

MPHA 15/2

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLEB – BLIDA 1 –



Dr. BOUDJELLA, M.L.
Maître Assistant
en Immunologie

Vu le 26/06/2014

FACULTE DE MEDECINE

DEPARTEMENT DE PHARMACIE.

PROFIL GENETIQUE DES MALADES ATTEINTS DE POLYATHRITE RHUMATOIDE

Mémoire de fin d'étude

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie

Session : juin 2014.

Présenté par :

- MEGUELLATI SARAH
- MAZOUZ MERIEM

Devant le jury :

- | | | |
|--------------------------------------|---------------------------------|--------------|
| - Président: Pr. A. MEGHIAOUI | Professeur en immunologie | CHU de Blida |
| - Encadreur: Dr.M.L.BOUDJELLA | Maitre assistant en immunologie | CHU de Blida |
| - Membres : Dr.Y.BOUCHEDOUB | Maitre assistant en immunologie | CHU de Blida |
| Dr.L.ZELTNI | Assistant en immunologie | CHU de Blida |

EXCLU DU PRET



Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

Nous exprimons nos profonds remerciements à notre promoteur, Docteur BOUDJELLA LOTFI qui nous a permis de bénéficier de son encadrement, pour l'orientation et les conseils qu'il nous a prodigué, pour sa patience et son encouragement. Son œil critique nous a été très précieux pour structurer ce travail.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Par l'occasion, nous tenons à remercier Professeur A. MEGHLAOUI, pour son accueil au sein de l'unité d'immunologie, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de siéger parmi les membres du jury.

Nous tenons également à remercier Docteur L. OULD ALI et Docteur L.M. ZLTNI, pour leurs multiples conseils et leur soutien affectif sans faille tout au long de ce travail.

Bien sûr on n'oublie pas de remercier toute l'équipe de l'unité d'immunologie, en particulier Monsieur Kharbach Mohammed, pour son aide et sa gentillesse.

On adresse une pensée spéciale à nos parents pour leur soutien dans nos choix et leur attention sans faille, ainsi qu'à nos familles, dont les encouragements et l'amour inconditionnel nous accompagnent depuis toujours.

Enfin, nos remerciements iront à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'exécution de ce travail dont l'empreinte restera plus encore dans nos mémoires, pour leurs conseils scientifiques, leurs aides, leurs talents, leurs motivations,...

Merci

Sommaire

I.	Introduction	
II.	Rappels bibliographiques	
1.	Système HLA	2
1.1.	Organisation génomique du système HLA	2
1.1.1.	Région HLA de classe I	2
1.1.2.	Région HLA de classe II	2
1.1.3.	Région HLA de classe III	3
1.2.	Structure des molécules HLA	3
1.2.1.	Molécules HLA classe I	3
1.2.2.	Molécules HLA classe II	4
1.3.	Synthèse des molécules HLA	5
1.3.1.	Molécules HLA classe I	5
1.3.2.	Molécules HLA classe II	6
1.4.	Expression cellulaire du système HLA	7
1.4.1.	Molécules HLA classe I	7
1.4.2.	Molécules HLA classe II	7
1.5.	Caractéristiques du système HLA	7
1.5.1.	Polymorphisme multigénique multiallélique	7
1.5.2.	Transmission codominante	10
1.5.3.	Déséquilibre de liaison	10
1.6.	Rôle du système HLA	10
1.6.1.	En physiologie	10
1.6.1.1.	Dans la tolérance immunitaire	10
1.6.1.2.	Immunosurveillance par les cellules NK des molécules HLA I	11
1.6.2.	En pathologie	12
1.6.2.1.	Dans la réponse immunitaire adaptative	12
1.6.2.2.	Immunologie des greffes	12
1.7.	Application du système HLA	12
1.7.1.	Association HLA et maladies	12
1.7.2.	Association HLA et PR	13
1.7.3.	Etude d'association HLA et PR	14
2.	Polyarthrite rhumatoïde	16
2.1.	Définition	16
2.2.	Epidémiologie	16
2.3.	Facteurs favorisants	17
2.3.1.	Facteurs génétiques	17
2.3.1.1.	Gènes HLA	18

2.3.1.2. Gènes non HLA.....	19
2.3.2. Facteurs hormonaux.....	22
2.3.3. Facteurs environnementaux.....	22
2.4. Immunopathologie.....	23
2.4.1. Phase de déclenchement.....	23
2.4.2. Phase de rupture de tolérance.....	25
2.4.3. Phase d'inflammation et recrutement cellulaire.....	27
2.4.4. Phase de destruction articulaire.....	31
2.4.5. Phase de réparation.....	32
2.5. Signes cliniques.....	33
2.5.1. Phase de début.....	33
2.5.2. Phase d'état.....	34
2.5.2.1. Manifestations articulaires.....	34
2.5.2.2. Manifestations extra-articulaires.....	35
2.6. Signes biologiques.....	35
2.6.1. Bilan inflammatoire.....	35
2.6.2. Bilan d'auto-immunité.....	36
2.7. Signes radiologiques.....	39
2.8. Diagnostic positif.....	40
2.9. Diagnostic différentiel.....	41
2.10. Evolution et pronostic.....	43
2.10.1. Evolution à long terme.....	43
2.10.2. Pronostic.....	44
2.11. Traitement.....	45
2.11.1. Traitement médicamenteux.....	45
2.11.1.1. Traitement symptomatique.....	45
2.11.1.2. Traitement de fond.....	46
2.11.1.3. Traitement par biothérapie.....	48
2.11.2. Traitement non médicamenteux.....	48
2.11.2.1. Traitements locaux.....	48
2.11.2.2. Réadaptation fonctionnelle.....	49
2.11.2.3. Education thérapeutique.....	49
III. Objectif	
1. Objectif principal.....	50
2. Objectifs secondaires.....	50
IV. Matériel et méthodes	
1. Matériel.....	51
1.1. Matériel biologique.....	51
1.1.1. Cadre et type d'étude.....	51
1.1.2. Population d'étude.....	51
1.2. Matériel non biologique.....	52
2. Méthodes.....	53
2.1. Bilan inflammatoire.....	53
2.2. Bilan d'auto-immunité.....	54

	2.3. Typage HLA.....	57
	2.4. Analyse statistique.....	60
V.	Résultats et discussion	
	1. Bilan inflammatoire.....	61
	2. Bilan d'auto-immunité.....	62
	3. Typage HLA.....	63
	3.1.. Les allèles HLA-DRB1 et la susceptibilité à la PR.....	63
	3.2. Epitope partagé et la susceptibilité à la PR.....	66
	3.3. Epitope partagé et la sévérité de la PR.....	67
	3.4. Epitope partagé et la production des auto-anticorps.....	68
VI.	Conclusion	
VII.	Bibliographie	
VIII.	Annexes	
	Résumé et mots clés	

Liste des figures

Figure 1 : Cartographie de la région HLA sur le chromosome 6 humain.....	2
Figure 2 : Schéma représentatif des gènes de la région HLA de classe I.....	2
Figure 3 : Schéma représentatif des gènes HLA de classe II.....	3
Figure 4 : Schéma représentatif des gènes HLA de classe III.....	3
Figure 5 : Schéma représentatif de la structure des molécules HLA de classe I.....	4
Figure 6 : Représentation du site de présentation d'antigène des molécules HLA I.....	4
Figure 7 : Représentation du site de présentation d'antigène des molécules HLA II.....	5
Figure 8 : Schéma représentatif de la structure des molécules HLA II.....	5
Figure 9 : Schéma représentatif des étapes de la synthèse des molécules HLA de classe I.....	6
Figure 10 : Schéma représentatif des étapes de la synthèse des molécules HLA de classe II...	7
Figure 11 : Le développement du nombre des allèles HLA entre 1968-2008.....	10
Figure 12 : La nomenclature selon la biologie moléculaire.....	11
Figure 13 : Les gènes impliqués dans la susceptibilité à PR.....	21
Figure 14 : Séquence de l'épitope partagé sur les différents allèles de susceptibilité.....	22
Figure 15 : Cristallographie de la molécules HLA-DR.....	22
Figure 16 : Représentation schématique d'une articulation normale ou rhumatoïde	34
Figure 17 : Schéma représentatif des étapes physiopathologique de la PR.....	36
Figure 18 : Action des lymphocytes TH ₁₇ sur les macrophages synoviaux.....	40
Figure 19 : PR à la phase de début.....	41
Figure 20 : PR en phase d'état, Déformation du pouce dite en Z – Synovite des MCP avec subluxation et déviation en coup de vent cubital des doigts.....	42
Figure 21 : Citrullination de l'arginine.....	47
Figure 22 : PR débutante, radiographie standard avec érosions marginales typiques des 2ème, 3ème et 4ème phalanges, déminéralisation épiphysaire et pincement débutant des 2 ^{ème} , 3 ^{ème} et 4 ^{ème} MCP.....	49
Figure 23 : Aspect radiographique typique d'une PR évoluée ; importantes lésions bilatérales de carpite à tendances fusionnantes, multiples arthropathies globalement bilatérales et symétriques des MCP et IPP.....	49
Figure 24 : Rapidité d'évolution des lésions articulaires radiologiques en fonction de l'ancienneté de la maladie. Cette évolution apparaît plus rapide au cours des 3 premières années (a) et se poursuit ensuite tout au long de la maladie (b) (ES= score d'érosions).....	55

Figure 25 : répartition de PR selon les tranches d'âge.....	65
Figure 26 : répartition de PR selon le sexe.....	65
Figure 27 : principe de la technique d'ELISA.....	69
Figure 28 : principe de la technique d'immunofluorescence indirecte.....	71
Figure 29 : les principales étapes de la réaction de PCR.....	73
Figure 30 : Lecture des résultats du typage HLA.....	74
Figure 31 : interprétation des résultats de la lecture par logiciel PCR/SSP.....	75
Figure 32 : répartition des PR selon les valeurs des VS de première et deuxième heure.....	77
Figure 33 : répartition des PR selon les résultats des CRP.....	77
Figure 34 répartitions des patients et témoins selon les résultats des FR.....	78
Figure 35 : répartitions des patients et témoins selon les résultats des ACCP.....	79
Figure 36 : Fréquences phénotypiques chez les patients et témoins.....	81
Figure 37 : Fréquences des allèles HLA-DRB1 chez les patients et témoins.....	82
Figure 38 : Répartition des allèles de l'EP chez les patients et témoins.....	83
Figure 39 : Répartition des allèles de l'EP selon les valeurs de DAS28.....	85
Figure 40 : Répartition des allèles de l'EP selon la présence des FR.....	86
Figure 41 : Répartition des allèles de l'EP selon la présence des ACCP.....	86

Liste des tableaux

Tableau 1 : les principales manifestations articulaires lors de la phase d'état.....	43
Tableau 2 : liste non exhaustive des principales manifestations extra-articulaires de polyarthrite rhumatoïde.....	44
Tableau 3 : Les critères de classification de la PR (ACR, 1987).....	51
Tableau 4 : Critères de classification ACR/EULAR 2010 de la polyarthrite rhumatoïde.....	51
Tableau 5 : Éléments de surveillance et effets indésirables des principales molécules utilisées dans la polyarthrite rhumatoïde.....	60
Tableau 6 : Répartition des fréquences phénotypiques (FP) chez les patients et témoins.....	80
Tableau 7 : Répartition des fréquences alléliques (FA) chez les patients et témoins.....	81
Tableau 8 : Répartition des allèles HLA-DRB1*SE+ chez les patients et témoins.....	83
Tableau 9 : Répartition des allèles de l'épitope partagé selon les valeurs de DAS28.....	84
Tableau 10 : Association des allèles de l'EP et la production des FR dans différents études..	87

Liste des abréviations

ACCP: Anticorps anti-peptides citrullinées

ACR: American College of Rheumatology

Ag : Antigène

BCR : Récepteur du lymphocyte B

β2m : β : 2 microglobulines

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CLIP: Class II associated invariant Chain peptide

CPA : Cellules Présentatrice d'Antigène

C4A/B : Complément 4 A/B

CTLA4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

DMARDS: Disease-modifying antirheumatic drugs

ELISA: Enzym Linked ImmunoSorbent Assay

EP: Épitope Partagé

EULAR: European League Against Rheumatism

FR: Facteur Rhumatoïde

HAQ: Health Assessment Questionnaire.

