing capacity [57]. High levels of anti-GM-CSF Ab are associated with a reduced bioactivity of GM-CSF, of neutrophil bacterial killing, and an increase in intestinal permeability [57,58].

There are other antibodies that have been studied in IBD, such as anti-goblet cell (Gab) [59,60], anti-endothelial cell [61], anti-*Mycobacterium avium paratuberculosis* [62], anti-OmpW *Bacteroides caccae* porin [35,63], or anti-ubiquitination factor E4A [64]. They have no currently clear role in diagnosis or disease stratification and/or have been poorly studied. Besides antibodies there are other biomarkers that are currently studied in IBD such as serum matrix metalloproteinase 9, or interleukin 22 [65] and that could be promising markers but more studies are needed.

Because of low specificity and sensitivity of specific antibodies, and lack of target values, no national, European or international guidelines recommend the routine detection of antibodies (including ASCA and ANCA) for the diagnosis or prognosis of IBD to date. However, many recent data suggest the potential benefits of using new serological markers (new anti-glycan ACCA, ALCA, AMCA, anti-L, anti-C, anti-GP2 and anti-GM-CSF Ab). This review focuses on their clinical utility in the diagnosis, prognosis and therapeutic monitoring of IBD.

2. Methodology

The systematic review was performed using PubMed/MEDLINE up to June 2014. The search strategy was using the following search terms alone or in combination: Inflammatory bowel disease (IBD), Crohn's disease (CD), ulcerative colitis (UC), glycan, laminaribioside, chitobioside, mannobioside, laminarin, chitin, ASCA, gASCA, ACCA, ALCA, AMCA, anti-L, anti-C, glycoprotein 2 (GP2), and granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), antibody.

Annexes

Author's personal copy

Table 1
Prevalence, association with disease phenotype and prognosis of anti-OmpC, anti-I2 and anti-CBir1 Ab in IBD.

Ab	Presumed antigen	Prevalence data (%)				Disease phenotype/genotype	Prognosis
		role CD	UC	OGD	HC		
Anti-OmpC	Outer membrane porin C of *E. coli* [13]	17–55 [17–31]	11–31 [13,22,26,28,31,32]	5–31 [22,31]	3–11 [13,26,28]	– Disease location: ileal involvement [26], no association [21,23,24,40] – Disease behavior: complicated CD [17,19,23,26,29,36], no association [21,40], progression of disease type [24] – Surgery: association [17,23,26,29], no association [21,40] – Disease duration: longer [24,29] – Genotype: association with NOD2 variant [25]	– Risk of complications: patients positive for at least one Ab of OmpC, I2, CBir1, ASCA: progression to more aggressive disease [19] – Role in pouchitis: no association with pouch complications after IPAA [33] – Disease activity: no association [20,22,34] – Treatment: predictive factor for a need for anti-TNF [29], no association with remission under treatment [20] or with clinical response to fecal diversion [18] – Behavior over time: level globally stable over time and with change in disease activity [20]
Anti-I2 associated	*P. aeruginosa*-sequence I2 [14]	26–59 [14,17–20,24,25,30,35]	42 [35] [24,40]	15 [35]	ND	– Disease location: no association – Disease behavior: complicated CD [17,19,36], no association [40] – Surgery: association [17,24], no association [40] – Disease duration: longer [24] – Genotype: association with NOD2 variant [25]	– Risk of complications: patients positive for at least one Ab of OmpC, I2, CBir1, ASCA: progression to more aggressive disease [19] – Disease activity: no association [20] – Treatment: association with clinical response to fecal diversion [18], no association with remission under treatment [20] – Behavior over time: level globally stable over time and with change in disease activity [20]
Anti-CBir1	Gram-positive bacteria	50–56 [19,23,25,27,29,30,	6–36 [32,37]	14 [37]	8 [37]	– Disease location: ileal involvement [23,27,29,37,40] no association [40], negative association UC-like behavior [30] – Surgery: association [23,30], no association – More frequent in younger children at – Genotype: association with NOD2 variant [25,29]	– Risk of complications: patients positive for at least one Ab of OmpC, I2, CBir1, ASCA: aggressive disease [19] – Role in pouchitis: risk of pouch complications (CD, – Disease activity: no association [37] – Treatment: no change under treatment [37]

Ab: antibody, CD: Crohn's disease, UC: ulcerative colitis, OGD: other gastrointestinal diseases, HC: healthy control, ND: no data, ASCA: anti-*Saccharomyces cerevisiae* Ab, IPAA: ileal pouch-anal anastomosis.

Author's personal copy

3. Results

Characteristics of studies on new serological markers (anti-glycan Ab, anti-GP2 Ab and anti-GM-CSF Ab) in IBD are presented in Table 2.

3.1. Role of anti-glycan, anti-GP2 and anti-GM-CSF Ab in IBD diagnosis

3.1.1. Anti-glycan Ab

Prevalence and diagnostic performances of each anti-glycan Ab are reported in Tables 3 and 4 respectively. There are some variations of prevalence between studies and in different ethnic populations. In the study of Prideaux et al., none of the Asian CD patients had gASCA whereas in most studies gASCA prevalence was about 42–69% in CD [42,66–74]. Prevalence of ACCA in UC was higher in Czech patients [73] than in other studies (45% vs 0–24%) [21,42,66–69,71,72,74,75]. Prevalence of AMCA was higher in Caucasian and Asian CD patients (67% and 58% respectively vs 12–46%) [66]; and prevalence of ACCA and ALCA was higher in a CD Italian cohort in the study of Michielan et al. [21] than in other studies (52% and 76% vs 8–36% and 8–53% respectively) [21,42,66–73,75]. Indeed, in the study of Prideaux et al., Caucasian CD had higher gASCA prevalence and median levels than the Asian group [66]. There is an increased prevalence, sensitivity and specificity of ALCA for CD vs healthy controls in Greek patients compared to Caucasian populations [69].

Several studies have reported that prevalence and/or levels of gASCA were higher in CD vs controls or vs UC [42,66–71]. Prevalence and/or levels of ACCA, ALCA, AMCA, anti-L and/or anti-C were higher in CD than in UC or than in controls, with some variations between studies [21,42,66–71,75]. gASCA has the best accuracy for the diagnosis of CD vs non-IBD gastrointestinal (GI) disease controls and vs healthy controls and is the most accurate marker for the differentiation between CD and UC [43,67,68,70,71,76,77]. The combination of gASCA and pANCA had the highest discriminatory capacity for CD vs UC [43,68,71,76]. The other anti-glycan Abs have high specificity but lower sensitivity as shown in Table 4. The positivity of any anti-glycan Ab significantly increased the likelihood of CD [43,67]. The combined use of anti-glycan Ab could improve diagnosis performances as shown in Table 5 [42,67–69,71,73,76]. Furthermore, in CD patients seronegative for gASCA, 32–56% were positive for at least one of the other anti-glycan Ab [42,67–70,73,76].

Rieder et al. have evaluated the clinical utility of anti-glycan Ab in a pediatric cohort. In this pediatric population, the optimal cut-off differed compared to the adult population but prevalence of anti-glycan Ab was almost similar to prevalence in adult cohorts. Levels of gASCA and ALCA were significantly higher in pediatric CD than in UC but the prevalence was significantly higher in CD vs UC for gASCA only. The accuracy of anti-glycan Ab in the pediatric population compared to an adult cohort remained stable for the differentiation of CD vs UC but there was a decreased accuracy with an increased age at sample procurement for the discrimination of CD vs no CD. When combining the markers the specificity and positive predictive value for the differentiation of CD from other conditions increased but the sensitivity decreased [67]. Considering the age at sample procurement the accuracy of the markers compared to an adult cohort remained stable for the differentiation of CD vs UC as well as for the association with complications, need for surgery and ileal involvement [67].

Seow et al. showed that patients with isolated inflammatory colonic CD had serological profiles intermediate between CD and UC (with prevalence of anti-glycan Ab intermediate between prevalence in CD and UC) [71]. Only gASCA (IgA) and anti-L were able to differentiate isolated inflammatory colonic CD from UC and adding anti-L to gASCA and pANCA differentiated colonic CD and UC [71]. According to Papp et al., gASCA or any glycan Ab had a sensitivity of 33% and 42% with a specificity of 91% and 83% respectively for the differentiation of colonic CD and UC [43]. However, Malickova et al. found that none of anti-glycan Ab was predictive of colonic CD [73].

In one study the immunoreactivity against two major chemically synthesized oligomannose epitopes (ΣMan3 and ΣMan4) was assessed. The specificity of AΣMA was quite similar to that of ASCA (about 90%) but with lower sensitivity (40%) for CD. However, this marker was more sensitive and specific than ASCA for predicting the evolution of indeterminate colitis toward CD. 11% of ASCA negative patients were AΣMA positive. Among these patients, AΣMA was associated with colonic involvement [78].

3.1.2. Anti-GP2 Ab

Prevalence and diagnostic performances of anti-GP2 Ab are reported in Tables 3 and 4 respectively. Several studies have reported that CD patients have higher prevalence and/or levels of anti-GP2 Ab levels compared with patients with UC or healthy controls [44,47,51,79–83]. Anti-GP2 IgA and/or IgG are detected in about 21–45% of patients with CD and in 2–19% in UC [44,51,79–82,84,85]. These Ab can also be detected in celiac disease [84]. In fact, in the recent study of Gross et al., anti-GP2 IgA was found in 29% of active celiac disease patients and was able to distinguish refractory celiac disease from patients treated with a gluten-free diet [83]. Among ASCA negative CD patients, 8–24% were positive for anti-GP2 IgG and/or IgA [80,81].

3.1.3. Anti-GM-CSF Ab

Anti-GM-CSF Ab concentrations are higher in CD than in UC or unaffected controls [57,58,86–89]. At the moment there is no data on the prevalence of anti-GM-CSF Ab in IBD.

In summary, prevalence and concentrations of anti-glycan Ab are higher in CD than in UC and controls. gASCA has the best discriminatory capacity for distinction of CD vs UC but the addition of other anti-glycan Ab could improve diagnosis accuracy. Serologic anti-glycan Ab response seems to differ between ethnic populations and it is important to consider these ethnic variations for the establishment of national or international guidelines. All the anti-glycan Abs are highly specific for IBD, and in particular for CD, but with low sensitivity. In the same way, prevalence and concentrations of anti-GP2 Ab are higher in CD than in UC and controls, but the prevalence of these Ab is relatively low and they can be present in celiac disease. Levels of anti-GM-CSF Ab are also higher in CD than in UC and controls but data of prevalence are lacking. Despite their low sensitivity, these antibodies could be helpful as an additional piece of information in cases of uncertain diagnosis, particularly to distinguish CD vs UC when other diagnostic investigations are inconclusive.

3.2. Role of anti-glycan, anti-GP2 and anti-GM-CSF Ab in disease stratification and prognosis

3.2.1. Association with disease location, disease behavior, age at diagnosis and duration of the disease

Associations of anti-glycan Ab, anti-GP2 Ab and anti-GM-CSF Ab with disease phenotype characteristics are summarized in Table 6.

Patients who have an antibody response against several glycans or a higher anti-glycan Ab level have more ileal involvement, complicated behavior (stenosis or fistula), and/or need for abdominal surgery [42,43,67,68,71,72,76,77]. An increasing number of positive antibodies were also associated with perianal disease, early age of CD onset, longer disease duration [68,71] and negatively with an UC-like disease behavior [76]. Negative associations were also seen with non-stricturing, non-penetrating disease or isolated colonic involvement [43,69,71,73]. There are variations among studies about the association of each anti-glycan Ab and disease phenotype characteristics, but in most studies they are associated with ileal involvement, complicated behavior and/or IBD-related surgery [42,43,67–74,76]. A meta-analysis of Kaul et al. showed that ACCA had the highest association with complications and ASCA and ACCA were associated with the need for surgery [77].

In the same way, anti-GP2 Abs seem to be associated with distinct disease phenotypes such as ileal involvement and stricturing behavior but results differ between studies. In most studies, prevalence and/or

Annexes

Author's personal copy

Table 2
Characteristics of included studies in the systematic review on the role of new anti-glycan, anti-GP2 and anti-GM-CSF Ab in IBD diagnosis and/or disease stratification and prognosis.

Study	Country	Studied population	Ab	Studied criteria
Anti-glycan Ab				
Dotan et al. [42]	Israel	124 CD 106 UC 61 OGD 40 HC *OGD: 27 celiac disease, 20 IBS, 14 other GI diseases (colonic polyps, diverticular disease, pseudomembranous colitis, H. pylori gastritis, pancreatitis, hemorrhoids) Adult and pediatric	gASCA (IgG) ALCA (IgG) ACCA (IgA)	Diagnosis, disease phenotype, disease activity, treatment, other clinical characteristics
Ferrante et al. [76]	Belgium	913 CD 272 UC 40 IC 200 HC 113 OGD *OGD: diverticulitis, infectious colitis, ischemic colitis, pseudo-membranous colitis Adult	gASCA (IgG) AMCA (IgG) ALCA (IgG) ACCA (IgA)	Diagnosis, disease phenotype
Ferrante et al. [90]	Belgium	184 UC who underwent IPAA Adult	gASCA (IgG) AMCA (IgG) ALCA (IgG) ACCA (IgA)	Risk of pouchitis
Henckaerts et al. [74]	Belgium	874 CD 259 UC 30 IC 199 HC 113 OGD *OGD: diverticulitis, infectious colitis, ischemic colitis Adult	gASCA (IgG) AMCA (IgG) ALCA (IgG) ACCA (IgA)	Genotype, other clinical characteristics
Joossens et al. [96]	Belgium France	69 IBD families (45 multiple affected families, 24 with only 1 affected patient) 17 HC families Prospective follow-up for 54 months	ASCA AMCA (IgG) ALCA (IgG) ACCA (IgA) AΣMA	Risk of CD in IBD families
Kaul et al. [77]	NA	14 studies in the systematic review 9 studies in the meta-analysis	gASCA (IgG/IgA) AMCA (IgG) ALCA (IgG) ACCA (IgA) Anti-L (IgA) Anti-C (IgA)	Diagnosis, disease phenotype, genotype, behavior over time
Koutroubakis et al. [69]	Greece	106 CD 85 UC 29 OGD 96 HC *OGD: ischemic colitis, infectious colitis, diverticulitis Adult	gASCA (IgG) AMCA (IgG) ALCA (IgG) ACCA (IgA)	Diagnosis, disease phenotype, disease activity, treatment, other clinical characteristics
Lakatos et al. [97]	Hungary	376 CD 100 HC Adult	gASCA (IgG) AMCA (IgG) ALCA (IgG) ACCA (IgA)	Genotype
Lakatos et al. [99]	Hungary	579 CD 110 UC 100 HC 64 OGD *OGD: IBS/diverticulosis without inflammation	gASCA (IgG) AMCA (IgG) ALCA (IgG) ACCA (IgA)	Association with PAB
Malickova et al. [73]	Czech republic	116 CD 84 UC 72 HC Adult	gASCA (IgG) AMCA (IgG) ALCA (IgG) ACCA (IgA)	Diagnosis, disease phenotype
Michielan et al. [21]	Italy	60 CD 86 CD relatives 100 HC Adult	ASCA (IgG) AMCA (IgG) ALCA (IgG) ACCA (IgA)	Diagnosis, disease phenotype, Ab in unaffected relatives, other clinical characteristics
Papp et al. [43]	Hungary	557 CD 95 UC 48 OGD 100 HC *OGD: IBS/diverticulosis Adult	gASCA (IgG) AMCA (IgG) ALCA (IgG) ACCA (IgA)	Diagnosis, disease phenotype, genotype, treatment, other clinical characteristics
Prideaux et al. [66]	Australia China	21 CD 32 UC 29 HC 8 IBD relatives Adult	gASCA (IgG) AMCA (IgG) ALCA (IgG) ACCA (IgA)	Diagnosis, ethnic variations

(continued on next page)

Annexes

Author's personal copy

Table 2 *(continued)*

Study	Country	Studied population	Ab	Studied criteria
Anti-glycan Ab				
Rejchrt et al. [75]	Czech republic	89 CD 31 UC 50 HC Adult	ALCA (IgG) ACCA (IgA)	Diagnosis, disease phenotype
Rieder et al. [68]	Germany	363 CD 130 UC 74 OGD 257 non-IBD/GI *OGD: diverticulosis/-it is, infectious colitis, intestinal vasculitis, pseudo-membranous colitis, chemotherapy induced colitis, liver cirrhosis *Non-IBD/GI: no GI disorder or apparent disease Adult Prospective follow-up for 209 CD and 46 UC	gASCA (IgG) AMCA (IgG) ALCA (IgG) ACCA (IgA) Anti-L (IgA) Anti-C (IgA)	Diagnosis, disease phenotype, behavior during disease course, risk of complications
Rieder et al. [72]	Germany	149 CD Adult Subgroup of the previous study [68] prospectively followed for additional 15 months	gASCA (IgG) AMCA (IgG) ALCA (IgG) ACCA (IgA) Anti-L (IgA) Anti-C (IgA)	Predictive role of complicated behavior/surgery, disease phenotype, disease activity, behavior over time
Rieder et al. [95]	Germany	207 CD 46 UC Adult Prospective study (median follow-up: 17.4 months CD, 10.9 months UC)	gASCA (IgG) AMCA (IgG) ALCA (IgG) ACCA (IgA) Anti-L (IgA) Anti-C (IgA)	Behavior of Ab over time, diagnosis
Rieder et al. [67]	Germany	59 CD 27 UC 45 OGD Pediatric	gASCA (IgG) AMCA (IgG) ALCA (IgG) ACCA (IgA) Anti-L (IgA) Anti-C (IgA)	Diagnosis, disease phenotype, disease activity, treatment, comparison with adult cohort, other clinical characteristics
Seow et al. [71]	Canada	517 CD 301 UC 97 HC Adult and pediatric	gASCA (IgG/IgA) AMCA (IgG) ALCA (IgG) ACCA (IgA) Anti-L (IgA) Anti-C (IgA)	Diagnosis, disease phenotype
Simondi et al. [70]	Italy	116 CD 53 UC 45 OGD 51 HC *OGD: celiac disease, IBS, diverticulosis, microscopic colitis, intestinal polyposis, hepatitis, hepatic steatosis, gastritis, pancreatitis Adult	gASCA (IgG) AMCA (IgG) ALCA (IgG) ACCA (IgA)	Diagnosis, disease phenotype, other clinical characteristics
Vandewalle-El Khoury et al. [78]	France Belgium Sweden Tunisia USA	772 CD 261 UC 289 HC 43 IC	ASCA AΣMA (ΣMan3, ΣMan4)	Diagnosis, disease phenotype
Anti-GP2 Ab				
Bogdanos et al. [81]	UK Germany	169 CD 102 UC 225 HC Adult and pediatric	Anti-GP2 IgA/IgG (ELISA)	Diagnosis, disease phenotype, association with PAB, with ASCA
Bonaci-Nikolic et al. Letter to the editor [84]	Serbia	33 CD 23 UC 21 OGD (GSE) 13 HC Adult	Anti-GP2 IgA/IgG (ELISA)	Diagnosis
Gross et al. [83]	Netherlands	38 CD 40 UC 94 OGD (celiac) 51 HC Adult	Anti-GP2 IgA/IgG (ELISA)	Diagnosis, disease location
Komorowski et al. [45]	Germany	96 CD 39 UC 50 HC Adult	Anti-GP2 IgG (ELISA and IIF)	Association with PAB (IIF staining pattern)
Op de Béeck et al. Letter to the editor [79]	Belgium	164 CD 118 UC 75 OGD 100 HC *OGD: non-IBD diarrheal illness	Anti-GP2 IgA/IgG (ELISA)	Diagnosis, disease phenotype, behavior under treatment, association with PAB, with ASCA, other clinical characteristics

Annexes

Author's personal copy

Table 2 *(continued)*

Study	Country	Studied population	Ab	Studied criteria
Anti-GP2 Ab				
Pavlidis et al. Letter to the editor [82]	UK	70 CD 50 UC	Anti-GP2 IgA/IgG (ELISA)	Diagnosis, association with ASCA
Pavlidis et al. [80]	UK	225 CD 225 UC 25 OGD (IBS) 50 HC Adult Follow-up samples for 20 CD and 20 UC at various time points	Anti-GP2 IgG (ELISA)	Diagnosis, disease phenotype and behavior over time, treatment, association with ASCA, other clinicalcharacteristics
Pavlidis et al. Letter to the editor [92]	UK	12 IPAA patients Adult	Anti-GP2 IgA/IgG (ELISA)	Risk of pouchitis
Roggenbuck et al. [44]	Germany	73 CD 49 UC 69 HC Adult	Anti-GP2 IgA/IgG (ELISA and IIF)	Association with PAB, diagnosis
Roggenbuk et al. [51]	Germany	178 CD 100 UC 162 HC Adult	Anti-GP2 IgA/IgG (ELISA)	Diagnosis, association with IIF PAB, association with ASCA
Roggenbuck et al. Author's reply [94]	Germany	Report of 1 CD Adult	Anti-GP2 IgA/IgG (ELISA)	Behavior under treatment
Roggenbuck et al. Letter to the editor [98]	Germany	ND	Anti-GP2 IgA/IgG (ELISA and IIF)	Association with PAB (IIF staining pattern)
Roggenbuck et al. Letter to the editor [85]	Germany	103 CD 74 UC Pediatric	Anti-GP2 IgA/IgG (ELISA and IIF)	Diagnosis, comparison IIF/ELISA
Werner et al. [47]	Germany	16 CD 13 UC 10 OGD 10 HC *OGD: IBS, pancreatitis Adult	Anti-GP2 IgA/IgG (ELISA)	Diagnosis, treatment
Werner et al. [91]	Israel	42 IPAA patients Adult and pediatric Follow-up samples for 10 patients	Anti-GP2 IgA/IgG (ELISA) + Fecal anti-GP2	Risk of pouchitis, behavior over time, association with anti-glycan Ab, treatment
Anti-GM-CSF Ab				
Däbritz et al. [88]	USA Germany Australia	61 CD 120 UC Adult and pediatric Prospective study	Anti-GM-CSF (ELISA)	Disease activity, role in prediction of relapse, disease phenotype
Dykes et al. [87]	USA	114 CD 39 controls (7 UC, 2 IC, 30 OGD) Pediatric Undergoing diagnostic CTE or MRE	Anti-GM-CSF (ELISA)	Diagnosis, disease phenotype, disease activity, treatment
Gathungu et al. [86]	USA Australia	477 CD 394 UC 607 HC Adult and pediatric	Anti-GM-CSF (ELISA)	Diagnosis, disease phenotype, genotype, other clinical characteristics
Han et al. [58]	USA	286 CD 68 UC 108 HC Adult and pediatric	Anti-GM-CSF (ELISA)	Disease phenotype, genotype, disease activity, risk of complications, association with ASCA, treatment, pathophysiological role
Jurickova et al. [57]	USA	116 CD and 21 HC Pediatric	Anti-GM-CSF (ELISA)	Complicated behavior, pathophysiological role
Nylund et al. [89]	USA	30 CD 15 UC Pediatric	Anti-GM-CSF (ELISA)	Disease activity, intestinal permeability, disease phenotype, treatment