HFE: High Fe Gene

HLA: Human Leucocyte Antigen

IEF : Isoélectrofocalisation

IFI : Immunofluorescence indirecte

Ig : Immunoglobuline

IPP : Interphalangiennes proximales

LMP1, 2: Latent Membrane Protein

LB : Lymphocyte B

LT : Lymphocyte T

Lt β : Lymphotoxine β

Mb : Mégabases

MCP : Métacarpo-phalangiennes

MICA/B : MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A/B

MMPs : Métalloprotéinases

MTP: Métatarso-phalangiennes

MTX : Méthotrexate

NK: Natural Killers

PAMPS: Pathogen-associated microbia pattern

PCR-SBT: Polymerase chain reaction

PCR-SSP: Polymerase chain reaction sequence specific primer

PR: Polyarthrite Rhumatoide

PTPN22: Protein Tyrosin Phosphatase Nonreceptor 22

RE : Réticulum endoplasmique

RFLP : Restriction fragment length polymorphism

STAT4: Signal Transducer and Activator of Transcription 4

SE: Shared Epitope

TAP1, 2: Transporter-associated with Antigen Processing

TCR: Récepteur du lymphocyte T

TGF β : Transforming Growth Factor β

TNF α : Tumor necrosis factor α

I. INTRODUCTION

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie inflammatoire de l'ensemble du tissu conjonctif à prédominance synovial (1). C'est la plus fréquente des rhumatismes inflammatoires chroniques de l'adulte, touchant 0,5 à 1 % de la population générale et peut survenir à tout âge, plus particulièrement entre 35 et 55 ans avec une prédominance féminine. La polyarthrite rhumatoïde représente un véritable problème de santé publique (168).

Elle est caractérisée par une atteinte polyarticulaire bilatérale, symétrique, déformante et destructrice évoluant par poussées vers une aggravation progressive responsable d'un handicap fonctionnel majeur et réduit l'espérance de vie (141).

La PR est également une maladie systémique, véritable connectivite, pouvant s'accompagner de manifestations extra-articulaires (cardiaques, pulmonaires, vasculaires, nerveuses, oculaires...) ayant parfois des répercussions sur le pronostic vital (1).

C'est une maladie auto-immune complexe, hétérogène, multifactorielle, dans laquelle plusieurs facteurs interviennent dans le déclenchement de la maladie. Il existe un terrain génétique prédisposant à hauteur de 30 % ainsi que des facteurs environnementaux et hormonaux.

Les facteurs génétiques font actuellement l'objet de recherches portant sur l'ensemble du génome pour déterminer le(s) gène(s) d'intérêt dans la PR. Au sein des facteurs génétiques, la région HLA de classe II et surtout le locus HLA-DRB1 semblent tenir une place de choix. Ces facteurs contribuent à la susceptibilité et à la sévérité de la PR selon certains auteurs (67). Le développement et l'utilisation des techniques de biologie moléculaire ont permis de démontrer l'extraordinaire polymorphisme et la diversité du système HLA.

L'objectif de notre travail est de rechercher une association entre les allèles HLA classe II chez nos patients atteints de PR en comparaison à un groupe témoin et la susceptibilité à la PR.

II. RAPPELS

BIBLIOGRAPHIQUES

1. Système HLA :

C'est le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou système HLA (Human Leucocyte Antigen) chez l'homme. C'est un système multigénique constitué d'un ensemble de gènes étroitement liés et localisé sur le bras court du chromosome 6 sur une distance totale de 4 mégabases (Mb). Ces gènes codent pour des molécules exprimées à la surface des cellules et impliquées dans la reconnaissance des antigènes (40).

C'est un système hautement polymorphe, à l'origine du déclenchement de la réponse immunitaire de rejet lors d'allogreffe.

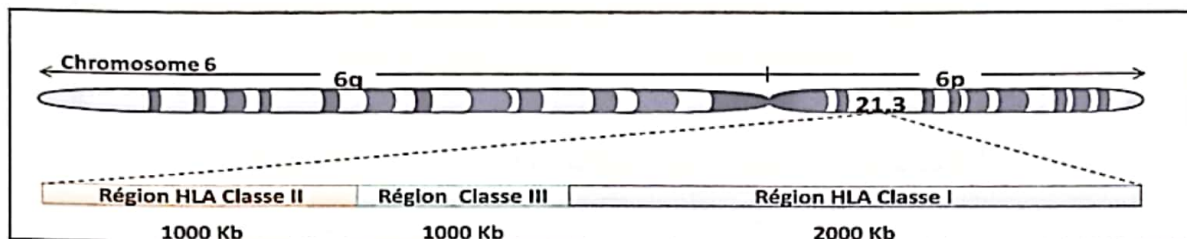


Figure1 : Cartographie de la région HLA sur le chromosome 6 humain (201).

1.1. Organisation génomique du système HLA:

Il est composé de trois régions :

1.1.1. Région HLA de classe I:

Les gènes qui codent pour les molécules HLA I sont composée de huit parties codantes (Exons) séparées par des parties non codantes (Introns). Cette région, la plus télomérique, comporte des gènes qui codent pour les molécules HLA classiques (tels que HLA-A, B et C), des gènes qui codent pour les molécules HLA non classiques (tels que HLA-E, F, G) ainsi que des gènes qui codent pour des molécules apparentées (MICA, MICB) et autres comme le gène HFE (137).

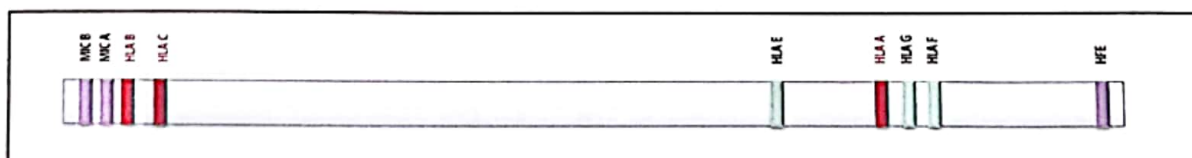


Figure 2 : Schéma représentatif des gènes de la région HLA de classe I

1.1.2. Région IIIA de classe II :

Les gènes qui codent les molécules HLA II sont composés de cinq ou six exons séparés par des régions introniques. Cette région, la plus centromérique, code pour les molécules HLA de classe II (HLA-DR, DQ et DP) ainsi que pour des molécules impliquées dans la synthèse des molécules HLA I (tels que les molécules de transport TAP1, TAP2 et les protéasome LMP2, LMP7). Pour chaque locus (DR, DQ, DP), il existe 2 gènes, un gène codant pour la chaîne α et un gène codant pour la chaîne β (31).

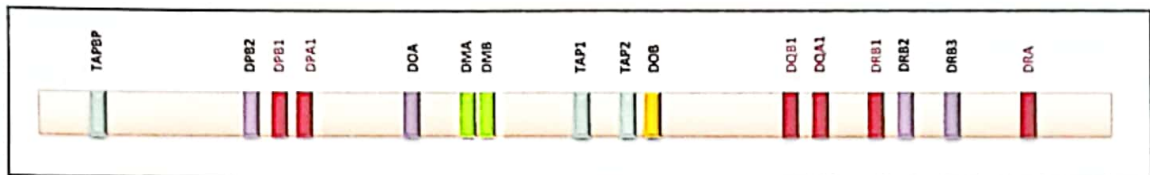


Figure 3 : Schéma représentatif des gènes HLA de classe II

1.1.3.. Région de classe III : Elle est située entre la région classe I et région classe II.

Elle comporte :

- Des gènes n'ayant aucun rôle dans la réponse immunitaire (hydrolase, hormones stéroïdiennes).
- Des gènes impliqués dans la réponse immunitaire : protéines du complément (C4A, C4B), $\text{TNF}\alpha$ et Lt (137).



Figure 4 : Schéma représentatif des gènes HLA de classe III

1.2. Structure des molécules HLA :

Les molécules HLA sont des glycoprotéines exprimées à la surface cellulaire et appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (37).

1.2.1. Les molécules HLA de classe I :

Les gènes HLA de classe I codent pour la chaîne lourde α des molécules de classe I, associée de manière non covalente à la $\beta 2m$, chaîne dite légère non codée par le CMH mais plutôt par un gène situé sur le chromosome 15 (196). La chaîne lourde α comporte une partie intra-cytoplasmique, une partie transmembranaire et une partie extracellulaire composée de trois domaines ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$).

Les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ constituent un sillon, dont le fond est constitué de feuillets β plissés antiparallèles et des parois d'hélice α (73).

Les 2 extrémités du site de présentation peptidique sont fermées, ce qui limite la taille des peptides insérés à (9-13) acides aminés. Le peptide antigénique s'insère dans ce sillon, notamment grâce à des acides aminés qui constituent des résidus d'ancrage spécifiques. Les peptides inclus dans une molécule HLA ont une certaine homogénéité au niveau des sites d'ancrage spécifiques. Pour les molécules HLA classe I, ce sont souvent le site d'ancrage C-terminal (P9) et le site d'ancrage au niveau du deuxième acide aminé N-terminal (P2) qui conditionnent la spécificité d'interaction entre la molécule HLA et le peptide qui s'y fixe (31).

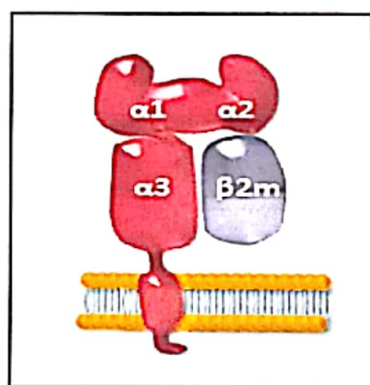


Figure 5: Schéma représentatif de la structure des molécules HLA I

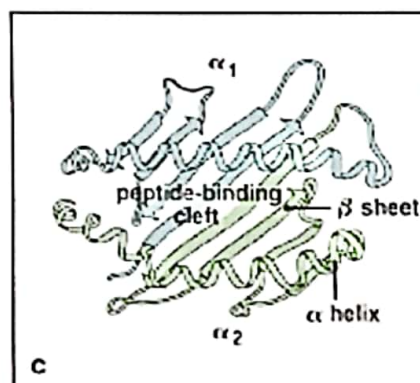


Figure 6: Représentation du site de présentation d'antigène des molécules HLA I (214).

1.2.2. Les molécules HLA de classe II :

Elles sont formées de l'association non covalente d'une chaîne lourde α et d'une chaîne légère β codées par le même locus mais de deux gènes différents. Contrairement aux molécules HLA classe I, les chaînes α et β sont parfaitement homologues constituées, toutes les deux, d'une partie extra-membranaire, une partie transmembranaire et une partie intracytoplasmique (196).

Les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ (extra-membranaires) forment une cavité elle-même formée d'un fond à feuillet β plissés antiparallèles et de paroi à hélice α . Cavité qui accueille un peptide antigénique plus long. (32). Le peptide inséré dans la molécule HLA classe II est composé de 12-25 acides aminés et il réagit particulièrement au niveau de la cavité, par l'intermédiaire de 3 ou 4 résidus ancrés, situés dans la partie centrale du peptide (31 ; 186).

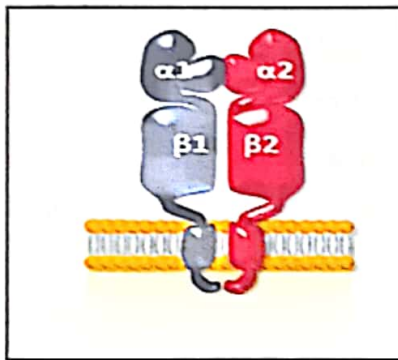


Figure 7 : Schéma représentatif de la structure des molécules HLA II (214)

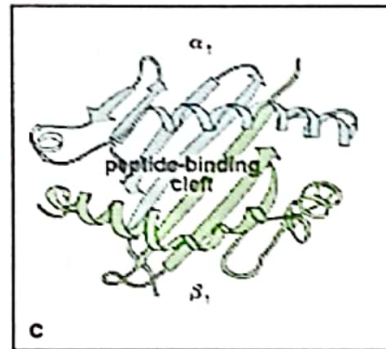


Figure 8: Représentation du site de présentation d'antigène des molécules HLA II

1.3. Synthèse des molécules HLA :

1.3.1. Les molécules HLA I :

Les peptides présentés par les molécules HLA I sont issus de l'apprêtement endogène [1] (72). Ils sont adressés au protéasome pour être dégradés en petits peptides de 8 à 10 acides aminés [2].

Le système ubiquitine-protéasome consiste en « l'étiquetage » des molécules à dégrader par différentes ubiquitines permettant leur adressage au complexe protéolytique.

Le protéasome est constitué de quatre sous-unités α et β portant des sites catalytiques. Ces sous-unités forment un cylindre dans lequel est confinée la digestion (pour éviter la dégradation d'autres protéines). En fonction du type cellulaire, les sous-unités peuvent varier, mais dans la plupart des cellules humaines, on retrouve les sous-unités MB1 et Delta. Pour les cellules spécialisées dans la présentation des peptides, elles sont remplacées par les sous-unités LMP2/LMP7.

Les gènes qui codent pour les sous-unités de l'immuno-protéasome sont présents au locus HLA du chromosome 6 (71 ; 114).

Le peptide passe ensuite au niveau de la lumière du réticulum endoplasmique (RE) grâce à l'hétérodimère TAP1/TAP2, qui constituent les deux sous unités d'un transporteur membranaire, permet la translocation énergie-dépendante. Il existe certaines contraintes pour ce transporteur, ce sont uniquement les peptides de 8 à 10 acides aminés qui peuvent passer [3] (191).

Les chaînes des molécules HLA classe I sont synthétisées de manière ubiquitaire et transportées jusqu'au RE. A ce niveau, les chaînes α sont instables, elles sont prises en charge par des protéines chaperonnes : la calnexine (stabilise la chaîne lourde) [4] et la calréticuline (stabilise le complexe chaîne lourde/chaîne légère) [5] (18)

Une tapasine associée à la chaîne α du CMH va se lier au TAP pour faire le pont entre le peptide et la molécule HLA I [6] (210).

Les peptides vont alors « s'essayer » dans la poche HLA I jusqu'à ce qu'un peptide d'assez bonne affinité soit trouvé. Dès lors, le complexe HLA I + peptide se sépare de la tapasine et de la calréticuline, et va migrer à travers le Golgi pour être exprimé à la surface des cellules où ils vont être reconnus par le TCR d'un LT CD8 [7] (210). (Voir figure 9)

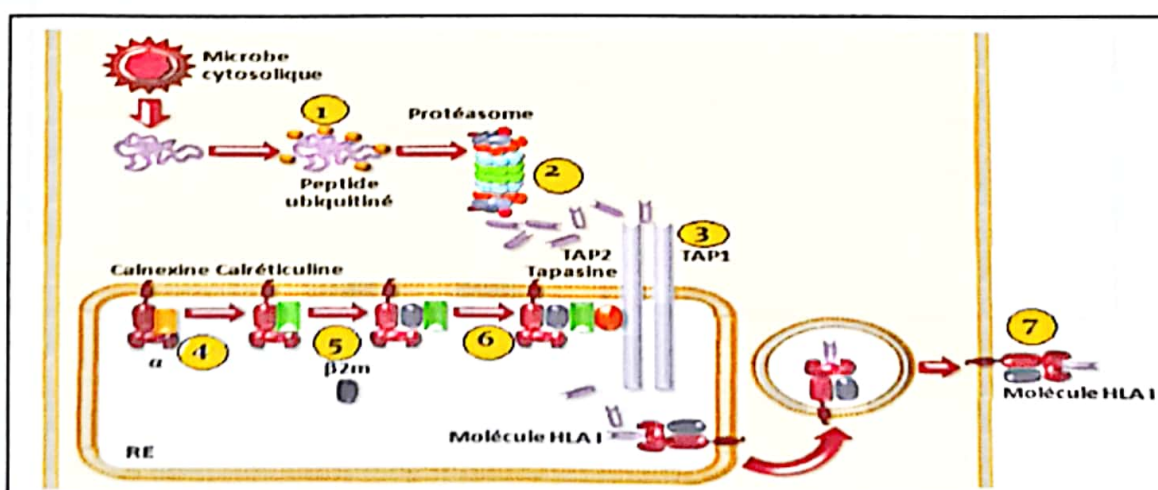


Figure 9 : Schéma représentatif des étapes de la synthèse des molécules HLA de classe I

1.3.2. Les molécules HLA II :

Les peptides présentés par les molécules HLA II sont de source exogène par endocytose [1]. Les endosomes précoces subissent une maturation, aboutissant à des endolysosomes dans lesquels les protéines sont dénaturées et dégradées en petits peptides par des protéases agissant à PH acide [2] (210).

Les chaîne des molécules HLA II sont synthétisées dans les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) sous forme de nonamères et transportées jusqu'au RE (105). Durant ce trajet, elles sont prises en charge par une chaîne invariante dite LI qui stabilise le complexe et assure sa sortie du RE et l'adressage de l'ensemble dans le compartiment endosomal, une partie de cette chaîne se loge dans la poche à peptide de la molécule HLA, c'est le CLIP (Class II associated invariant Chain peptide) [3] (48).

Certaines enzymes (Cathepsine) dégradent la chaîne LI dont il ne subsiste que le fragment CLIP en occupant le sillon jusqu'à sa rencontre avec l'antigène [4] (21,22)

L'assemblage peptide-molécule HLA se fait par la fusion des endolysosomes avec les vésicules contenant les molécules HLA II [5]. Dans le compartiment ainsi créé, une chaperonne HLA II-DM détruit le CLIP et optimise la liaison HLA II-peptide. Ce complexe est ensuite adressé à la surface des cellules où il va être reconnu par le TCR d'un LT CD4 [6] (210) (Voir figure 10).

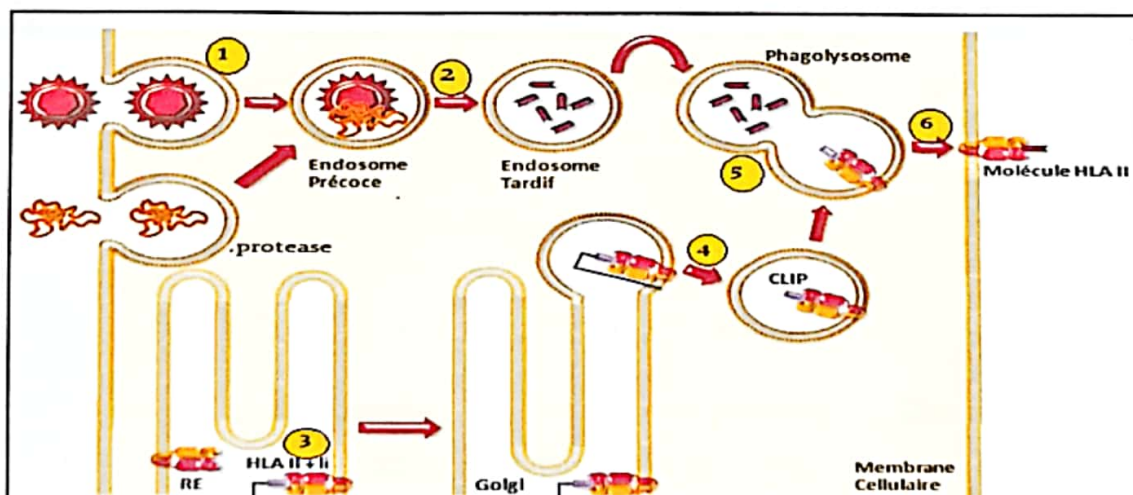


Figure 10 : Schéma représentatif des étapes de la synthèse des molécules HLA de classe II (210).

1.4. Expression cellulaire :

L'expression des gènes du CMH classique dépend de leur classe, du type cellulaire et elle est influencée par des cytokines pro-inflammatoires.

1.4.1. Les molécules HLA classe I :

Elles sont exprimées d'une façon ubiquitaire sur la quasi-totalité des cellules nucléées de l'organisme. Néanmoins, des variations quantitatives sont notables. Les lymphocytes T et B, les cellules dendritiques, les macrophages sont parmi les plus riches en molécules HLA classe I, ainsi que les épithéliums et les endothéliums vasculaires. Certains tissus expriment peu ses molécules (thyroïde, pancréas, muscle cardiaque) ou de manière indétectable (cornée, neurones) ou très variable (hépatocytes). Les globules rouges matures n'expriment pas de molécules HLA de classe I ou seulement de très faible quantité de certaines spécificités (HLA-A28, B7et B17) (196).

1.4.2. Les molécules HLA classe II :

Ces molécules sont exprimées de manière plus restreinte que celles de classe I. Elles sont exprimées sur les cellules présentatrices d'Ag, principalement à la surface des lymphocytes B, des cellules monocytaires, macrophagiques et dendritiques, qui sont toutes capables de présenter des peptides antigéniques aux lymphocytes T. Les précurseurs hématopoïétiques des globules rouges et des granulocytes sont HLA-II positifs puis se négatives. Enfin, il est admis que ce sont les molécules DR qui sont les plus présentées à la surface cellulaire par rapport aux molécules DQ et DP (196).

1.5. Les caractéristiques du système HLA :

1.5.1. Polymorphisme génétique multiallélique:

Les protéines HLA de classe I et II sont hautement polymorphes. Chaque gène HLA-A, HLA-B, HLA-C, DR, DP, DQ a de nombreux allèles (différences des séquences ADN, donc de composition peptidique) dans la population. La variabilité correspond au degré de différence entre deux gènes (ou molécules). Elle est mesurée par le pourcentage de nucléotides (ou acides aminés) différents entre les allèles considérés. Il existe un nombre considérable d'allèles pour l'ensemble des locus HLA de classe I et II. Le polymorphisme des molécules HLA-I et II est principalement localisé au niveau du site de liaison au peptide et sur

les hélices. Seuls les gènes DR β sont responsables du polymorphisme du composant HLA-DR. Par contre, le polymorphisme des molécules HLA de classe I est concentré dans trois zones, hypervariables, localisés dans les exons 2 et 3 et donc dans les parties correspondantes distales $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la molécule.

Les fréquences géniques des différents allèles codés par les gènes HLA-II ont été étudiées dans différentes populations à travers le monde. La distribution des différents allèles de classe II n'est pas uniforme dans la population mondiale et varie d'une population à l'autre (41 ; 98).

. Rôle du polymorphisme :

- Les molécules HLA sélectionnent les peptides ayant une forte affinité avec leur sillon antigénique.
- Plus un peptide antigénique aura une forte affinité avec un type HLA plus il sera présenté en grand nombre aux LT, donc plus la réponse immunitaire contre lui sera forte et vis versa.
- Certains types HLA ne peuvent pas induire de réponse immunitaire efficace contre certains antigènes, pathogènes ou non.
- Dans une population donnée, plus la variabilité HLA sera grande plus cette population aura de chance qu'une partie d'entre elle puisse se défendre efficacement contre un nouveau pathogène.

Le polymorphisme des molécules HLA a d'abord été décrit par des techniques sérologiques apportant une définition immunologique au phénotypage HLA. Puis la connaissance du polymorphisme a été améliorée grâce à des techniques biochimiques d'isoélectrofocalisation (IEF). Mais c'est surtout le développement des techniques de biologie moléculaire qui a permis et permet une bonne définition de ce polymorphisme.