Ab: antibody, IBD: inflammatory bowel disease, CD: Crohn's disease, UC: ulcerative colitis, IC: indeterminate colitis, OGD: other gastrointestinal disease, HC: healthy control, GI: gastrointestinal, IBS: irritable bowel syndrome, GSE: gluten-sensitive enteropathy, gASCA: anti-*Saccharomyces cerevisiae* Ab ACCA: anti-chitobioside carbohydrate Ab, ALCA: anti-laminaribioside carbohydrate Ab, AMCA: anti-mannobioside carbohydrate Ab, anti-C: anti-chitin Ab, anti-L: anti-laminarin Ab, ASMA: anti-synthetic mannoside Ab, GP2: glycoprotein 2, GM-CSF: granulocyte-macrophage colony stimulating factor, PAB: anti-pancreatic Ab, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, IIF: indirect immunofluorescence, IPAA: ileal pouch-anal anastomosis, CTE: computed tomography enterography, MRE: magnetic resonance enterography, EIM: extraintestinal manifestations, ND: no data, NA: not applicable,

levels of anti-GP2 Ab were found higher in patients with ileal location or extensive ileo-colonic location, and lower in patients with penetrating disease or with colonic location [80,81]. There was also an association with patients who had previous surgery [80]. Bogdanos et al. found a higher prevalence of anti-GP2 IgG and IgG and/or IgA in patients with an age at diagnosis less than 17 years [81]. However, Pavlidis et al. did not find any association with age at disease onset or disease duration [80]. In the study of Op de Beéck et al., an association was found with upper gastrointestinal tract disease location but no association was found with other disease location or disease behavior [79]; and in the recent study of Gross et al., no significant association was found between anti-GP2 IgA or IgG and CD location [83].

Serum anti-GM-CSF Ab levels are also associated with different disease phenotypes. Indeed, higher anti-GM-CSF Ab levels are associated with ileal involvement, and/or complicated behavior or IBD-related surgery [57,58,86–88]. In the study of Han et al., the positive predictive value (PPV) and the negative predictive value (NPV) for stricturing/penetrating behavior of anti-GM-CSF Ab were comparable with other serological markers (ASCA, ANCA, OmpC, I2) [58]. The odds for ileal disease location and more aggressive stricturing/penetrating behavior

Annexes

Author's personal copy

Table 3
Prevalence of anti-glycan Ab and anti-GP2 Ab in IBD and controls (range).

Antibody	Antigen	Prevalence				Citations
		CD	UC	Other gastro-intestinal diseases	Healthy control	
gASCA (IgA/IgG)	Purified Carbohydrate epitopes phosphopeptidomannan of *S. cerevisiae*	0–69	0–14	1–23 (11–22 celiac)	0–15	[42,66–74,97]
ACCA (IgA)	Chitobioside (GlcNAc (β1, 4) GlcNAc (β))	8–52	0–45	3–35 (22 celiac)	2–33	[21,42,66–69,71–75,97]
ALCA (IgG)	Laminaribioside (Glc (β1, 3) Glc (β))	8–76	0–22	1–21 (0–7 celiac)	0–23	[21,42,66–75,97]
AMCA (IgG)	Mannobioside (Man (α, 3) Manα)	12–67	0–36	3–27	0–33	[21,66–69,71–74,97]
Anti-C (IgA)	Chitin (GlcNAc (β1, 4)) n	10–25	2–15	7–23	2	[67,68,71,72]
Anti-L (IgA)	Laminarin (Glc (β1, 3)) 3n (Glc (β1, 6)) n)	11–26	3–15	4–11	1	[67,68,71,72]
At least one anti-glycan Ab		59–78	28–48	21–50	21–23	[43,67–69,71,72]
Anti-GP2 IgA	Glycoprotein 2	1–25	0–13	4 (29–38 celiac)	0–4	[44,51,79,81–85]
Anti-GP2 IgG	Glycoprotein 2	10–44	1–22	0–1 (0–19 celiac)	0–8	[44,51,79–85]
Anti-GP2 IgA and/or IgG	Glycoprotein 2	21–45	2–19	4	1–8	[44,51,79,81,82,84,85]

CD: Crohn's disease, UC: ulcerative colitis, Ab: antibody, gASCA: anti-*Saccharomyces cerevisiae* Ab, ACCA: anti-chitobioside carbohydrate Ab, ALCA: anti-laminaribioside carbohydrate Ab, AMCA: anti-mannobioside carbohydrate IgG, anti-C: anti-chitin Ab, anti-L: anti-laminarin Ab, anti-GP2: anti-glycoprotein 2 Ab.

Table 4
Diagnostic performances of anti-glycan Ab and anti-GP2 Ab in different clinical situations.

	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	LR+	LR−	Citations
IBD vs healthy controls							
gASCA (IgG)	43–45	90–99	97–100	15–23	4.2	NA	[71,76,77]
gASCA (IgA)	31	100	100	14	N50	NA	[71]
ACCA	7–19	86–97	89–95	11–15	2.1	NA	[71,76,77]
ALCA	15	94–99	96–98	11–16	2.4	NA	[71,76,77]
AMCA	9–26	92–97	95–96	11–17	2.8	NA	[71,76,77]
Anti-C	7	98	97	11	3.4	NA	[71]
Anti-L	12	99	99	11	12.0	NA	[71]
IBD vs non-IBD GI/OGD							
gASCA (IgG)	41–45	91–98	94–100	14–29	NA	NA	[70,76]
ACCA	19	84	93	9	NA	NA	[76]
ALCA	15–20	93–99	92–100	10–24	NA	NA	[70,76]
AMCA	26	93	98	10	NA	NA	[76]
Anti-GP2 IgG	16	99	NA	NA	12.3	NA	[80]
CD vs healthy controls							
gASCA (IgG)	42–53	70–96	78–95	60–63	3.6	0.6	[43,69,73,77]
ACCA	11–27	81–96	74–88	51–54	2.7	0.9	[43,69,73,77]
ALCA	15–53	84–95	72–95	52–62	2.5	0.9	[43,69,73,77]
AMCA	12–17	72–100	89–100	51–53	11.6	0.9	[43,69,73,77]
CD vs non-IBD GI/OGD							
gASCA (IgG)	42–63	84–97	85–98	31–63	NA	NA	[43,67–70,77]
ACCA	11–27	89–98	68–97	26–52	NA	NA	[43,67–70,77]
ALCA	15–53	79–98	73–90	32–54	NA	NA	[43,67–70,77]
AMCA	12–27	91–100	77–100	24–53	NA	NA	[43,67–70,77]
Anti-C	22–25	77–93	74–81	45–48	NA	NA	[67,68]
Anti-L	22–26	89–96	79–87	46–48	NA	NA	[67,68]
CD vs UC							
gASCA (IgG)	42–71	85–92	79–95	38–66	4.2–5.3	0.6	[43,67–71,73,76,95]
gASCA (IgA)	47	94	93	51	7.9	NA	[71]
ACCA	9–27	55–97	46–87	24–52	2.9–3.5	0.9	[43,67–71,73,76,95]
ALCA	15–53	78–96	60–93	25–58	2.6–3.6	0.9	[43,67–71,73,76,95]
AMCA	12–29	64–97	54–92	26–52	1.9–3.7	0.9	[43,67–71,73,76,95]
Anti-C	10–37	85–98	87–91	29–45	4.4	NA	[67,68,71,95]
Anti-L	18–33	85–97	88–91	30–44	5.4	NA	[67,68,71,95]
Anti-GP2 IgA	13	98	NA	NA	6.6	0.9	[81]
Anti-GP2 IgG	26–28	92–93	NA	NA	3.6–3.9	0.8	[80,81]
Anti-GP2 IgA and/or IgG	30	91	NA	NA	3.4	0.8	[81]
CD vs no CD							
gASCA (IgG)	42–67	85–93	72–88	75–76	NA	NA	[67–69,73]
ACCA	17–27	89–91	54–65	58–71	NA	NA	[67–69,73]
ALCA	25–53	82–92	60–75	61–78	NA	NA	[67–69,73]
AMCA	15–31	90–95	59–72	57–69	NA	NA	[67–69,73]
Anti-C	22–25	86–90	60–65	59	NA	NA	[67,68]
Anti-L	22–26	91–92	68–69	59–60	NA	NA	[67,68]
Anti-GP2 IgG	18–29	79–96	40	56	NA	NA	[51,84]
Anti-GP2 IgA	14–24	73–99	42	57	NA	NA	[51,84]
Anti-GP2 IgA and/or IgG	30	94	NA	NA	NA	NA	[51]

IBD: inflammatory bowel disease, CD: Crohn's disease, UC: ulcerative colitis, OGD: other gastro-intestinal diseases, gASCA: anti-*Saccharomyces cerevisiae* Ab, ACCA: anti-chitobioside carbohydrate IgA Ab, ALCA: anti-laminaribioside carbohydrate IgG Ab, AMCA: anti-mannobioside carbohydrate IgG Ab, anti-C: anti-chitin Ab, anti-L: anti-laminarin Ab, anti-GP2: anti-glycoprotein 2 Ab, anti-GM-CSF: anti-granulocyte macrophage colony-stimulating factor Ab, NA: not available.

Annexes

Author's personal copy

Table 5
Role of combination of anti-glycan Ab in diagnostic accuracy.

Reference	Diagnosis contribution
Dotan et al. [42]	Combined use of gASCA, ACCA and ALCA: improvement in differentiation CD vs UC with a sensitivity up to 77% compared to 66% for ASCA alone
Ferrante et al. [76]	Best accuracy for diagnosis of IBD vs controls: combination gASCA, ANCA and ALCA (AUC = 0.848 vs 0.801 for gASCA/ANCA alone and vs 0.765 for ALCA/ANCA) Improvement of the combination of gASCA, ANCA and ALCA for CD vs UC compared to gASCA and ANCA (AUC = 0.796 vs 0.770)
Koutroubakis et al. [69]	Combination ASCA+/ALCA+: best sensitivity for diagnosis of CD (sensitivity of 71% vs 42% for ASCA alone or vs 53% for ALCA alone)
Malickova et al. [73]	The combination of gASCA, AMCA, ALCA and ACCA increases the diagnostic accuracy for the differentiation of CD from HC: AUC = 0.915 vs 0.814 for gASCA alone Positivity of at least one Ab among gASCA, ACCA, ALCA or AMCA increased the sensitivity up to 86% for the diagnosis of CD vs 67% for gASCA alone
Rieder et al. [67]	Combining the markers improves the sensitivity for the differentiation of CD from all other conditions: at least one positive Ab among gASCA, ACCA, ALCA, AMCA, anti-L and anti-C: sensitivity of 78% vs 63% for gASCA alone With increasing amount of positive Ab, the specificity and positive predictive value increase: respectively 68% and 67% for one positive Ab, 88% and 77% for 2 positive Ab, 96% and 85% for 3 positive Ab
Rieder et al. [68]	Addition of anti-L and anti-C to gASCA alone or to gASCA/ANCA combination: increase discriminatory capacity for CD vs no CD or vs UC compared to gASCA alone (AUC = 0.81 vs 0.79, p = 0.0002) or gASCA/ANCA (AUC = 0.85 vs 0.83, p = 0.006)
Seow et al. [71]	Slight improvement in diagnosis accuracy for ACCA, ALCA, anti-L and anti-C when added to gASCA/ANCA for CD vs UC (AUC = 0.80, p = 0.03, AUC = 0.80, p = 0.04, AUC = 0.80, p b 0.0001, AUC = 0.80, p = 0.03 respectively for ACCA, ALCA, anti-L and anti-C, vs AUC = 0.79 for gASCA/ANCA) Improvement in discriminatory capacity when both anti-L and anti-C added to gASCA/ANCA (AUC = 0.81, p = 0.0001)

IBD: inflammatory bowel disease, CD: Crohn's disease, UC: ulcerative colitis, OGD: other gastro-intestinal diseases, HC: healthy controls, gASCA: anti-*Saccharomyces cerevisiae* Ab, ANCA: anti-neutrophilic cytoplasmic Ab, ACCA: anti-chitobioside carbohydrate IgA Ab, ALCA: anti-laminaribioside carbohydrate IgG Ab, anti-C: anti-chitin Ab, anti-L: anti-laminarin Ab, AUC: area under curve (receiver operating characteristic curve).