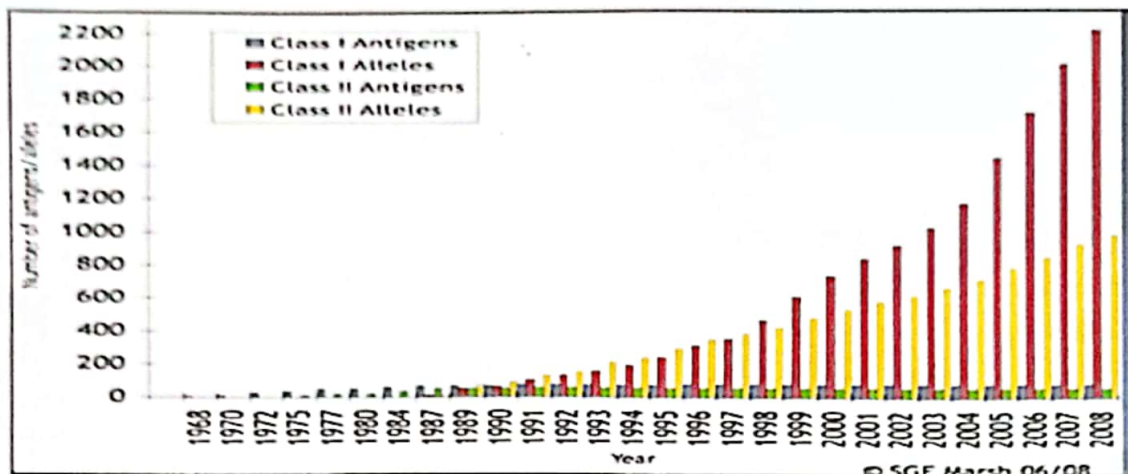


Figure 11 : Le développement du nombre des allèles HLA entre 1968-2008 (201).

La technique de RFLP (restriction fragment length polymorphism) a progressivement été remplacée par des techniques utilisant la réaction de polymérisation en chaîne réaction (PCR) telles que la PCR-SSP (Polymerase chain reaction sequence specific primer), et le séquençage (PCR-SBT). Grâce à ces techniques et à la mise en place de banques de données, il est actuellement possible de connaître les différents allèles de chaque locus et la variabilité inter locus et inter allèle (193).

Devant ce polymorphisme HLA, un comité international de nomenclature « WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System » définit régulièrement les règles d'écriture et intègre les nouveaux variants au fur et à mesure de leur découverte selon des critères bien définis (114).

Ces règles prennent en compte :

- Les régions géniques
- Les allèles ou gènes
- Les produits ou spécificités HLA

Deux nomenclatures parallèles, sérologiques et alléliques sont définies par des techniques de typages HLA (196).

• Sérologie :

Une lettre précisant le locus (par exemple HLA A pour le locus A) et suivi par son numéro spécifique : exemple HLA A2.

Certains antigènes présentent des subdivisions au sein d'une large spécificité par exemple HLA A9 s'écrit : HLA A23(9) ou HLA A24(9).

- **Biologie moléculaire :**

1. La ponctuation « deux points » est ajoutée entre les deux premiers chiffres désignant l'antigène et les 3^e et 4^e chiffres désignant l'allèle, elle est utilisée aussi pour distinguer les subdivisions alléliques :

A*260101 → A*26:01:01

B*0808N → B*08:08N

2. Un chiffre supplémentaire pour la désignation des allèles est ajouté pour les familles contenant plus de 99 allèles :

A*0201..... A*02:99

A*9201 → A*02:101

A*9202 → A*02:102

3. La lettre « w » du locus Cw est éliminé pour les résultats de génotypage mais demeure pour les résultats de sérologie.

Cw*0103 → C*01:03

Anticorps anti-Cw4 demeure anticorps anti-Cw4(215).

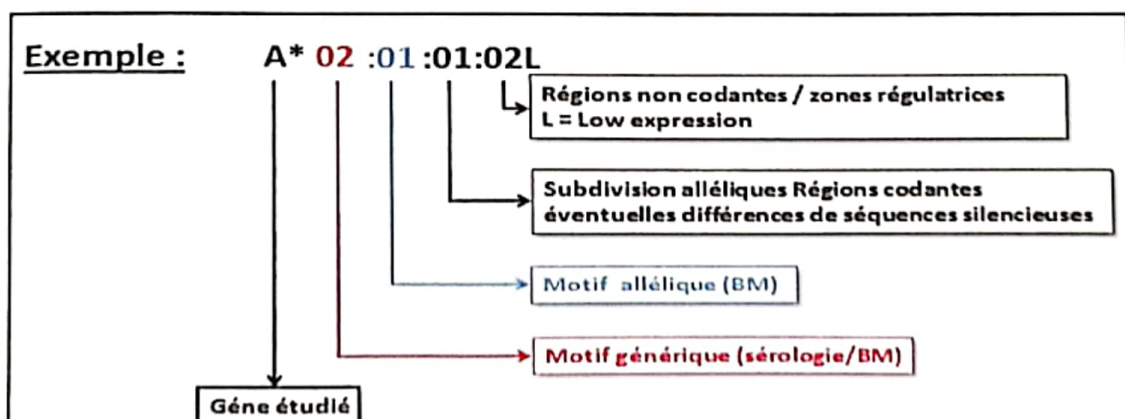


Figure 12 : La nomenclature selon la biologie moléculaire.

1.5.2. Expression codominante des gènes HLA :

Dans 98 % des cas, l'ensemble des gènes HLA de classe I et II est transmis "en bloc" à la descendance sans recombinaison chromosomique à la méiose.

Chaque parent possède, sur chaque chromosome 6, une combinaison fixe d'allèles définissant un haplotype.

Au total, pour les deux parents, quatre haplotypes sont définis : deux chez le père (a et b) et deux chez la mère (c et d). Chaque enfant recevra un haplotype venant du père et un haplotype venant de la mère dont les produits protéiques seront exprimés à la surface des cellules. Il existe donc quatre types d'individus dans la fratrie (germains) : a-c, a-b, b-c, bd. Aussi la probabilité pour que deux germains soit HLA-identiques est 25 %, HLA semi-identiques 50 % et HLA différents 25 %.

1.5.3. Notion de déséquilibre de liaison :

Etant donné le relatif "brassage des populations", la fréquence de l'association d'un allèle à un locus HLA avec un allèle à un autre locus HLA devrait être théoriquement égale au produit de la fréquence de chacun de ces allèles dans la population. Cependant certaines combinaisons d'allèles sont observées à une fréquence beaucoup plus élevée que la fréquence théorique attendue.

1.6. Rôle des molécules HLA :

Le système HLA remplit plusieurs fonctions :

1.6.1. En physiologie :

1.6.1.1. Dans la tolérance immunitaire:

Grace à l'élimination des lymphocytes auto-réactifs dans le thymus, les molécules HLA participent dans l'éducation des lymphocytes T à reconnaître le soi et le tolérer et de reconnaître le non soi et l'éliminer, c'est le phénomène de « tolérance centrale ». Pour cela deux étapes de sélection au niveau thymique sont indispensables, ces étapes sont caractérisées par plusieurs changements phénotypiques à travers les différents stades de maturations, et qui se terminent par la génération de LT dites naïfs (210).

On peut caractériser leur stade de maturation en fonction des signaux qu'ils envoient. Ainsi, ils sont doubles négatifs (CD4-/CD8-) pour les récepteurs CD4 et CD8 à un stade précoce, puis ils deviennent doubles positifs (CD4+/CD8+) dans la corticale thymique, et enfin simple positifs (CD4+/CD8- ou CD4-/CD8+) au stade mature, dans la medulla thymique.

Les LT néoformés peuvent reconnaître « tout et n'importe quoi », y compris des molécules du soi et être ainsi délétères. Il y a donc une double sélection des récepteurs TCR :

Une première sélection positive : les LT arrivent au niveau de la corticale thymique, où il existe des cellules exprimant des molécules HLA I et II de différents allèles. Grâce à leur TCR néoformé, ces LT vont réagir avec ces molécules HLA et un peptide quelconque pour tester leur affinité. Si le TCR ne reconnaît pas le peptide, le lymphocyte T correspondant va mourir par apoptose. Si le TCR reconnaît le peptide avec une bonne affinité, il va être conservé. Ainsi cette première sélection permet de supprimer les TCR pas assez réactifs.

Remarque : lors de cette sélection, certains TCR vont reconnaître préférentiellement une classe HLA plutôt que l'autre et passer ainsi de doubles positifs à simples positifs : si la cellule reconnaît mieux les molécules HLA I, il va y avoir perte de l'expression des CD4 et la molécule CD8 va être la seule exprimée ; à l'inverse, s'il y a une meilleure reconnaissance des molécules HLA II, ce sont les CD4 qui seront exprimées. Au terme de cette sélection positive, les LT incapables de reconnaître les molécules HLA sont éliminées en faveur des LT simple positifs interagissant avec l'une des deux classes HLA.

Une deuxième sélection négative : les lymphocytes T sont adressés à la médullaire thymique pour être confrontés à un peptide du soi présenté par des molécules HLA présentes à la surface des cellules de la medulla thymique. S'il y a une interaction trop forte entre le LT et les complexes HLA+peptide du soi, les LT sont éliminés par apoptose afin d'éviter les réactions délétères. Ainsi, à l'issue de ces deux sélections successives, les LT matures simple-positifs envoyés dans la circulation sont ceux assez réactifs pour lutter contre les pathogènes, mais pas assez pour réagir également avec les cellules du soi et être à l'origine de pathologies.

1.6.1.2. Immunosurveillance par les cellules Natural Killers dans la physiologie des molécules HLA I :

La cellule NK possède de nombreux rôles dans le système immunitaire adaptatif, parmi lesquels celui de vérifier la bonne expression des molécules HLA I par les cellules de

l'organisme : ils expriment à leur surface des récepteurs (inhibiteurs et activateurs de lyse) qui reconnaissent un allèle ou une molécule HLA I. Si l'interaction récepteurs NK / molécule HLA I d'une cellule est bonne, il y a transduction d'un signal inhibiteur de lyse. Si au contraire la cellule a un défaut d'expression de la molécule HLA I (par exemple dans un contexte tumoral (mélanome) ou chez certains virus qui ont échappé à la surveillance des LT), le récepteur du NK ne reçoit plus de signal inhibiteur ; il y a alors destruction de la cellule déficiente par le NK (210).

1.6.2. En pathologie :

1.6.2.1. Dans la réponse immunitaire adaptative :

Reconnaissance et élimination des protéines du non-soi : Il y a de multiples réponses dans lesquelles les molécules HLA interviennent :

- . La réponse cellulaire cytotoxique, médiée par les lymphocytes T CD8 qui reconnaissent les peptides antigéniques présentées par une molécule HLA de classe I.
- . La réponse cellulaire auxiliaire, médiée par les lymphocytes T CD4 qui reconnaissent les peptides présentés par les molécules HLA de classe II (210).

1.6.2.2. Immunologie des greffes :

Lors d'une greffe, il y a confrontation du système immunitaire du receveur avec des cellules du donneur. Les molécules du système HLA du donneur risquent d'être reconnues par le système immunitaire du receveur comme des antigènes du fait de leur grand polymorphisme (210).

1.7. Application du système HLA :

Les caractéristiques du système HLA permettent à ce dernier de trouver plusieurs applications en pratique : Transplantation d'organe, greffe de cellules souches hématopoïétiques, génétique des populations, médecine légale et association aux maladies.

1.7.1. Association HLA et maladie :

Malgré les nombreux gènes prédisposants aux maladies auto-immunes, les plus importants, contribuant à environ 50% du risque génétique, sont les gènes du système HLA.

En effet, certains allèles des gènes HLA confèrent un risque à développer telle ou telle maladie mais on ne connaît pas forcément le mécanisme précis. Il est probable que cette molécule HLA a une meilleure capacité à présenter l'antigène du soi aux lymphocytes auto-réactifs et donc à favoriser le démarrage de la réponse auto-immune.

Depuis la première association de HLA et maladie décrite en 1969 par Kourilsky, près d'une centaine de maladies sont considérées comme associées aux molécules HLA à la suite d'études comparatives entre les malades et une population de témoins où l'on détermine le risque relatif (RR : rapport de fréquence de l'allèle HLA chez des malades par rapport aux témoins sains de la même population) et d'études de familles où l'on suit la ségrégation du gène pathologique avec un haplotype HLA.

De même qu'une analyse de la région HLA élargie (HLA_x) a montré que 28% des 252 gènes traduits de la région HLA_x peuvent être associés aux maladies auto-immunes (193).

La susceptibilité peut être associée aux molécules HLA de classe I par exemple, les individus exprimant les molécules **HLA B27** sont 90 fois plus susceptibles de développer la spondylarthrite ankylosante que les individus ne portant pas cet allèle alors que la maladie de Behcet est associée à la molécule **HLA B51** (41%)

Les sujets **DR3** et **DR4** ont un risque accru de diabète insulino-dépendant, tandis que les sujets **DR2** ont une susceptibilité réduite vis-à-vis de cette maladie, mais augmentée vis-à-vis de la sclérose en plaque (198).