Table 6
Relationship of anti-glycan, anti-GP2 and anti-GM-CSF Ab (prevalence and/or level) with disease phenotype characteristics in the literature (references).

	Association	No association
Early disease onset	• Positive association: – gASCA [43,68,71] – ALCA [43] – AMCA [68] – Anti-GP2 [81] • Negative association: – gASCA [67] – Anti-GM-CSF [58,86]	– ACCA [68,71,73] – ALCA [68,71,73] – AMCA [71,73] – Anti-L [68,71] – Anti-C [68,71] – Anti-GP2 [80]
Longer disease duration	• Positive association: – gASCA [71,73,76] – ACCA [71,76] – AMCA [76] – Anti-L [71]	– gASCA [69] – ACCA [21,69,73] – ALCA [21,69,71,73,76] – AMCA [21,69,71,73] – Anti-C [71] – Anti-GP2 [80] – Anti-GM-CSF [58,87]
Ileal involvement	• Positive association: – gASCA [42,43,67–71,73,74,76] – ACCA [76] – ALCA [71,76] – Anti-L [71] – Anti-GP2 [80,81] – Anti-GM-CSF [58,86–88]	– ACCA [21,42,43,67,69–71,73] – ALCA [21,43,67,73] – AMCA [21,43,67,69–71,73,76] – Anti-L [67] – Anti-C [67] – Anti-GP2 [83]
Complicated disease (fibrostenosing and/or penetrating disease)	• Positive association: – gASCA [42,43,67–73,76] – ACCA [43,71,76] – ALCA [42,67,69] – AMCA [67,68,72,76] – Anti-L [67,68,71] – Anti-C [71] – Anti-GP2 [81] – Anti-GM-CSF [57,58,86,87] • Negative association: – Anti-GP2 [80,81] (with penetrating disease)	– ACCA [21,42,67–70,73] – ALCA [21,43,68,71,73,76] – AMCA [21,43,69–71,73] – Anti-C [67,68] – Anti-GP2 [79] – Anti-GM-CSF [88]
IBD-related surgery	• Positive association: – gASCA [43,68–71,76] – ACCA [43,71,72] – ALCA [67,69,71] – AMCA [68,72,76] – Anti-L [68,71,72] – Anti-C [68,71] – Anti-GP2 [80] – Anti-GM-CSF [57,58,86]	– gASCA [67] – ACCA [21,67–70,75,76] – ALCA [21,43,68,70,75,76] – AMCA [21,43,67,69–71] – Anti-L [67] – Anti-C [67] – Anti-GP2 [79]

IBD: Inflammatory bowel disease, gASCA: anti-*Saccharomyces cerevisiae* Ab, ACCA: anti-chitobioside carbohydrate IgA Ab, ALCA: anti-laminaribioside carbohydrate IgG Ab, AMCA: anti-mannobioside carbohydrate IgG Ab, C: anti-chitin Ab, anti-L: anti-laminarin Ab, anti-GP2: anti-glycoprotein 2 IgG/IgA Ab, anti-GM-CSF: anti-granulocyte macrophage colony-stimulating factor Ab.

Author's personal copy

requiring surgery increased as anti-GM-CSF Ab levels increased, with a risk appreciably increased in patients with concentrations ≥ 1.6 μg/ml [57,58]. The frequency of complicated behavior or surgery was higher in patients with elevated anti-GM-CSF and GM-CSF neutralizing capacity N 25% than in patients with one or none of these factors [57]. Dykes et al. showed that there was a higher prevalence of luminal narrowing and strictures in pediatric CD patients with high anti-GM-CSF Ab levels [87]. In UC, serum anti-GM-CSF Ab levels were significantly correlated with extent and severity: levels were higher in patients with left-sided (distal) UC vs proctitis or pancolitis and in patients with moderate or severe disease [88]. Median concentrations were higher in adult compared to pediatric CD onset but there was no variation with the duration of the disease [58].

Anti-glycan, anti-GP2 and anti-GM-CSF Abs are associated with specific disease location, especially with ileal involvement in CD and complicated disease behavior requiring surgery, although results differ between studies. Increasing number and level of Ab responses toward glycan were associated particularly with more complicated disease behavior. Anti-GP2 Ab could be a marker of fibrostenosis in CD and help support further risk stratification of CD patients.

3.2.2. Association with risk of complications and surgery

Some anti-glycan Abs seem to be associated with the prediction of complications and CD-related surgery. Rieder et al. showed that patients positive for gASCA, AMCA and anti-L had a higher risk for an earlier occurrence of complications during the disease course. In this study, gASCA, AMCA, anti-L and anti-C in CD patients were associated with multiple complications but these patients did not have a higher frequency of Ab positivity compared to patients with only one complication [68]. In a longitudinal study, Rieder et al. showed that in patients who never had complication or surgery, progressing to a first event (fistula, stenosis, or IBD-related surgery) the prevalence was significantly higher for gASCA, AMCA and anti-L. Patients who are positive for gASCA, AMCA, ACCA, and anti-L or for at least 2 anti-glycan Ab had a higher likelihood of progression to a disease event. AMCA, ACCA and anti-L seemed to predict the occurrence of earlier events compared to gASCA. When the occurrence of complications and CD-related surgery were analyzed separately during the follow-up, gASCA and AMCA indicated a progression toward complicated disease behavior and AMCA, ACCA and anti-L were associated with higher risk for CD-related surgery [72]. In patients with prior complications or surgery, only positivity for anti-L or more than 3 markers out of the whole panel indicated a risk of progression to an additional complication or surgery [72].

Elevated serum anti-GM-CSF Ab (≥ 1.6 μg/ml) concentrations were associated with a more rapid rate of progression toward complicated behavior in patients with ileal involvement [58]. In another study of Jurickova et al., likelihood ratio (confidence interval) for developing complicated behavior or requiring surgery was 2 (1, 3) and 1.7 (1, 3) - respectively in CD patients with elevated anti-GM-CSF Ab [57].

Pouchitis is a post-surgical complication characterized by an inflammation of the small bowel developing in UC patients undergoing proctocolectomy and ileal pouch-anal anastomosis (IPAA). A study of Ferrante et al. showed that ACCA was independently associated with pouchitis in UC patients following ileal pouch-anal anastomosis. Patients with extraintestinal manifestations prior to colectomy and positive ACCA developed their first pouchitis episode more rapidly [90]. Werner et al. found that patients with ileal pouch and CD-like complications exhibited significantly higher anti-GP2 Ab concentrations than those without complications. Patients with active pouchitis had significantly higher anti-GP2 IgA and IgG levels than patients with normal pouches without active disease [91]. Moreover, there were significantly higher levels of anti-GP2 IgA and IgG in patients with chronic and recurrent pouchitis vs patients with normal pouches [91]. Pavlidis et al. showed that on 12 UC patients who had colectomy and pouch formation, 2 were positive for anti-GP2 IgG and among them, one developed acute pouchitis. Anti-GP2 IgG was negative after resolution of symptoms. Among the 12 patients, 2 had chronic pouchitis but anti-GP2 was negative [92], which is contradictory with findings of Werner et al. and could be explained by the small number of patients with chronic pouchitis in this study.

Anti-glycan Abs seem to be associated with progression toward a more severe disease course and a higher risk for IBD-related surgery, and could be particularly useful for disease prognosis before a first event occurs. Anti-GM-CSF Ab seems to be also associated with a progression toward complications. Anti-GP2 Ab correlates with pouch inflammation and could contribute to better stratify pouchitis.

3.2.3. Association with disease activity

In several studies, no association was found between anti-glycan Ab and disease activity (clinical scores) at the time of sample procurement [42,67–69,72]. There was no relation between inflammation measured by C-reactive protein (CRP) and anti-glycan Ab concentrations [67,69,73].

In a study on 83 Italian IBD patients, about 91% of patients with moderate to severe endoscopic activity had anti-GP2 Ab [93]. However, there was no significant longitudinal change in anti-GP2 levels regardless of different inflammatory activities during follow-up visits in a subgroup of 10 IBD patients [91].

Däbritz et al. showed that serum anti-GM-CSF Ab levels were correlated with disease activity: median anti-GM-CSF levels were significantly higher in patients with active CD (8.5 μg/ml) vs CD in remission (1.3 μg/ml) ($p < 0.0001$) and in active UC (0.8 μg/ml) than in inactive UC (0.5 μg/ml) ($p < 0.0005$) [88]. There was a significant correlation between anti-GM-CSF Ab and fecal calprotectin. Moreover, there is an increase in anti-GM-CSF Ab levels up to 6 months before a relapse. A concentration of N 1.7 μg/ml in CD and N 0.5 μg/ml in UC gives the best accuracy for the prediction of clinical relapse within 2–6 months with a sensitivity of 88% in CD and 62% in UC and a specificity of 95% in CD and 68% in UC. Levels of anti-GM-CSF Ab reached a peak during relapse, and decreased within 2–6 months, reaching a baseline at 9 months after it. The percentage of patients relapsing during follow-up was higher in patients with high anti-GM-CSF Ab concentrations at inclusion than in patients with low concentrations. A baseline level of N 1.7 μg/ml was significantly associated with clinical relapse of CD within 18 months but there was no difference of Ab concentrations according to the proportion of patients who relapsed in UC [88]. In contrast with these findings, another study showed no difference between patients with inactive or active disease [58] and in a pediatric population, Nylund et al. found that the frequency of clinical remission did not differ between low and high CD groups of anti-GM-CSF Ab levels and that there was no differences in markers of systemic or mucosal inflammation between the 2 groups [89]. In the same study, the association between anti-GM-CSF Ab and intestinal permeability has been evaluated. Elevated anti-GM-CSF Abs were associated with increased intestinal permeability in CD patients who also exhibited evidence of increased endotoxin exposure. Indeed intestinal permeability and endotoxin exposure were increased in CD group with high anti-GM-CSF levels vs CD with low anti-GM-CSF levels and vs controls [89].