Dans le cadre de la PR, certains allèles de molécule HLA de classe II prédisposent à la maladie. Cette dernière semble se développer chez les sujets **DR1** et/ou **DR4**. On y rencontre la famille des allèles **DR4** chez 60 à 80 % des malades en Europe, mais dans d'autres populations c'est l'antigène **DR1** qui prédomine. En fait, la prédisposition à cette maladie n'est pas due à n'importe quel allèle de la famille **DR4**, elle est l'apanage de certains d'entre eux, le **DRB1*04:01**, **DRB1*04:04**, **DRB1*04:05** (136).

1.7.2. Association HLA et PR :

L'association génétique entre des gènes localisés dans la région HLA et la susceptibilité à la PR a été suspectée dès 1976 par Stastny (153). Quelques années plus tard, l'existence d'une association entre les gènes de la région HLA-DR codant pour les molécules DR4 et DR1 est mise en évidence (152). Vers la fin des années 1980, alors que les techniques de biologie moléculaire ont permis de séquencer le locus HLA-DRB1, l'hypothèse de l'épitope partagé ou shared epitope (SE) est avancée comme explication à l'association constatée entre la région de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et la susceptibilité à la PR (81).

L'hypothèse de l'épitope partagé suppose une implication directe des molécules HLA-DR dans la physiopathologie de la PR, attribuant l'association HLA-DR et PR à certains allèles de susceptibilité, dont la particularité est de coder pour une séquence homologue d'acides aminés dans la 3ème région hypervariable du premier domaine de la chaîne HLA-DR. Cette séquence, qui concerne les acides aminés en position 70 à 74 (70QRRRAA74 ou 70KRRAA74 ou 70RRRAA74), est codée par les allèles DR4 (DRB1*0401, 0404 et 0405), DR1 (DRB1*0101 et 0102) et DR10 (DRB1*1010) et est associée à la PR. Le rôle exact de l'épitope partagé n'a pas été clairement établi : les mécanismes biologiques expliquant l'association entre les allèles HLA-DRB1 codant pour le SE et la susceptibilité de la PR n'ont pas encore été élucidés (136). S'il existe bien des allèles qui codent pour des molécules DR4 et DR1 ayant en commun une homologie structurale de la poche peptidique, aucun antigène ou auto-antigène n'a à ce jour été identifié. Il existe pourtant plusieurs candidats notamment le collagène de type II dont certains fragments protéiques sont spécifiquement reconnus par les molécules DR1 et DR4. Or les lymphocytes T qui reconnaissent cet épitope sont essentiels au développement de l'arthrite induite au collagène chez les souris exprimant HLA-DR4 et HLA-DR1.

Par ailleurs, il existe une hétérogénéité dans la susceptibilité génétique des allèles codant pour le SE au sein d'une même population. Chaque allèle du SE ne confère pas le même risque relatif de développer une PR. Il en est de même pour certains génotypes. Ainsi, le génotype hétérozygote HLADRB1*0401/0404 conférerait un risque relatif proche de 30 (84). Il existe une hétérogénéité inter-populations dans la susceptibilité génétique des allèles codant pour le SE. L'association entre PR et allèles du SE n'est pas retrouvée dans certaines populations, notamment les Afro-américains et Hispano-américains (163 ; 115).

1.7.3. Etude d'association génétique :

On sait aujourd'hui qu'un grand nombre de pathologies ont une composante génétique. Une séquence d'ADN pouvant être représentée comme une succession de lettres (A, T, G et C) appelées bases, en une même position d'un chromosome ou locus, on pourra trouver différentes versions du « texte génétique » ou allèles. Dans le cas le plus simple, le changement d'un allèle en un locus donné peut à lui seul être responsable d'une maladie : on parle alors de maladie monogénique ; de manière moins triviale, la maladie dite multifactorielle ou complexe est le résultat de composantes multi-géniques et environnementales, ce qui est le cas de la plupart des cancers, des maladies auto-immunes et bien d'autres. Les études épidémiologiques fondées sur la génétique cherchent donc à localiser les locus de susceptibilité et à en évaluer sa quote part de responsabilité. Une approche populaire consiste à collecter un échantillon d'individus appelés « cas » et d'individus non-affectés appelés « témoins » et de déterminer les positions dans le génome pour lesquelles le texte génétique diffère significativement entre les cas et les témoins. On parle alors d'étude d'association cas témoins. Il n'est bien entendu pas question aujourd'hui de séquencer le génome entier de tout individu introduit dans l'étude, bien que la faisabilité d'une telle démarche soit de plus en plus concevable. Il s'agit plutôt de travailler à partir d'un jeu de locus appelés marqueurs génétiques, dont la position sur le génome est connue et la configuration génotypique est techniquement « facile » à déterminer(200).

Deux grandes stratégies co-existent : le « whole genome scan » et la stratégie « gène-candidat », ces deux techniques d'approche nécessitent la mise en place de stratégies d'études spécifiques à l'information génétique mise à la disposition du chercheur, ainsi qu'à son objectif final.

- Le « whole genome scan » :

Le génome scan est un moyen de réaliser une approche au hasard des régions candidates dans une maladie. C'est une exploration génomique au hasard qui consiste à étudier des marqueurs répartis tout au long du génome. Dans cette stratégie, le but est de rechercher une région génétique contenant un gène inconnu ou non, associée à la maladie ou à un trait quantitatif lié à la maladie (ex : la masse grasse pour l'obésité).

Si les loci marqueurs présentent une liaison, il est alors possible de déterminer une région où peut être localisé un gène important dans le mécanisme de la maladie étudiée. De même, il est

possible d'isoler des loci génétiques associés à un trait quantitatif ou QTL (Quantitative Trait Locus). Si une indication de liaison est retrouvée avec un ou plusieurs marqueurs, il est alors indispensable de confirmer ces résultats dans un autre échantillon de familles, puis si la liaison s'avère confirmée, de rechercher le gène mis en cause par clonage positionnel. Cette stratégie permet de cibler de plus en plus précisément la localisation du gène et enfin de le définir.

L'approche au hasard permet de progresser par exclusion successive de régions génomiques (cartographie d'exclusion). Le but n'est pas de trouver directement le gène responsable de la maladie mais de rechercher sa localisation la plus probable entre des marqueurs dont l'emplacement précis est connu sur la carte génétique (200).

- L'approche « gène-candidat » :

Elle cherche à mettre en cause ou au contraire à exclure certains gènes connus, codant pour des protéines pouvant être impliquées dans la physiopathologie de la maladie d'intérêt.

Dans le cas des maladies multifactorielles, il n'existe pas à proprement parler de réel gène candidat. Le grand nombre de gènes potentiellement impliqués rend compte de l'absence de "piste" privilégiée. Si on prend l'exemple de l'obésité à nouveau, un gène-candidat pourrait par exemple intervenir dans le mécanisme de satiété, de prise alimentaire, dans l'insulino-résistance, dans la réponse lipogénique ou lipolytique du tissu adipeux, dans le métabolisme lipidique ou glucidique, dans la dépense d'énergie, dans l'absorption intestinale des nutriments ou encore jouer un rôle au niveau de la régulation du métabolisme énergétique (200).

2. Polyarthrite rhumatoïde :

2.1. Définition :

La polyarthrite rhumatoïde est un rhumatisme inflammatoire chronique caractérisée par :

- Cliniquement : Atteinte bilatérale et symétrique des articulations périphériques des membres : mains, poignets, pieds et chevilles. Celles-ci deviennent douloureuses, tuméfiées, enflammées et progressivement, à la suite d'une évolution par poussées ou d'un seul tenant, s'enraidissent et se déforment(208).
- Biologiquement :
 - Syndrome inflammatoire se traduisant par une augmentation de la vitesse de sédimentation (VS), de la CRP et peut s'accompagner d'une hyperleucocytose, d'une anémie inflammatoire non spécifiques.
 - Perturbation du bilan immunologique avec présence dans le sérum de facteurs rhumatoïdes (70 à 80%), d'anticorps anti-peptides citrullinés (80 à 90 %) et de facteurs anti-nucléaires (15à 30%) (207).
- Histologiquement : Hypertrophie avec multiplication des villosités et des cellules synoviales bordantes (fibroblastes et macrophages) et d'une nécrose fibrinoïde en profondeur avec présence d'un infiltrat lymphoplasmocytaire prenant une organisation assez particulière (pannus) (199).

2.2. Epidémiologie :

La PR a été identifiée dans toutes les races et les ethnies où elle a été recherchée. Des variations relativement importantes de la prévalence de la PR, c'est-à-dire du nombre de cas décelés dans une population à un moment donné ont cependant été mises en évidence en fonction de l'origine géographique ou ethnique(93).

La prévalence de l'affection est estimée à 0,5 à 1%. C'est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques de l'adulte. L'âge moyen d'apparition se situe entre 35 et 55 ans et 10% des patients évoluent vers une invalidité grave en moins de 2 ans(86).

. A l'échelle mondiale, la PR touche environ 0,7 à 1 % de la population mondiale, on estime que 9,6 % des hommes et 18 % des femmes âgés de plus de 60 ans en souffrent(126).

· En France, 300 000 à 600 000 personnes sont concernées dont 75% sont des femmes préférentiellement en pré-ménopause. Selon une étude française présentée lors du congrès annuel européen de rhumatologie 2003 ; Sa prévalence est estimée à 0,3 % de la population générale adulte française (126), avec une nette prédominance chez les femmes (ratio 5,6 pour 1), entre 45 et 74 ans (0,4 à 0,8 %) et dans le sud-est de la France (82).

L'incidence de la maladie (taux de nouveau cas survenant dans une population donnée sur une période donnée) est évaluée en France autour de 0,01%. Elle augmente avec l'âge jusqu'à 60 ans avec un pic de fréquence entre 40 et 50 ans.

. Au Maroc, La prévalence de la maladie est de 1 à 2%, soit entre 300 000 et 600 000 cas, Elle survient entre 35 et 50 ans en général. Les études réalisées à l'hôpital El Ayachi de Salé (hôpital spécialisé en rhumatologie) montrait que les femmes au Maroc sont touchées à un âge plus précoce (10 ans avant, c'est-à-dire entre 25 et 50 ans) (202).

. En Algérie, une étude menée au sein du service de rhumatologie du CHU Tlemcen a démontré que le sexe féminin est le plus touché, avec un sex-ratio de 4, la prévalence est d'environ 0,9% à 1,4 %, avec une incidence annuelle est de 150 cas / 1 000 000. En effet, entre 300 000 et 600 000 personnes qui sont touchées par la polyarthrite rhumatoïde, l'âge d'apparition est surtout entre 35 et 55 ans avec un pic de fréquence se situant autour de la quarantaine (197).

La PR constitue un véritable problème de santé publique car:

- 50% des patients arrêtent leur activité professionnelle moins de 5 ans après son début ;
- la durée de vie des patients est en moyenne réduite de 5 à 10 ans ;
- les dépenses dues à cette maladie sont élevées, plus à cause de l'exclusion du système économique actif que des dépenses médicales et pharmaceutiques(134).

2.3. Facteurs favorisants :

Comme beaucoup de maladies auto-immunes, la PR est une affection multifactorielle apparaissant comme la résultante d'un ou plusieurs des éléments suivants : un terrain génétique prédisposant, des facteurs d'environnements, les facteurs hormonaux... Les facteurs génétiques interviennent dans un tiers à un demi des cas de PR.

2.3.1. Facteurs génétiques :

Ils interviennent pour environ 30% des facteurs déclenchant la maladie. Les études portant sur les jumeaux confirment la présence des facteurs génétiques prédisposants à la survenue de la PR. On retrouve en effet, le taux de concordance de PR est de 15 à 30 % chez les jumeaux homozygotes contre 5% parmi les jumeaux dizygotes.