Anti-glycan Abs do not seem to be associated with disease activity. Anti-GM-CSF Abs seem to be correlated with IBD activity and intestinal permeability and could help in predicting a relapse. Few studies have evaluated the association between anti-GP2 Ab and disease activity to date.

3.2.4. Association with treatment

There are different results about association between Ab and treatment depending on studies. Papp et al. found an association between gASCA and azathioprine use and resistance to steroids in a univariate analysis [43]. In the same study, there was no association between the serological marker positivity and short-term therapeutic response to infliximab in 56 CD patients [43]. In other studies, no association was found between anti-glycan Ab and medications [42,67,69].

Annexes

Author's personal copy

Pavlidis et al. did not find any difference of prevalence of anti-GP2 Ab among patients treated with or without infliximab [80] and Werner et al. did not find any correlation between anti-GP2 Ab levels and medications taken [47]. Op de Beéck et al. showed that all CD patients positive for anti-GP2 Ab before treatment with anti-tumor necrosis factor (TNF) remained positive with no major change in antibody concentration 6–44 months after treatment with infliximab (IFX) or adalimumab [79]. In contrast, Roggenbuck et al. showed that on one 44-year case of CD localized to the colon with ileocecal resection for strictures and treated with IFX for 12 months, there was a significant decrease of anti-GP2 IgG level 12 months after starting IFX, but there was no change for anti-GP2 IgA or ASCA [94]. Patients taking probiotics had significantly lower levels of anti-GP2 Ab than patients not using probiotics [91].

Levels of anti-GM-CSF Ab were significantly lower in patients without medication vs patients treated with oral corticosteroids, 5-aminosalicylates, azathioprine, anti-TNF or methotrexate in the study of Däbritz et al. [88]. 58% of patients on medical therapy at the time of the inclusion had low Ab levels and 38% showed elevated concentrations during the follow-up of patients on medical therapy [88]. Nylund et al. showed significant higher GM-CSF Ab in pediatric patients treated with infliximab [89]. In a study of Han et al., median concentrations were higher in patients who had received 6-mercaptopurine, but there was no variation with corticosteroid or infliximab exposure [58].

There are conflicting results according to different studies about association the between Ab and treatment or therapeutic responses. Additional studies and particularly prospective ones are required to draw more accurate conclusions and to evaluate if these antibodies could be useful in predicting or monitoring therapeutic response.

3.2.5. Behavior of Ab over time

Few studies have evaluated the stability of the Ab over time. Three studies from the same group have evaluated the stability of anti-glycan Ab over time. In these studies, Rieder et al. showed that there were substantial level changes over time in the same patient but the marker status (positive or negative for a respective Ab) did not change (status stable for 74–93% of CD patients and 84–100% of UC patients) [68,72,95]. In a prospective study with a median follow-up of 17.4 months for CD and 10.9 months for UC, in a subgroup of CD patients marked changes in the overall immune response and in levels of each antibody were observed over time (between 19% for gASCA and 32% for AMCA of absolute changes from the baseline) although the status remains largely stable over time. No phenotype or NOD2 genotype was associated with a higher magnitude of average or with maximal fluctuations in the markers levels and status over time. The occurrence of first time complicated CD-behavior, first time CD-related surgery, active disease or the start of immunosuppressive medication did not influence the overall immune response or the levels of individual markers. Pre-event Ab levels were no significantly different to post-event levels. There were no significant changes in discriminatory capacity of the markers over time [95].

In the study of Pavlidis et al., repeated testing were performed on 20 CD patients including 8 positive for anti-GP2 IgG with a median follow-up of 3+/-1.3 years [80]. At repeated testing, the 8 positive patients have shown a decline of anti-GP2 IgG levels with modification of serological status for 3 of them. For the 12 seronegative patients, only 2 became positive. In the study of Werner et al., there were no significant longitudinal changes in anti-GP2 levels regardless of different inflammatory activity in a subgroup of 10 patients in 4 months [91].

IBD patients who had no clinical relapse during the study follow-up showed a low intra-individual variation of anti-GM-CSF Ab levels [88]. Globally, levels of Ab seem to be relatively stable over time with a low percentage of change in Ab status. More longitudinal studies are required to evaluate more precisely the evolution of these Abs over time and to define related causes.

3.3. Other antibody associations

3.3.1. With clinical and genetic characteristics

Associations between anti-glycan, anti-GP2 or anti-GM-CSF Ab with other clinical characteristics and with genotype are summarized in Table 7. There is no association between anti-glycan Ab and extraintestinal manifestations [43,68,69]. Interestingly, some studies have found associations between gASCA [74], AMCA [70] or anti-GM-CSF Ab [86] and smoking status. AMCA levels were higher in women in one study [70]. These associations were not found in other studies [21,42,43,69].

Furthermore, an association was found between ALCA levels and family history of IBD; ALCA levels were significantly higher in CD

Table 7
Associations of anti-glycan, anti-GP2 and anti-GM-CSF Ab with other clinical characteristics and genetic markers.

	Association	No association
Clinical characteristics		
Patient gender	– AMCA [70]	– Anti-glycan [21,43,69] – Anti-GP2 [79] – Anti-GM-CSF [86]
Smoking status	– gASCA [74] – AMCA [70]	– Anti-glycan [42,43,69]
Extra-intestinal manifestations	– Anti-GM-CSF (negative association) [86]	– Anti-glycan [43,67,69]
Family history of IBD	– ALCA [21,70] – ACCA [21]	– Anti-glycan [42,43,67] – AMCA [21] – Anti-GP2 [80]
Genetic markers		
NOD2/CARD15 variant	– gASCA[a] [43,74] – AMCA[a] [43] – ALCA[a] [74] – Any glycan[a] [43]	– Anti-GM-CSF [58,86,89]
NOD1/CARD4 variant	– gASCA [74] (gene dosage effect)	– Anti-glycan [97]
TLR4 variant	– ACCA [74] (inverse gene dosage effect)	– Anti-glycan [43]
CARD8 variant		– Anti-glycan [74]
IRGM susceptibility SNP	– Anti-GM-CSF [58]	– Anti-GM-CSF [86]
ATG16L1		– Anti-GM-CSF [58]
DLG5 (R30Q variant)		– Anti-glycan [97]
DEFB1 variant	– Anti-glycan [97] (inversely) (G20A variant)	– Anti-glycan [97] (G52A variant)

IBD: inflammatory bowel disease, gASCA: anti-*Saccharomyces cerevisiae* Ab, ACCA: anti-chitobioside carbohydrate IgA Ab, ALCA: anti-laminaribioside carbohydrate IgG Ab, AMCA: anti-mannobioside carbohydrate IgG Ab, C: anti-chitin Ab, anti-L: anti-laminarin Ab, anti-GP2: anti-glycoprotein 2 IgG/IgA Ab, anti-GM-CSF: anti-granulocyte macrophage colony-stimulating factor Ab.

[a] With gene dosage effect.

Author's personal copy

patients with at least an IBD-affected first degree relative than those without family cases [70]. In the study of Michielan et al., the prevalence of ACCA or ALCA was significantly higher in first-degree relatives of CD than in healthy controls but no difference was found for AMCA [21]. In patients from multicase families, there was an additive risk increment for CD per additional affected relative and additional positive Ab (among ASCA, ALCA, AMCA, ACCA, AΣMA, anti-OmpC, anti-CBir1 and anti-I2) [96]. However, in other studies no association was found between anti-glycan Ab and family history of IBD [42,43].

Some studies have evaluated associations between Ab and genetic markers. Anti-glycan Abs were associated with NOD2/CARD15 variants in two studies [43,74]. gASCA positivity was also independently associated with NOD1/CARD4 indel variants with gene dosage effect (increasing gASCA positivity for patients carrying no, one and two variants) and ACCA was inversely associated with TLR4 variant [74]. However, for Papp et al., no association was found between TLR4 variant and the presence of any of anti-glycan Ab [43]. CARD8 variant was not associated with the presence of anti-glycan Ab in CD patients [74]. No effect of other genetic variant on the prevalence of anti-glycan Ab was seen in UC patients [74]. Anti-glycan Abs were inversely associated with G20A DEFB1 variant and a similar tendency was observed for ALCA and C44G DEFB1 variant [97].

3.3.2. With other markers

CD patients with positive pancreatic autoantibodies (PAB) have significantly higher concentrations of anti-GP2 Ab than PAB negative CD patients [44,51]. Two studies showed a correlation between anti-GP2 Ab and PAB in CD [51,81]. But anti-GP2 reactivity is not found in all PAB-positive patients. Among CD patients positive for PAB, 45–83% had anti-GP2 IgG, and 22–44% had anti-GP2 IgA [44,51,79,98]. It seems that anti-GP2 Ab positive sera are more frequent with type 1 PAB indirect immunofluorescence (IIF) pattern (extracellular staining of the pancreatic acinar lumen) than type 2 (intracellular reticular staining of acinar cells) [51,79,98]. An association was found between the positivity of PAB and gASCA, ALCA or any glycan Ab [99].

In the study of Pavlidis et al., levels of ASCA were higher in patients positive for anti-GP2 IgG although there was no correlation between ASCA and anti-GP2 Ab levels in double positive patients [80]. Another study of Bogdanos et al. showed that ASCA and anti-GP2 Ab were correlated. This correlation was found between ASCA IgG and anti-GP2 IgG but not between ASCA and anti-GP2 IgA [51]. In other studies, no significant correlation was found between anti-GP2 and ASCA levels [79,82]. The combination of ASCA and anti-GP2 Ab improves the positive likelihood ratio values regarding the serological differentiation of CD and UC [81]. Patients with at least one positive anti-glycan Ab have higher levels of anti-GP2 IgA and IgG vs anti-glycan seronegative patients [91]. Furthermore, the frequency of ASCA positivity was increased (about 5-fold) in CD patients who had elevated serum anti-GM-CSF Ab [58].

In the study of Werner et al., anti-GP2 Abs were assessed in fecal samples. Levels of anti-GP2 IgA were 10 fold higher than IgG reflecting the dominance of this isotype in the intestine. There was no difference in anti-GP2 Ab levels in feces of pouch patients with different disease behavior, albeit higher anti-GP2 Ab levels in chronic pouchitis patients. Patients with active disease or with CD-like complications have significantly higher anti-GP2 Ab levels in feces, and similarly these levels are elevated in patients with more frequent daily bowel movements. There was no correlation between fecal anti-GP2 Ab levels and the presence of anti-glycan Ab [91].

4. Conclusions

Several independent studies have reported the diagnostic ability of anti-glycan, anti-GP2 and anti-GM-CSF Ab and their association with particular disease phenotypes and complications but results and conclusions vary among studies. The heterogeneity of these data could be linked to the design of the studies (mostly cross-sectional studies), various inclusion criteria of the patients studied, size of cohorts, different control groups or different methodology used, for example for the evaluation of phenotypical characteristics or disease activity and serological analysis among studies.

These antibodies have only limited value for the initial diagnosis of IBD. Data suggest that they have better value in differentiating CD from UC but there is heterogeneity of serologic responses in both diseases. These antibodies are predominantly found in ileal disease location; complicated disease phenotype, and are associated with an increased risk for IBD-related surgery. The combined presence of a number and magnitude of immune responses to microbial antigens seems to be a predictor of more aggressive disease. These markers could have a role to individualize the risk of developing complications. Anti-GP2 Ab could contribute to better stratify risk of pouchitis in patients undergoing pouch surgery. In addition, anti-GM-CSF Abs have been found to predict clinical relapse in some small studies to date.