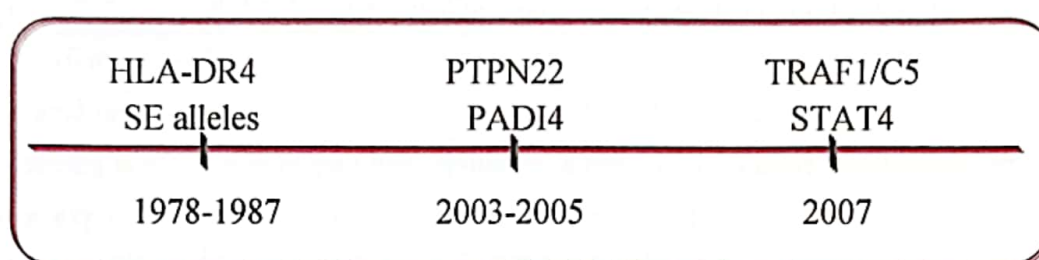


Figure 13 : Les gènes impliqués dans la susceptibilité à la PR

2.3.1.1. Gènes HLA :

Certains gènes situés au niveau du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe II semblent jouer un rôle central dans la susceptibilité génétique de la PR. Une association entre la PR et les déterminants sérologiques HLA-DR4 et DR1 a été décrite il y a déjà plus de vingt ans (81). Plus récemment, l'analyse moléculaire a révélé que cette association se limite à certains sous-types de DR4 et de DR1, lesquels ont en commun une séquence (épitope ou motif) d'acides aminés, Q(K/R)RAA, ((K/R) indiquant soit K soit R), à la position 70-74, correspondant à la troisième région hypervariable de la chaîne DRβ1.

Cet effet est clairement dose dépendant, l'association étant plus forte pour les phénotypes comportant deux fois un allèle présentant l'épitope partagé, et pourrait être expliqué par le fait que d'autres allèles influencent négativement la susceptibilité pour la maladie. Par contre, chez les Espagnols, les Basques, les Israéliens et les Français du Sud, l'allèle DR4 contenant l'épitope partagé est rare, et la PR est associée aux allèles DR1 ou DR 10, portant également l'épitope partagé (115 ; 25).

Des études suggèrent fortement que les gènes codant les molécules de classes II du HLA sont les plus fortement impliqués (167). En effet, certains alleles du locus HLA-DRB1, codant

pour la chaîne β de la molécule HLA-DR et situé sur le chromosome 6 en 6p21, prédisposent fortement au risque de développer cette maladie. Plus particulièrement, la présence d'un épitope formant la quatrième poche de présentation du peptide, dit épitope partagé. La fréquence élevée de HLA-DR4 dans la PR a été rapportée par Stastny (152) puis par d'autres équipes (130; 164). De plus, certaines études montrent que les patients HLA-DR4 présentent plus souvent et à taux plus élevés, le facteur rhumatoïde (FR) (154; 56). Mais certains travaux ont fourni des résultats contradictoires (2;20). Les différences constatées entre les différentes études pourraient être dues à l'inclusion de patients atteints de PR séronégatives. Il se pourrait en effet que des patients sans FR, présentant d'autres arthropathies inflammatoires ressemblant à la PR, aient pu être inclus dans différents centres. Certaines équipes ont suggéré que les facteurs HLA de prédisposition à la PR, ne sont pas des molécules codées par un seul allèle DR β , mais plutôt des épitopes d'une ou plusieurs séquences d'acides aminés partagés par différentes molécules HLA-DR β .

L'analyse détaillée des séquences codées par les allèles HLA-DRB1 (*01, *04 et *10) associés à la PR dans la plupart des populations a mené à l'hypothèse de l'épitope partagé (81) pour expliquer la prédisposition à la PR. Le motif de la troisième région hypervariable (HVR3) de la chaîne DR β QKRAA (dans DRB1*0401), QRRAA (dans DRB1*0404, *0405, *0101, *0102) et RRRAA (dans DRB1*1001), est situé entre les positions 70 et 74, au milieu des 2 hélices alpha délimitant la poche de liaison au peptide de la molécule HLA-DR. A ce jour, on connaît peu de chose sur le potentiel arthritogène de ces épitopes partagés. Cependant, cette déviation du répertoire des molécules présentant l'antigène aux cellules immunitaires pourrait induire la sélection de clones autoréactifs ou promouvoir un effet de mimétisme moléculaire avec une protéine d'origine microbienne(116).

	65	70	74	80	
HLA-DR1	KDLE	QKRAA	VDTCR		0101, 0102
HLA-DR10	KDLE	RRRAA	VDTCR		1001
	KDLE	QKRAA	VDTCR		0401
	KDLE	QRRAA	VDTCR		0404, 0405
HLA-DR4	KDLE	QRRAA	VDTCR		0405
	KDLE	DERAA	VDTCR		0402
	KDLE	QRRAE	VDTCR		0403, 0406

Figure 14: Séquence de l'épitope partagé sur les différents allèles de susceptibilité (en jaune)

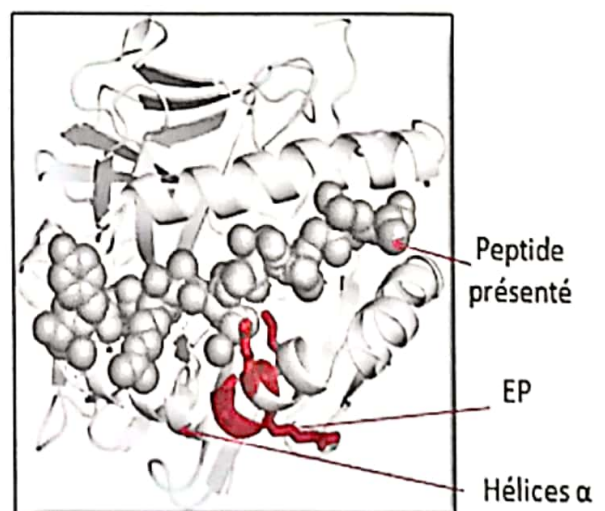


Figure 15 : Cristallographie de la molécules HLA-DR

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer le rôle du SE dans la physiopathologie de la PR. Les trois principaux modèles sont :

- L'épitope partagé pourrait reconnaître un peptide du soi et favoriser dans le thymus la persistance d'un clone de lymphocytes T autoréactifs par sélection clonale positive ; ce clone T autoréactif pourrait dans certaines conditions être activé et déclencher une réponse immunitaire spécifique contre ce peptide du soi;
- L'épitope partagé se lierait spécifiquement avec l'antigène responsable de la PR; une étude récente a montré une affinité de l'épitope partagé pour les peptides citrullinés qui représentent un groupe de peptides candidats à l'initiation de la PR (47);
- L'épitope partagé interagirait avec un peptide antigénique exogène mais ayant une structure voisine à un peptide du soi. Cette théorie dite du « mimétisme moléculaire » a été observée pour une glycoprotéine du virus Epstein-Barr (la gp110), mais aussi pour la protéine ADN-J d'*Escherichia coli* et les protéines de choc thermique (*heat shock proteins* [HSP] pour les Anglo-Saxons).

L'association entre le locus HLA-DRB1 et la positivité des ACCPs a été clairement établie dans une étude qui a évalué l'impact du portage d'au moins un allèle HLA- DRB1*SE sur la positivité d'ACCPs dans un échantillon de 1723 individus caucasoïdes atteints de PR (étude North American Rheumatoid Consortium et Study of New Onset Rheumatoid Arthritis), cette étude rapporte l'existence d'un effet-dose entre le nombre d'allèles HLA-DRB1 et la production d'ACCPs, d'autres allèles semblent avoir un rôle protecteur comme l'allèle HLA-DR3 qui paraît associé à une moindre production d'ACCP(91).

L'implication des allèles HLA-DRB1*04 et DRB1*01 dans la PR est également soulignée par l'association étroite entre ces allèles et la sévérité de la maladie. L'allèle DRB1*04 est pratiquement constamment retrouvé dans les PR agressives, avec des dégradations ostéoarticulaires plus précoces (19; 78) et plus importantes (184 ; 43). L'allèle HLA-DRB1*01 semble également associé aux PR sévères, mais plus faiblement. Le nombre d'allèles à risque dans le génotype du patient est corrélé avec la sévérité de la PR. La notion d'effet dose a été développée par les travaux de Weyand qui montrent que les patients homozygotes pour DRB1*04 ont un risque de développer une PR plus sévère que les sujets hétérozygotes pour cet allèle (184).

Bien que HLA-DR β 1 semble être le facteur génétique majeur dans la PR, le locus HLA ne contribue qu'à hauteur de 30 % dans le risque familial global. De plus, la présence d'un des allèles HLA-DR conférant la susceptibilité à la PR est décrite dans 40 % des individus dans la population générale et dans 70 % des patients atteints de la maladie. Ceci indique que ces allèles ne sont ni suffisants, ni nécessaires pour provoquer le développement de la maladie chez un individu donné. Ces données suggèrent donc que d'autres gènes non-HLA puissent également jouer un rôle dans la susceptibilité à la PR(96).

2.3.1.2. Gènes non HLA :

Les gènes codant pour le système HLA ne sont pas les seuls à jouer un rôle dans la prédisposition génétique à la PR :

- Gène PTPN22 :

Constitue le deuxième facteur génétique le plus important après le système HLA dans la prédisposition à la PR.

Le gène PTPN 22 a été mis en évidence initialement dans une cohorte de patients américains, européens et asiatiques, puis confirmé dans une méta-analyse concernant 20 000 PR et 22 000 contrôles (107). Une association entre la PR et un SNP fonctionnel du gène *PTPN22* a été mise en évidence dans une étude cas-contrôle aux Etats-Unis (21). Ce gène, localisé sur le chromosome 1 en p13, code pour une protéine tyrosine phosphatase LYP (Lymphoid phosphatase) impliquée dans la régulation négative de l'activation des cellules T transitant par le TCR. L'allèle *1858T* du SNP PTPN22-C1858T provoque la substitution R620W au niveau de la tyrosine phosphatase et affecte un motif riche en proline impliqué dans les interactions protéine-protéine. L'association à la PR de cet allèle T a été démontrée dans plusieurs populations, toutes caucasiennes. Une association à d'autres maladies auto-immunes incluant le diabète de type I ou encore le lupus a également été rapportée (80). Bien que plusieurs mécanismes de gain ou de perte de fonction aient été suggérés, le mécanisme moléculaire de susceptibilité à la maladie reste à établir. Très récemment, des preuves de l'association de l'allèle T avec la PR ont été apportées dans une population caucasienne française, et plus précisément entre l'allèle T et les patients PR séropositifs pour le facteur rhumatoïde. *PTPN22* serait ainsi, plus généralement, "un gène de l'auto-immunité" . Enfin, dans une population suédoise, l'allèle T a également été associé avec la présence d'anti-CCP chez les patients atteints de PR, la combinaison des deux donnant une spécificité de diagnostic très élevée de la PR (94).

- **Gène TNF α :**

D'autres locus et gènes, outre les gènes HLA, ont été étudiés et se sont avérés être associés à la PR. Par exemple, des gènes candidats ont été identifiés, non seulement au niveau de la région CMH de classe II mais aussi de la région CMH de classe III où le gène TNF α a été impliqué comme facteur de susceptibilité à la maladie (151 ;53)

Plusieurs criblages génomiques ont identifié la région 1p36 en tant que locus d'intérêt pour la PR. Le rôle crucial de cette cytokine dans la physiopathologie de la PR et le fait que le gène TNFR2 soit présent dans un locus d'intérêt font de ce gène un candidat majeur pour le développement de la PR. Un polymorphisme (SNP) a été localisé dans l'exon 6 et se caractérise par la substitution en position 196 d'un résidu méthionyl en résidu arginyl. Cette substitution accentue la transmission intracellulaire des signaux générés par la fixation de TNF α sur TNFR2 (122). Plusieurs études familiales réalisées dans des populations caucasiennes et japonaises ont montré une association significative de l'allèle TNFR2 196R et du génotype TNFR2 196R/R. Cependant, même si des preuves d'une telle implication ont été obtenues, le rôle du gène *TNFR2* reste modeste, puisqu'il semble plutôt restreint aux formes familiales de PR.

- **Gène de PADI4 :**

En 2003, une étude sur la population japonaise a décrit un polymorphisme du gène de la peptidyl-arginine-déiminase 4 (PADI4) dans la PR. Ce polymorphisme est localisé dans l'intron 3, avec un OR à 1,97 (157). Cependant ce résultat n'a pas été confirmé dans la population caucasienne (33).