However, there are few data for the use of these antibodies in therapeutic monitoring of disease activity and response to therapy at the moment. Moreover, only a few longitudinal studies focus on these serological markers, although they seem to be relatively stable over time. The evolution of these markers over time in different clinical situations and under treatment needs to be evaluated in more studies in order to recommend their routine clinical use for the diagnosis of IBD, the risk stratification of patients, and the prediction of disease course and therapeutic response. These antibodies could then have a role in diagnostic and prognostic algorithms for IBD and they could be integrated with clinical, histologic, endoscopic and radiological markers.

In addition, monitoring of these antibodies responses could improve our understanding of the immunopathogenesis of IBD, particularly for anti-GP2 and anti-GM-CSF antibodies.

Take-home messages

- These new serological markers have limited value for IBD diagnosis particularly due to their low sensitivity. However, they are highly specific for CD and prevalence and/or levels of anti-glycan, anti-GP2 and anti-GM-CSF Abs are higher in CD than in UC or controls. The combination of anti-glycan Abs could improve diagnosis accuracy.
- There are heterogeneous results about the association with anti-glycan, anti-GP2 and anti-GM-CSF Ab and specific disease phenotypes, but in some studies they seem to be associated with more complicated CD.
- Anti-glycan Abs seem to be associated with a risk of progression to a more severe CD course, anti-GP2 Ab with pouchitis after IPAA surgery and anti-GM-CSF Ab could help in predicting a relapse although more studies are required to confirm these findings.
- There are conflicting results among studies about the association of these antibodies with treatment and therapeutic response. There are few data for the use of these antibodies in therapeutic monitoring to date.
- Results vary among studies and more prospective studies are required especially to evaluate the behavior of these antibodies during disease course and under treatment and their role as predictors of clinical outcomes.

References

[1] Agius LM. A primary dysregulation in the immunoregulatory role of the intestinal mucosal epithelial cell in inflammatory bowel disease pathogenesis? Biology of inflammatory response as tissue pattern entities in Crohn's versus ulcerative colitis. J Theor Biol 2004;227:219–28. http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2003.11.002.
[2] Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. Lancet 2007;369:1627–40. http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60750-8.
[3] Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. Gastroenterology 2008;134:577–94. http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2007.11.059.
[4] Cassinotti A, Sarzi-Puttini P, Fichera M, Shoenfeld Y, de Franchis R, Ardizzone S. Immunity, autoimmunity and inflammatory bowel disease. Autoimmun Rev 2014; 13:1–2. http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2013.06.007.

Author's personal copy

[5] Laass MW, Roggenbuck D, Conrad K. Diagnosis and classification of Crohn's disease. Autoimmun Rev 2014;13:467–71. http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2014.01.029.

[6] Conrad K, Roggenbuck D, Laass MW. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. Autoimmun Rev 2014;13:463–6. http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2014.01.028.

[7] Ben-Horin S, Kopylov U, Chowers Y. Optimizing anti-TNF treatments in inflammatory bowel disease. Autoimmun Rev 2014;13:24–30. http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2013.06.002.

[8] Reese GE, Constantinides VA, Simillis C, Darzi AW, Orchard TR, Fazio VW, et al. Diagnostic precision of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies and perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 2006;101:2410–22. http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00840.x.

[9] Desir B, Amre DK, Lu S, Ohman-strickland P, Dubinsky M, Fisher R, et al. Utility of serum antibodies in determining clinical course in pediatric Crohn's disease. Clin Gastroenterol Hepatol 2004;2:139–46. http://dx.doi.org/10.1016/S1542-3565(03)00321-5.

[10] Esters N, Vermeire S, Joossens S, Noman M, Louis E, Belaiche J, et al. Serological markers for prediction of response to anti-tumor necrosis factor treatment in Crohn's disease. Am J Gastroenterol 2002;97:1458–62. http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2002.05689.x.

[11] Sandborn WJ, Landers CJ, Tremaine WJ, Targan SR. Association of antineutrophil cytoplasmic antibodies with resistance to treatment of left-sided ulcerative colitis: results of a pilot study. Mayo Clin Proc 1996;71:431–6. http://dx.doi.org/10.4065/71.5.431.

[12] Bossuyt X. Serologic markers in inflammatory bowel disease. Clin Chem 2006;52:171–81. http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2005.058560.

[13] Cohavy O, Bruckner D, Gordon LK, Misra R, Wei B, Eggena ME, et al. Colonic bacteria express an ulcerative colitis pANCA-related protein epitope. Infect Immun 2000;68:1542–8.

[14] Sutton CL, Kim J, Yamane A, Dalwadi H, Wei B, Landers C, et al. Identification of a novel bacterial sequence associated with Crohn's disease. Gastroenterology 2000;119:23–31.

[15] Wei B, Huang T, Dalwadi H, Sutton CL, Bruckner D, Braun J. *Pseudomonas fluorescens* encodes the Crohn's disease-associated I2 sequence and T-cell superantigen. Infect Immun 2002;70:6567–75. http://dx.doi.org/10.1128/IAI.70.12.6567-6575.2002.

[16] Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, Mohamath R, Landers CJ, Targan SR, et al. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. J Clin Invest 2004;113:1296–306. http://dx.doi.org/10.1172/JCI200420295.

[17] Mow WS, Vasiliauskas EA, Lin Y-C, Fleshner PR, Papadakis KA, Taylor KD, et al. Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. Gastroenterology 2004;126:414–24.

[18] Spivak J, Landers CJ, Vasiliauskas EA, Abreu MT, Dubinsky MC, Papadakis KA, et al. Antibodies to I2 predict clinical response to fecal diversion in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 2006;12:1122–30. http://dx.doi.org/10.1097/01.mib.0000235833.47423.d7.

[19] Dubinsky MC, Lin Y-C, Dutridge D, Picornell Y, Landers CJ, Farrior S, et al. Serum immune responses predict rapid disease progression among children with Crohn's disease: immune responses predict disease progression. Am J Gastroenterol 2006;101:360–7. http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00456.x.

[20] Landers CJ, Cohavy O, Misra R, Yang H, Lin Y-C, Braun J, et al. Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens. Gastroenterology 2002;123:689–99.

[21] Michielan A, Basso D, Martinato M, Pathak S, Banerjee A, Oliva L, et al. Increased antibody response to microbial antigens in patients with Crohn's disease and their unaffected first-degree relatives. Dig Liver Dis 2013. http://dx.doi.org/10.1016/j.dld.2013.01.017.

[22] Zholudev A, Zurakowski D, Young W, Leichtner A, Bousvaros A. Serologic testing with ANCA, ASCA, and anti-OmpC in children and young adults with Crohn's disease and ulcerative colitis: diagnostic value and correlation with disease phenotype. Am J Gastroenterol 2004;99:2235–41. http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2004.40369.x.

[23] Dubinsky MC, Kugathasan S, Mei L, Picornell Y, Nebel J, Wrobel I, et al. Increased immune reactivity predicts aggressive complicating Crohn's disease in children. Clin Gastroenterol Hepatol 2008;6:1105–11. http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2008.04.032.

[24] Arnott IDR, Landers CJ, Nimmo EJ, Drummond HE, Smith BKR, Targan SR, et al. Sero-reactivity to microbial components in Crohn's disease is associated with disease severity and progression, but not NOD2/CARD15 genotype. Am J Gastroenterol 2004;99:2376–84. http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2004.40417.x.

[25] Devlin SM, Yang H, Ippoliti A, Taylor KD, Landers CJ, Su X, et al. NOD2 variants and antibody response to microbial antigens in Crohn's disease patients and their unaffected relatives. Gastroenterology 2007;132:576–86. http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2006.11.013.

[26] Elkadri AA, Stempak JM, Walters TD, Lal S, Griffiths AM, Steinhart AH, et al. Serum antibodies associated with complex inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2013;19:1499–505. http://dx.doi.org/10.1097/MIB.0b013e318281f2a1.

[27] Markowitz J, Kugathasan S, Dubinsky M, Mei L, Crandall W, LeLeiko N, et al. Age of diagnosis influences serologic responses in children with Crohn's disease: a possible clue to etiology? Inflamm Bowel Dis 2009;15:714–9. http://dx.doi.org/10.1002/ibd.20831.

[28] Mei L, Targan SR, Landers CJ, Dutridge D, Ippoliti A, Vasiliauskas EA, et al. Familial expression of anti-*Escherichia coli* outer membrane porin C in relatives of patients with Crohn's disease. Gastroenterology 2006;130:1078–85. http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2006.02.013.

[29] O'Donnell S, O'Sullivan M, O'Morain CA, Ryan BM. The clinical significance of antimicrobial serologic responses within an Irish Crohn's disease population. Eur J Gastroenterol Hepatol 2013;25:1464–9. http://dx.doi.org/10.1097/MEG.0b013e328365a364.

[30] Papadakis KA, Yang H, Ippoliti A, Mei L, Elson CO, Hershberg RM, et al. Anti-flagellin (CBir1) phenotypic and genetic Crohn's disease associations. Inflamm Bowel Dis 2007;13:524–30. http://dx.doi.org/10.1002/ibd.20106.

[31] Davis MK, Andres JM, Jolley CD, Novak DA, Haafiz AB, González-Peralta RP. Antibodies to *Escherichia coli* outer membrane porin C in the absence of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies are an unreliable marker of Crohn disease and ulcerative colitis. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2007;45:409–13. http://dx.doi.org/10.1097/MPG.0b013e31812f7f6e.

[32] Coukos JA, Howard LA, Weinberg JM, Becker JM, Stucchi AF, Farraye FA. ASCA IgG and CBir antibodies are associated with the development of Crohn's disease and fistulae following ileal pouch-anal anastomosis. Dig Dis Sci 2012;57:1544–53. http://dx.doi.org/10.1007/s10620-012-2050-6.

[33] Tyler AD, Milgrom R, Xu W, Stempak JM, Steinhart AH, McLeod RS, et al. Antimicrobial antibodies are associated with a Crohn's disease-like phenotype after ileal pouch-anal anastomosis. Clin Gastroenterol Hepatol 2012;10:507-12.e1. http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2011.09.016.

[34] Petersen AM, Schou C, Mirsepasi H, Engberg J, Friis-Møller A, Nordgaard-Lassen I, et al. Seroreactivity to *E. coli* outer membrane protein C antibodies in active inflammatory bowel disease; diagnostic value and correlation with phylogroup B2 *E. coli* infection. Scand J Gastroenterol 2012;47:155–61. http://dx.doi.org/10.3109/00365521.2011.639080.

[35] Iltanen S, Tervo L, Halttunen T, Wei B, Braun J, Rantala I, et al. Elevated serum anti-I2 and anti-OmpW antibody levels in children with IBD. Inflamm Bowel Dis 2006;12:389–94. http://dx.doi.org/10.1097/01.MIB.0000218765.84087.42.

[36] Lichtenstein GR, Targan SR, Dubinsky MC, Rotter JI, Barken DM, Princen F, et al. Combination of genetic and quantitative serological immune markers are associated with complicated Crohn's disease behavior. Inflamm Bowel Dis 2011;17:2488–96. http://dx.doi.org/10.1002/ibd.21661.

[37] Targan SR, Landers CJ, Yang H, Lodes MJ, Cong Y, Papadakis KA, et al. Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease. Gastroenterology 2005;128:2020–8.

[38] Fleshner P, Ippoliti A, Dubinsky M, Vasiliauskas E, Mei L, Papadakis KA, et al. Both preoperative perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody and anti-CBir1 expression in ulcerative colitis patients influence pouchitis development after ileal pouch-anal anastomosis. Clin Gastroenterol Hepatol 2008;6:561–8. http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2008.01.002.

[39] Truta B, Li DX, Mahadevan U, Fisher ER, Chen Y-Y, Grace K, et al. Serologic markers associated with development of Crohn's disease after ileal pouch anal anastomosis for ulcerative colitis. Dig Dis Sci 2014;59:135–45. http://dx.doi.org/10.1007/s10620-013-2866-8.

[40] Ryan JD, Silverberg MS, Xu W, Graff LA, Targownik LE, Walker JR, et al. Predicting complicated Crohn's disease and surgery: phenotypes, genetics, serology and psychological characteristics of a population-based cohort. Aliment Pharmacol Ther 2013;38:274–83. http://dx.doi.org/10.1111/apt.12368.

[41] Schoepfer AM, Schaffer T, Mueller S, Flogerzi B, Vassella E, Seibold-Schmid B, et al. Phenotypic associations of Crohn's disease with antibodies to flagellins A4-Fla2 and Fla-X, ASCA, p-ANCA, PAB, and NOD2 mutations in a Swiss cohort. Inflamm Bowel Dis 2009;15:1358–67. http://dx.doi.org/10.1002/ibd.20892.

[42] Dotan I, Fishman S, Dgani Y, Schwartz M, Karban A, Lerner A, et al. Antibodies against laminaribioside and chitobioside are novel serologic markers in Crohn's disease. Gastroenterology 2006;131:366–78. http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2006.04.030.

[43] Papp M, Altorjay I, Dotan N, Palatka K, Foldi I, Tumpek J, et al. New serological markers for inflammatory bowel disease are associated with earlier age at onset, complicated disease behavior, risk for surgery, and NOD2/CARD15 genotype in a Hungarian IBD cohort. Am J Gastroenterol 2008;103:665–81. http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01652.x.

[44] Roggenbuck D, Hausdorf G, Martinez-Gamboa L, Reinhold D, Buttner T, Jungblut PR, et al. Identification of GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, as the autoantigen of pancreatic antibodies in Crohn's disease. Gut 2009;58:1620–8. http://dx.doi.org/10.1136/gut.2008.162495.

[45] Komorowski L, Teegen B, Probst C, Aulinger-Stöcker K, Sina C, Fellermann K, et al. Autoantibodies against exocrine pancreas in Crohn's disease are directed against two antigens: the glycoproteins CUZD1 and GP2. J Crohns Colitis 2013;7:780–90. http://dx.doi.org/10.1016/j.crohns.2012.10.011.

[46] Bogdanos DP, Rigopoulou EI, Smyk DS, Roggenbuck D, Reinhold D, Forbes A, et al. Diagnostic value, clinical utility and pathogenic significance of reactivity to the molecular targets of Crohn's disease specific-pancreatic autoantibodies. Autoimmun Rev 2011;11:143–8. http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2011.09.004.

[47] Werner L, Paclik D, Fritz C, Reinhold D, Roggenbuck D, Sturm A. Identification of pancreatic glycoprotein 2 as an endogenous immunomodulator of innate and adaptive immune responses. J Immunol 2012;189:2774–83. http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1103190.

[48] Roggenbuck D, Reinhold D, Werner L, Schierack P, Bogdanos DP, Conrad K. Glycoprotein 2 antibodies in Crohn's disease. Adv. Clin. Chem., vol. 60. Elsevier; 2013 187–208.

[49] Yu S, Lowe AW. The pancreatic zymogen granule membrane protein, GP2, binds *Escherichia coli* type 1 Fimbriae. BMC Gastroenterol 2009;9:58. http://dx.doi.org/10.1186/1471-230X-9-58.

[50] Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, Ebisawa M, et al. Uptake through glycoprotein 2 of FimH+ bacteria by M cells initiates mucosal immune response. Nature 2009;462:226–30. http://dx.doi.org/10.1038/nature08529.

[51] Roggenbuck D, Reinhold D, Wex T, Goihl A, von Arnim U, Malfertheiner P, et al. Autoantibodies to GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, are new markers in Crohn's disease. Clin Chim Acta 2011;412:718–24. http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2010.12.029.

Author's personal copy

[52] Egea L, Hirata Y, Kagnoff MF. GM-CSF: a role in immune and inflammatory reactions in the intestine. Expert Rev Gastroenterol Hepatol 2010;4:723–31. http://dx.doi.org/10.1586/egh.10.73.

[53] Bernasconi E, Favre L, Maillard MH, Bachmann D, Pythoud C, Bouzourene H, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor elicits bone marrow-derived cells that promote efficient colonic mucosal healing. Inflamm Bowel Dis 2010;16:428–41. http://dx.doi.org/10.1002/ibd.21072.

[54] Egea L, McAllister CS, Lakhdari O, Minev I, Shenouda S, Kagnoff MF. GM-CSF produced by nonhematopoietic cells is required for early epithelial cell proliferation and repair of injured colonic mucosa. J Immunol Baltim Md 1950 2013;190:1702–13. http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1202368.

[55] Däbritz J. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor and the intestinal innate immune cell homeostasis in Crohn's disease. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2014;306:G455–65. http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00409.2013.

[56] Korzenik JR, Dieckgraefe BK, Valentine JF, Hausman DF, Gilbert MJ, Sargramostim in Crohn's Disease Study Group. Sargramostim for active Crohn's disease. N Engl J Med 2005;352:2193–201. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa041109.

[57] Jurickova I, Collins MH, Chalk C, Seese A, Bezold R, Lake K, et al. Paediatric Crohn disease patients with stricturing behaviour exhibit ileal granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) autoantibody production and reduced neutrophil bacterial killing and GM-CSF bioactivity. Clin Exp Immunol 2013;172:455–65. http://dx.doi.org/10.1111/cei.12076.

[58] Han X, Uchida K, Jurickova I, Koch D, Willson T, Samson C, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies in murine ileitis and progressive ileal Crohn's disease. Gastroenterology 2009;136:1261-71.e3. http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2008.12.046.

[59] Homsak E, Micetić-Turk D, Bozic B. Autoantibodies pANCA, GAB and PAB in inflammatory bowel disease: prevalence, characteristics and diagnostic value. Wien Klin Wochenschr 2010;122(Suppl. 2):19–25. http://dx.doi.org/10.1007/s00508-010-1344-y.

[60] Lawrance IC, Hall A, Leong R, Pearce C, Murray K. A comparative study of goblet cell and pancreatic exocine autoantibodies combined with ASCA and pANCA in Chinese and Caucasian patients with IBD. Inflamm Bowel Dis 2005;11:890–7.

[61] Romas E, Paspaliaris B, d' Apice AJ, Elliott PR. Autoantibodies to neutrophil cytoplasmic (ANCA) and endothelial cell surface antigens (AECA) in chronic inflammatory bowel disease. Aust N Z J Med 1992;22:652–9.

[62] Naser SA, Hulten K, Shafran I, Graham DY, El-Zaatari FA. Specific seroreactivity of Crohn's disease patients against p35 and p36 antigens of *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Vet Microbiol 2000;77:497–504.

[63] Wei B, Dalwadi H, Gordon LK, Landers C, Bruckner D, Targan SR, et al. Molecular cloning of a *Bacteroides caccae* TonB-linked outer membrane protein identified by an inflammatory bowel disease marker antibody. Infect Immun 2001;69:6044–54. http://dx.doi.org/10.1128/IAI.69.10.6044-6054.2001.

[64] Sakiyama T, Fujita H, Tsubouchi H. Autoantibodies against ubiquitination factor E4A (UBE4A) are associated with severity of Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 2008;14:310–7. http://dx.doi.org/10.1002/ibd.20328.

[65] Faubion WA, Fletcher JG, O'Byrne S, Feagan BG, de Villiers WJ, Salzberg B, et al. EMerging BiomARKers in inflammatory bowel disease (EMBARK) study identifies fecal calprotectin, serum MMP9, and serum IL-22 as a novel combination of biomarkers for Crohn's disease activity: role of cross-sectional imaging. Am J Gastroenterol 2013;108:1891–900. http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2013.354.

[66] Prideaux L, Kamm MA, De Cruz P, van Langenberg DR, Ng SC, Dotan I. Inflammatory bowel disease serology in Asia and the West. World J Gastroenterol 2013;19:6207–13. http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v19.i37.6207.

[67] Rieder F, Hahn P, Finsterhoelzl L, Schleder S, Wolf A, Dirmeier A, et al. Clinical utility of anti-glycan antibodies in pediatric Crohn's disease in comparison with an adult cohort. Inflamm Bowel Dis 2012;18:1221–31. http://dx.doi.org/10.1002/ibd.21854.

[68] Rieder F, Schleder S, Wolf A, Dirmeier A, Strauch U, Obermeier F, et al. Association of the novel serologic anti-glycan antibodies anti-laminarin and anti-chitin with complicated Crohn's disease behavior. Inflamm Bowel Dis 2010;16:263–74. http://dx.doi.org/10.1002/ibd.21046.

[69] Koutroubakis IE, Drygiannakis D, Tsirogianni A, Oustamanolakis P, Karmiris K, Papamichael K, et al. Antiglycan antibodies in Greek patients with inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci 2010;56:845–52. http://dx.doi.org/10.1007/s10620-010-1328-9.

[70] Simondi D, Mengozzi G, Betteto S, Bonardi R, Ghignone RP, Fagoonee S, et al. Antiglycan antibodies as serological markers in the differential diagnosis of inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2008;14:645–51. http://dx.doi.org/10.1002/ibd.20368.

[71] Seow CH, Stempak JM, Xu W, Lan H, Griffiths AM, Greenberg GR, et al. Novel anti-glycan antibodies related to inflammatory bowel disease diagnosis and phenotype. Am J Gastroenterol 2009;104:1426–34. http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2009.79.

[72] Rieder F, Schleder S, Wolf A, Dirmeier A, Strauch U, Obermeier F, et al. Serum anti-glycan antibodies predict complicated Crohn's disease behavior: a cohort study. Inflamm Bowel Dis 2010;16:1367–75. http://dx.doi.org/10.1002/ibd.21179.

[73] Malickova K, Lakatos PL, Bortlik M, Komarek V, Janatkova I, Lukas M. Anticarbohydrate antibodies as markers of inflammatory bowel disease in a Central European cohort. Eur J Gastroenterol Hepatol 2010;22:144–50.

[74] Henckaerts L, Pierik M, Joossens M, Ferrante M, Rutgeerts P, Vermeire S. Mutations in pattern recognition receptor genes modulate seroreactivity to microbial antigens in patients with inflammatory bowel disease. Gut 2007;56:1536–42. http://dx.doi.org/10.1136/gut.2007.125468.

[75] Rejchrt S, Drahosová M, Kopácová M, Cyrany J, Douda T, Pintér M, et al. Antilaminaribioside and antichitobioside antibodies in inflammatory bowel disease. Folia Microbiol (Praha) 2008;53:373–6. http://dx.doi.org/10.1007/s12223-008-0058-2.

[76] Ferrante M, Henckaerts L, Joossens M, Pierik M, Joossens S, Dotan N, et al. New serological markers in inflammatory bowel disease are associated with complicated disease behaviour. Gut 2007;56:1394–403. http://dx.doi.org/10.1136/gut.2006.108043.