- **Gène CTLA-4 :**

La protéine CTLA-4, tout comme LYP, joue un rôle important dans la régulation négative de l'activation des cellules T, en se fixant, avec une forte affinité, aux molécules de costimulation CD80/86 et en entrant en compétition avec CD28. Des polymorphismes du gène *CTLA-4* ont été associés avec plusieurs maladies auto-immunes, particulièrement la thyroïdite auto-immune et le diabète de type I. Ce gène semble donc être un locus général de susceptibilité aux maladies auto-immunes. L'association entre le SNP A49G du gène CTLA-4 et la PR a été recherchée mais les résultats apparaissent contradictoires.

Cependant, très récemment, il a été montré une association de l'allèle CT60 du gène CTLA-4 avec le développement de la PR dans une cohorte caucasienne nord-américaine.

Dans cette cohorte, ainsi que dans une cohorte suédoise, l'association de *CTLA-4* s'est de plus révélée plus forte avec les patients PR séropositifs pour les auto-anticorps anti-peptides citrullinés (ACPA). Ce gène serait donc un gène de susceptibilité pour seulement un sous-ensemble de patients PR (33).

- Gène SLC22A4 :

Le groupe ayant identifié l'haplotype de susceptibilité à la PR de PADI4 a démontré l'association entre le gène **SLC22A4** et la PR (169). SLC22A4 est localisé en 5q31 et code pour une protéine transporteur de cations organiques. Bien que ce gène ne soit pas à l'intérieur d'un locus d'intérêt, il est localisé dans une région qui contient d'autres gènes impliqués dans des mécanismes d'inflammation, et associé avec la maladie de Crohn. Une étude au sein d'une population japonaise a révélé une association entre la PR et un SNP intronique localisé dans une séquence contenant un site de fixation pour un facteur de transcription, RUNX1. La présence de l'allèle de susceptibilité aurait pour conséquence une plus grande affinité du facteur de transcription RUNX1 vis-à-vis de son site de fixation ce qui abaisserait la transcription du gène SLC22A4. Le même groupe japonais a également testé un SNP intronique dans le gène RUNX1, présent tout comme SLC22A4 à l'extérieur des régions d'intérêt identifiées par criblage génomique, et montré son association avec la PR (169). L'ensemble de ces données illustre la complexité de la susceptibilité génétique à la PR, qui implique probablement la combinaison de variants de nombreux gènes (135).

- Gène STAT4 :

En 2007 Remmers a découvert que le polymorphisme de STAT4 (signal transducer and activator of transcription 4) est lié à la PR dans une population d'Amérique du Nord avec un OR de 1,32 (135). STAT4 code pour une protéine impliquée dans la transmission du signal intracellulaire et joue un rôle important dans la médiation des réponses lymphocytaires à l'interleukine 12 et dans la différenciation des lymphocytes T auxiliaires.

- Gènes TRAF1/C5 :

Certaines variantes génétiques des gènes **TRAF1** et **C5** sont également associés à une augmentation du risque de présenter une PR avec anticorps anti-CCP(21).

En 2007, le locus TRAF1/C5 a été identifié par la technique d'analyse de gène candidat (103) et de manière concomitante par l'analyse du génome entier : soit 300 000 SNP sur 500 PR et 1800 contrôles provenant de Suède et d'Amérique du Nord. Ce locus TRAF1/C5 est lié à la PR (OR=1,28). TRAF1 (TNF receptor-associated factor 1) et C5 (complement component 5) sont situés sur le même locus TRAF1/C5 sur le chromosome 9q33-34. TRAF1 et TRAF2 forment un hétérodimère intervenant dans la voie de MAP-kinases. C5 est un élément de la cascade du complément.

2.3.2. Facteurs hormonaux :

La plus grande incidence de la PR chez la femme, avec un sex-ratio de un homme pour trois femmes, suggère une implication des hormones dans le déclenchement de la PR. Les études épidémiologiques se sont intéressées à l'influence de la grossesse, de l'allaitement et des facteurs hormonaux endogènes ou exogènes comme facteurs de risques de la PR. Pendant la grossesse, le risque de développer une PR est faible, tandis que dans l'année qui suit le post-partum ce risque est nettement plus élevé. L'allaitement a été incriminé comme étant un facteur de risque, responsable de l'incidence plus élevée dans le post-partum. En effet, une étude portant sur 187 femmes qui avaient développé une PR après la première grossesse montre que celles qui avaient allaité leur enfant ont un risque cinq fois supérieur d'avoir une PR (28). Cette implication des facteurs hormonaux endogènes est soulignée par certaines études qui ont montré une hypo androgénie relative chez les femmes mais aussi chez les hommes atteints de PR, avec des taux de testostérone et de déhydroépiandrostérone plus bas. Les hormones exogènes, que ce soit la pilule contraceptive ou le traitement hormonal substitutif, ne modifient pas l'incidence de la PR mais semblent retarder son début et sa sévérité(49).

2.3.3. Facteurs environnementaux :

Les agents infectieux viraux (Epstein-Barr), bactériens (*E. coli*) et mycobactériens ont été incriminés dans le déclenchement de la PR. Une infection commune sur un terrain génétiquement prédisposé pourrait déclencher la maladie par mimétisme moléculaire de certains composants de ces agents infectieux avec des composants de l'articulation.

La protéine de choc thermique HSP65 a une structure voisine avec une protéine présente dans le cytoplasme des cellules de la couche bordante.

L'HSP 70 d'*E. Coli* est reconnu par l'épitope partagé de la molécule HLA-DR. Les souris immunisées avec *Mycobacterium tuberculosis* produisent des anticorps dirigés contre les HSP. Une réaction immunitaire croisée pourrait donc déclencher la réaction inflammatoire observée dans la PR. Les agents infectieux peuvent induire une réponse immunitaire innée par activation des toll like receptors (TLR) (101). Ces TLR reconnaissent des molécules exprimées par les micro-organismes : TLR4 est activée par les composants lipopolysaccharidiques de la membrane bactérienne et TLR9 interagit avec l'oligonucléotide CpG présent dans l'acide désoxyribonucléique (ADN) bactérien.

D'autres facteurs environnementaux, comme le statut social, la vie urbaine par rapport au mode de vie rural, le régime alimentaire, ont été incriminés dans le déclenchement de la PR, mais sans que cela soit formellement prouvé. En revanche, deux études longitudinales ont confirmé la prédisposition à développer une PR chez les fumeurs de tabac(150).

Le tabagisme est associé également à un risque accru de développer une polyarthrite rhumatoïde comme l'a montré Padyukov en 2004 : le risque relatif était évalué à 2,8 pour les non fumeurs porteurs de l'épitope partagé, à 2,4 pour les porteurs de l'épitope partagé non fumeurs mais à 7,5 pour les fumeurs porteurs de l'épitope partagé. Ces éléments suggèrent un rôle multiplicatif de l'effet du tabac et de l'épitope partagé pour la prédisposition à la maladie. Klareskog *et coll.* ont ensuite démontré que l'effet de l'épitope partagé sur la prédisposition à la polyarthrite rhumatoïde ne concernait en aucun lieu les patients sans anti-CCP.

Cet effet était en fait limité aux polyarthrites rhumatoïdes anti-CCP positives, cet effet étant décuplé chez les patients fumeurs (pour la combinaison anti-CCP+, tabac et épitope partagé double dose, c'est-à-dire sur les deux chromosomes : le risque relatif de développer une polyarthrite rhumatoïde était de 40). La même équipe a démontré que le fait de fumer favorisait la citrullination des protéines des cellules broncho-alvéolaires. Une hypothèse séduisante pouvait alors être formulée : le tabac favoriserait la citrullination des protéines sur un terrain génétique prédisposant (ici l'épitope partagé) et permettrait la présentation par les lymphocytes T de peptides citrullinés. Ceux-ci activeraient des lymphocytes B dirigés contre les déterminants antigéniques de ces peptides citrullinés et la synthèse d'anticorps anti-CCP (100).

Une méta-analyse des données de la littérature scientifique publiée en 2010 met en évidence un risque relatif significativement supérieur de développer une PR chez les fumeurs et chez

les ex-fumeurs par rapport aux patients non fumeurs (81). Tout à fait logiquement, le risque augmente également avec le nombre de cigarettes fumées par jour et la durée du tabagisme. Il n'a pas été établi de seuil à partir duquel un risque accru devenait mesurable mais quoiqu'il en soit, tous s'accordent à dire que le risque de développer une PR demeure plus élevé chez les fumeurs ou ex-fumeurs pendant près de 20 ans après l'arrêt du tabagisme (88 ; 56).

Il est également suggère que le tabac soit responsable d'interactions avec les allèles HLA DRB1 codant pour l'épitope partagé et influence certaines réponses immunologiques.

En effet, les fumeurs portant ces allèles de susceptibilité sont plus exposés à la maladie et présentent un risque supérieur de développée des anticorps anti-peptide cycliques citrullinés (anticorps anti-CCP) et des facteurs rhumatoïdes (155).

2.4. Immunopathologie :

Les mécanismes immunopathologiques de la PR sont complexes et peuvent être divisés d'une façon schématique en cinq phases distinctes, une phase de déclenchement de la réponse immunitaire ; une phase de rupture de la tolérance au soi ; une phase d'inflammation de la membrane synoviale ; une phase de destruction articulaire secondaire à l'action de cytokines (tumor necrosis factor α , interleukine 1β , métalloprotéinases, RANKL) mais aussi à la prolifération pseudotumorale des synoviocytes par défaut d'apoptose et finalement une phase de réparation(123).

2.4.1. La phase de déclenchement :

Le point de départ de la réponse immunitaire au cours de la PR reste mal défini. Dans les études récentes, plusieurs hypothèses peuvent expliquer en partie le déclenchement de la PR :

La **première hypothèse** est basée sur la théorie du mimétisme moléculaire d'un antigène exogène, à la suite d'une infection le plus souvent bactérienne mais aussi virale ou fongique et chez des sujets prédisposés génétiquement, il y'a développement d'une PR après activation des clones auto-réactifs.

Les germes les plus incriminés dans cette activation sont ceux de la flore intestinale, à coté de ces germes, les stimuli fournis après un acte chirurgicale, un microtraumatisme ou même suite à une dysrégulation hormonale, forment un fond sur lequel se développe ce mimétisme.

Des sujets soumis aux mêmes fréquences de stimulations antigéniques répondent différemment. En effet, dans le même microenvironnement et les mêmes stimulations antigéniques, à la même fréquence certains sujets sont suivis par la guérison et n'aboutissent pas au développement d'une PR, alors que d'autres vont au bout d'un certain temps développer une PR mais de façon progressive. La différence certaine entre les deux groupes de sujets réside dans le polymorphisme HLA.

De façon très schématique, et suite à une infection bactérienne, virale ou fongique.

L'ensemble des cellules de l'immunité innée (Macrophage et DC) qui arrivent à reconnaître les PAMPs exprimés par les pathogènes grâce aux PRR (Pattern Recognition Receptors) et vont produire des cytokines, chimiokines et des médiateurs de l'inflammation de façon locale. La cellule dendritique qui est la seule cellule présentatrice d'antigène professionnelle, se trouve à l'interface de l'immunité innée et de l'immunité adaptative, après reconnaissance des antigènes exogènes va présenter les peptides antigéniques apprêtés aux lymphocytes T CD4⁺ dans les OLS type Ganglion lymphatique après avoir migré, sous l'action de chimiokines (CCL19), pendant cette migration elle va prendre un phénotype mature (Augmentation de l'expression des molécules HLAII, expression des molécules de co-stimulation et sécrétion de cytokines).

En effet, lors de l'internalisation d'un antigène exogène, les molécules impliquées dans la dégradation en peptides sont les mêmes dans l'espèce humaine, cela pousse à s'interroger sur un éventuel chargement préférentiel de certains peptides arthritogènes sur les molécules HLA II chez les patients prédisposés.

Cette hypothèse est appuyée par l'étroite liaison HLA /PR au niveau de certains allèles DRB1*0401.

Une fois arrivée au niveau d'un OLP, la cellule dendritique va activer les deux sous-populations lymphocytaires responsables du déclenchement d'une réponse immunitaire spécifique.