[77] Kaul A, Hutfless S, Liu L, Bayless TM, Marohn MR, Li X. Serum anti-glycan antibody biomarkers for inflammatory bowel disease diagnosis and progression: a systematic review and meta-analysis. Inflamm Bowel Dis 2012;18:1872–84. http://dx.doi.org/10.1002/ibd.22862.

[78] Vandewalle-El Khoury P, Colombel J-F, Joossens S, Standaert-Vitse A, Collot M, Halfvarson J, et al. Detection of antisynthetic mannoside antibodies (ASigmaMA) reveals heterogeneity in the ASCA response of Crohn's disease patients and contributes to differential diagnosis, stratification, and prediction. Am J Gastroenterol 2008;103:949–57. http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01648.x.

[79] Beéck KOD, Vermeire S, Rutgeerts P, Bossuyt X. Antibodies to GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, in inflammatory bowel diseases. Gut 2012;61:162–4. http://dx.doi.org/10.1136/gut.2010.233148.

[80] Pavlidis P, Romanidou O, Roggenbuck D, Mytilinaiou MG, Al-Sulttan F, Liaskos C, et al. Ileal inflammation may trigger the development of GP2-specific pancreatic autoantibodies in patients with Crohn's disease. Clin Dev Immunol 2012;2012:1–8. http://dx.doi.org/10.1155/2012/640835.

[81] Bogdanos D, Roggenbuck D, Reinhold D, Wex T, Pavlidis P, von Arnim U, et al. Pancreatic-specific autoantibodies to glycoprotein 2 mirror disease location and behaviour in younger patients with Crohn's disease. BMC Gastroenterol 2012;12:102.

[82] Pavlidis P, Forbes A, Bogdanos DP. Antibodies to glycoprotein 2 (GP2) in patients with inflammatory bowel diseases from UK. Clin Chim Acta 2011;412:1163–4. http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2011.02.005.

[83] Gross S, Bakker SF, van Bodegraven AA, van Hoogstraten IMW, Gelderman KA, Bouma G, et al. Increased IgA glycoprotein-2 specific antibody titres in refractory celiac disease. J Gastrointestin Liver Dis 2014;23:127–33.

[84] Bonaci-Nikolic B, Spuran M, Andrejevic S, Nikolic M. Autoantibodies to GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, in patients with gluten-sensitive enteropathy: a possible serological trap. Clin Chim Acta 2012;413:822–3. http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2012.01.005.

[85] Roggenbuck D, Bogdanos D, Conrad K. Loss of tolerance to one or two major targets in Crohn's disease or just cross-reactivity? J Crohns Colitis 2013;7:e273–4. http://dx.doi.org/10.1016/j.crohns.2012.12.013.

[86] Gathungu G, Kim M-O, Ferguson JP, Sharma Y, Zhang W, Ng SME, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies: a marker of aggressive Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 2013;19:1671–80. http://dx.doi.org/10.1097/MIB.0b013e318281f506.

[87] Dykes DMH, Towbin AJ, Bonkowski E, Chalk C, Bezold R, Lake K, et al. Increased prevalence of luminal narrowing and stricturing identified by enterography in pediatric Crohn's disease patients with elevated granulocyte-macrophage colony stimulating factor autoantibodies. Inflamm Bowel Dis 2013;19:2146–54. http://dx.doi.org/10.1097/MIB.0b013e31829706e0.

[88] Däbritz J, Bonkowski E, Chalk C, Trapnell BC, Langhorst J, Denson LA, et al. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor auto-antibodies and disease relapse in inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 2013;108:1901–10. http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2013.360.

[89] Nylund CM, D'Mello S, Kim M-O, Bonkowski E, Däbritz J, Foell D, et al. Granulocyte macrophage-colony-stimulating factor autoantibodies and increased intestinal permeability in Crohn disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2011;52:542–8. http://dx.doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181fe2d93.

[90] Ferrante M, Declerck S, Coopmans T, De Hertogh G, Van Assche G, Penninckx F, et al. Development of pouchitis following ileal pouch-anal anastomosis (IPAA) for ulcerative colitis: a role for serological markers and microbial pattern recognition receptor genes. J Crohns Colitis 2008;2:142–51. http://dx.doi.org/10.1016/j.crohns.2007.10.003.

[91] Werner L, Sturm A, Roggenbuck D, Yahav L, Zion T, Meirowithz E, et al. Antibodies against glycoprotein 2 are novel markers of intestinal inflammation in patients with an ileal pouch. J Crohns Colitis 2013;7:e522–32. http://dx.doi.org/10.1016/j.crohns.2013.03.009.

[92] Pavlidis P, Forbes A, Bogdanos DP. Anti-GP2 antibodies in inflammatory bowel disease patients with ileal pouch. J Crohns Colitis 2013;7:e602–3. http://dx.doi.org/10.1016/j.crohns.2013.06.010.

[93] Somma V, Ababneh H, Ababneh A, Gatti S, Romagnoli V, Bendia E, et al. The novel Crohn's disease marker anti-GP2 antibody is associated with ileocolonic location of disease. Gastroenterol Res Pract 2013;2013:1–7. http://dx.doi.org/10.1155/2013/683824.

[94] Roggenbuck D, Reinhold D, Wex T, von Arnim U, Malfertheiner P, Sturm A, et al. Authors' response: antibodies to GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, are specific for Crohn's disease and may reflect treatment response. Gut 2011. http://dx.doi.org/10.1136/gut.2010.237214 [gut.2010.237214].

[95] Rieder F, Lopez R, Franke A, Wolf A, Schleder S, Dirmeier A, et al. Characterization of changes in serum anti-glycan antibodies in Crohn's Disease — a longitudinal analysis. PLoS One 2011;6:e18172. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018172.

[96] Joossens M, Van Steen K, Branche J, Sendid B, Rutgeerts P, Vasseur F, et al. Familial aggregation and antimicrobial response dose-dependently affect the risk for Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 2010;16:58–67. http://dx.doi.org/10.1002/ibd.20985.

[97] Lakatos PL, Altorjay I, Mándi Y, Lakatos L, Tumpek J, Kovacs A, et al. Interaction between seroreactivity to microbial antigens and genetics in Crohn's disease: is there a role for defensins? Tissue Antigens 2008;71:552–9. http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0039.2008.01049.x.

Annexes

Author's personal copy

[98] Roggenbuck D, Humbel R-L, Reinhold D, Bogdanos DP, Conrad K, Laass MW. Glycoprotein 2 antibodies in inflammatory bowel disease: no association with disease phenotype? J Pediatr Gastroenterol Nutr 2013;56:e5. http://dx.doi.org/10.1097/MPG.0b013e318275fa77.

[99] Lakatos PL, Altorjay I, Szamosi T, Palatka K, Vitalis Z, Tumpek J, et al. Pancreatic autoantibodies are associated with reactivity to microbial antibodies, penetrating disease behavior, perianal disease, and extraintestinal manifestations, but not with NOD2/CARD15 or TLR4 genotype in a Hungarian IBD cohort. Inflamm Bowel Dis 2009;15:365–74. http://dx.doi.org/10.1002/ibd.20778.

Neutrophil-mediated IFN activation in the bone marrow alters B cell development in human and murine systemic lupus erythematosus.

In appropriate activation of type I IFN plays a key role in the pathogenesis of autoimmune disease, including systemic lupus erythematosus (SLE). In this study, Palanichamy A. et al (J Immunol. 2014; 192(3): 906-18) report on the presence of IFN activation in SLE bone marrow (BM), as measured by an IFN gene signature, increased IFN regulated chemokines, and direct production of IFN by BM-resident cells, associated with profound changes in B cell development. The majority of SLE patients had an IFN signature in the BM that was more pronounced than the paired peripheral blood and correlated with both higher autoantibodies and disease activity. Pronounced alterations in B cell development were noted in SLE in the presence of an IFN signature with a reduction in the fraction of pro/pre-B cells, suggesting an inhibition in early B cell development and an expansion of B cells at the transitional stage. These B cell changes strongly correlated with an increase in BAFF and APRIL expression in the IFN-high BM. Furthermore, they found that BM neutrophils in SLE were prime producers of IFN-α and B cell factors. In NZM lupus-prone mice, similar changes in B cell development were observed and mediated by IFN, given abrogation in NZM mice lacking type-I IFNR. BM neutrophils were abundant, responsive to, and producers of IFN, in close proximity to B cells. These results indicate that the BM is an important but previously unrecognized target organ in SLE with neutrophil-mediated IFN activation and alterations in B cell ontogeny and selection.

Résumé

L'utilisation d'agents anti-TNF a grandement amélioré la prise en charge de certaines maladies inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde (PR) ou les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Cependant, le quart des patients environ ne vont pas répondre au traitement ou présenteront une perte de réponse secondaire. Des marqueurs prédictifs de réponse sont nécessaires afin limiter les effets secondaires et les coûts inutiles en ciblant les patients qui pourraient être améliorés par les anti-TNF.
Ces travaux de recherche se sont dans un premier temps concentrés sur l'importance de l'immunogénicité de ces traitements. Des anticorps anti-médicaments (ADAs) étaient bien associés à un taux bas d'anti-TNF avec des conséquences cliniques en termes de perte de réponse clinique et d'absence de cicatrisation muqueuse dans les MICI. Des seuils cliniques d'interprétation des tests biologiques pour la détection du médicament et de ses anticorps ont pu être définis et correspondent à 4.9 µg/ml pour l'infliximab et 200 ng/ml pour les ADAs. Ces résultats obtenus par ELISA sont bien corrélés avec les tests fonctionnels réalisés en parallèle et confirment l'intérêt de cette technique dans ce dépistage. Les ADAs étaient diminués par traitement immunosuppresseur concomitant.
Ensuite, la persistance d'une infection chronique mise en évidence par des anticorps anti-bactériens a été évaluée en tant que marqueur prédictif de réponse aux anti-TNF. Aucun résultat statistiquement significatif n'a pu être relevé sur ces premières données, que ça soit pour les anticorps dirigés contre la flore intestinale pour les MICI ou contre le microbiote oral dans la PR. Seul un taux élevé de MMP-3 à l'initiation de l'infliximab chez les patients PR prédisait d'une bonne réponse clinique selon les critères de l'EULAR par la suite.

Summary

The use of anti-TNF agents has greatly improved the management of chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis (RA), or chronic inflammatory bowel disease (IBD). However, about a quarter of patients will not respond to treatment or will present a secondary loss of response. Predictive biomarkers of response are needed to reduce side effects and unnecessary costs by targeting patients that could be improved by anti-TNF.
This research work was initially focused on the importance of immunogenicity of these treatments. Anti-drug antibodies (ADAs) were well associated with low levels of anti-TNF with clinical consequences in terms of loss of clinical response and absence of mucosal healing in IBD. Clinical thresholds for drug and ADAs have been defined and correspond to 4.9 µg/ml for infliximab and 200 ng/ml for ADAS. These results obtained by ELISA correlate well with functional tests done in parallel, and confirm the value of this technique for screening. The ADAs were decreased with concomitant immunosuppressive therapy.
Then, the persistence of chronic infection as evidenced by anti-bacterial antibody was evaluated as a predictive marker for response to anti-TNF. No statistically significant results could be raised on these first data, for antibodies against the intestinal flora in IBD or against the oral microbiota in RA. Only high levels of MMP-3 at the initiation of infliximab in RA patients predicted a good clinical response according to the EULAR criteria.