La deuxième hypothèse est basée sur la théorie de l'antigène endogène qui, sous l'influence de certains facteurs traumatiques, chirurgicaux ou physiologiques (dus au vieillissement du cartilage) sont à l'origine de la libération de certaines structures normalement retrouvées dans l'espace fermé qui est l'articulation.

La PR est une maladie auto-immune complexe, des modèles animaux simplifiés sont mis en place pour l'investigation des différents mécanismes régissant cette affection.

Ces modèles sont employés pour définir à quel point des auto-antigènes (PG, collagène type II, Link protein) peuvent être des agents inducteurs d'une PR. Ces modèles animaux sont comparables à la PR sur le plan histologique et clinique, les plus étudiés se basent sur l'utilisation du Collagène type II ou bien le PG.

Récemment les nouveaux modèles animaux se penchent plus sur les structures nouvellement découvertes (Aggrecan) du fait de leur rôle pertinent dans le maintien de l'architecture du cartilage mais aussi de leurs pouvoirs immunogènes élevés.

La troisième hypothèse ne se base pas sur l'origine de l'antigène exogène ou endogène, mais sur le rôle que peut jouer la cellule dendritique dans la physiopathologie de la PR. Cette cellule qui présente l'interface entre l'immunité innée et de l'immunité adaptative joue un rôle majeur dans la défense contre l'infection par des microorganismes, dans le développement des réponses spécifiques, ainsi que dans le maintien de la tolérance périphérique en cas où le peptide présenté est un auto-antigène.

Plusieurs études expérimentales ont montrés le rôle pivot de la CD dans la pathogénie de certaines affections, on peut citer le DID, Lupus et autres spondylarthrites.

Dans la sub-intima, partie vascularisée de la membrane synoviale et à l'état physiologique, les CD qui y résident sont d'origine myéloïde et exerce une fonction d'immunosurveillance.

Suite à une stimulation de l'articulation par un agent pathogène ou suite à une chirurgie ou traumatisme, une cascade de réactions se succède :

- Afflux de précurseurs myéloïdes qui se différencient sous l'influence de l'IL-3 et GMCSF en pCD.
- Activation des mDC suite à la capture d'antigènes et sous l'effet des cytokines.

Sous l'effet de facteurs chimiotactiques produits par les autres types cellulaires (macrophages, fibroblastes) ces cellules migrent vers la ligne bordante et passe vers le liquide synovial.

Il est à présent clairement établi que ces cellules dendritiques ont la capacité de capturer et de présenter différents composants de l'articulation : acide hyaluronique, collagène type II dénaturé, fibronectine et la GP39 du PG, ce qui peut provoquer le déclenchement de la PR chez les sujets prédisposés(199).

Donc, le premier événement de la PR pourrait être une réponse inflammatoire non spécifique à un stimulus encore non identifié, avec accumulation locale de monocytes/macrophages qui produisent des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 1 (IL-1), le *Tumor Necrosis Factor* (TNF) α et l'IL-6. Des autoantigènes situés

dans l'articulation (collagène de type II, protéoglycanes, protéines de la matrice) pourraient être incriminés, comme des peptides d'origine exogène, issus de bactéries ou de virus(206).

2.4.2. La phase de rupture de la tolérance :

La distinction entre le soi et le non soi est imparfaite, en dépit de la sélection thymique et des mécanismes périphériques visant à réguler les lymphocytes autoréactifs dans le cadre de la tolérance immunitaire. Cette dernière peut être rompue, aboutissant alors à l'activation des lymphocytes auto-réactifs et à l'apparition de maladies auto-immunes.

La rupture de la tolérance est liée à la persistance en périphérie des clones reconnaissant des auto-antigènes, malgré l'élimination des ces lymphocytes dans le compartiment central lors de la sélection thymique.

La rupture de la tolérance périphérique aux auto-antigènes repose sur plusieurs mécanismes :

- Rupture d'un état anergique qui peut être favorisée dans certains cas par un contexte infectieux et/ou inflammatoire. Ainsi, des lymphocytes présentant une faible affinité pour un auto-antigène peuvent s'activer s'ils rencontrent des cellules dendritiques activées présentant cet antigène et de forts signaux de costimulation ou encore si ces auto-antigènes sont également des ligands pour les TLR.
- Absence d'ignorance, elle est favorisée par la présence anormale et/ou en quantité importante d'un auto-antigène habituellement présent dans un site privilégié. Cette situation peut être observée suite à la rupture traumatique ou d'origine infectieuse d'une barrière naturelle, ou par nécrose tissulaire(68).
- Déviation cytokinique, c'est le troisième mécanisme inducteur de cette rupture de la tolérance périphérique, un excès de cytokines pro-inflammatoires et un déficit relatif en cytokines anti-inflammatoires définissent ici le déséquilibre de la balance Th1–Th2 et l'orientation vers la voie Th2, ceci provoque la rupture de la tolérance et l'apparition de cette maladie auto-immune.
- Enfin, un dysfonctionnement des cellules T régulatrices, les lymphocytes T régulateurs contribuent fortement à la tolérance périphérique aux antigènes du soi. Ainsi, l'engagement vers la voie Treg (phénotype CD4+ CD25+) est sous la dépendance du TGF- β en l'absence d'IL-6 et l'inhibition de la réponse immune se fait notamment via des contacts cellulaires mettant en jeu CTLA4 ou via des cytokines

immunosuppressives (IL-10 ou TGF- β). Un déficit quantitatif ou qualitatif en Treg a été mis en évidence dans de nombreuses pathologies auto-immunes dont la PR(205).

Certaines pistes de recherche ont suggéré le rôle que joue les lymphocytes B dans la rupture de la tolérance et la genèse de la PR, cette rupture est due soit à :

- Un défaut au niveau de la sélection centrale
- Un défaut au niveau de la sélection périphérique
- Une génération de lymphocytes B auto-réactifs faibles aux peptides cycliques citrullinés (CCP) et IgG, avec :
 - Une réactivité faible contre l'ADN natif, ADN dénaturé, l'Insuline et les LPS : ils sont dits poly réactifs faibles.
 - Présence d'Ig à chaînes légères Kappa portant des CDR 3 > 11 acides aminés(199).

La PR comme toutes les maladies auto-immunes résulte de défauts dans la mise en place ou le maintien de la tolérance au soi, survenant quand la rupture de la tolérance au soi entraîne un recrutement cellulaire et inflammation de la synoviale provoquant par la suite des lésions cellulaires ou tissulaires induites par des lymphocytes T et/ou des lymphocytes B produisant des auto-anticorps spécifiques d'autoantigènes.

2.4.3. Phase d'inflammation de la synoviale et recrutements cellulaires :

Le siège inflammatoire de la PR est la membrane synoviale. La membrane synoviale se compose de 2 couches :

- la couche bordante (intima) au contact de la cavité articulaire. Elle est formée de une à quatre assise(s) de synoviocytes de 2 types : les synoviocytes de type A ou synoviocytes de type macrophagique, dérivés de cellules souches sanguines mononucléées, et les synoviocytes de type B ou synoviocytes de type fibroblastique. Ces deux types cellulaires ont respectivement des propriétés de phagocytose et de biosynthèse du liquide synovial.
- la couche sous-intimale (subintima) au contact de la capsule articulaire. Elle est formée de fibroblastes, histiocytes, mastocytes et de fibres de collagène. Elle présente également un réseau microvasculaire important.

L'inflammation rhumatoïde, appelée synovite rhumatoïde, se caractérise par une surproduction de liquide synovial au niveau de l'articulation générant son gonflement ;et une douleur, ayant pour origine une multiplication anormale des cellules entraînant un épaississement de la membrane synoviale (le pannus synovial). La persistance de l'inflammation se répercute sur tous les éléments de l'articulation : cartilage, os, ligaments, tendons...(206). (Voir Figure 16).

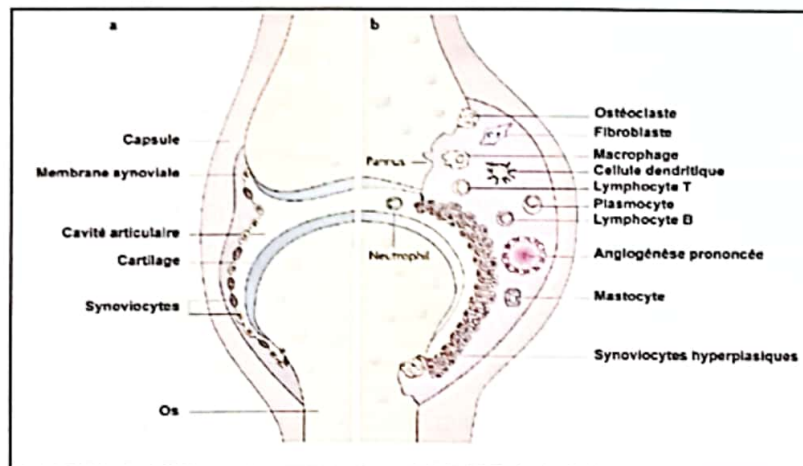


Figure 16 : Représentation schématique d'une articulation normale (a) ou rhumatoïde (b).
(206).

3.1. Initiation de l'inflammation :

Le processus inflammatoire est donc initié par les macrophages. Ces derniers contribuent ensuite au recrutement non spécifique des lymphocytes T et des polynucléaires sanguins, grâce à l'action de cytokines à activité chimiotactique et à l'augmentation, par le $\text{TNF}\alpha$, de l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales.

Les macrophages pulmonaires s'activent et entraînent l'apoptose de quelques cellules avoisinantes ainsi que l'activation de la peptidylarginine déiminase (PAD). Cette enzyme génère des néoantigènes à partir d'auto-antigènes en opérant des modifications post-transcriptionnelles des protéines qui consistent à changer leurs résidus arginine en citrulline.

Ces protéines citrullinées, reconnues comme non soi, sont captées par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Leur apprêtement et leur présentation aux lymphocytes sont facilités par la présence d'un épitope partagé au niveau de la chaîne β des molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). La CPA, devenue mature, active les lymphocytes T et B, entraînant la synthèse des anticorps anti-CCP (protéine cyclique

citrullinée) et du facteur rhumatoïde. Ceci explique la présence de ces anticorps très tôt au cours de l'évolution de la maladie avant même les signes cliniques et permet un diagnostic précoce.

Les anti-CCP circulent et vont se localiser au niveau de l'articulation où ils contribuent au déclenchement de l'inflammation (99).

Les anti-CCP, formés en périphérie, qui ont migré dans l'articulation, reconnaissent et se lient à ces néoantigènes par mimétisme formant des complexes immuns (146). Ces derniers, dont le fragment Fc de l'Ig est libre, se fixent sur le récepteur du fragment Fc des macrophages synoviaux et des polynucléaires neutrophiles (PNN). L'activation de ces cellules induit une transduction des signaux à travers un ensemble de tyrosines kinases (notamment Syk) et une sécrétion de cytokines (tumor necrosis factor α (TNF α), interleukine 1 (IL1), IL6), de chimioattractants et de métalloprotéinases (MMPs).

Ces cytokines stimulent l'angiogenèse (14 ; 160) et augmentent l'expression des molécules d'adhérence cellulaire (CAM) au niveau de l'endothélium vasculaire.

Ceci permet le recrutement des cellules immunitaires au niveau du site inflammatoire avec la formation de panus synovial : cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes T et B (60 ; 133).

3.2. Activation des cellules de l'immunité innée :

Les cellules dendritiques, les macrophages et les synoviocytes sont activés par l'intermédiaire des récepteurs de l'immunité innée, les « toll like receptor » (TLR) qu'ils portent à leur surface (170). L'activation de ces TLR, dans la PR, est déclenchée par la liaison avec leurs ligands endogènes appelés « damage-associated molecular patterns » (DAMPs) comme la protéine du choc thermique (HSP), l'ADN et l'ARN. Les DAMPs sont générés par un stress oxydatif qui résulte d'une rupture de l'équilibre entre la production des ROS et leur élimination par les antioxydants comme les superoxydes dismutases (SOD) (38). La liaison des TLR aux DAMPs entraîne une transduction du signal médiée par quatre protéines adaptatrices, relayées ensuite par plusieurs kinases (initiales et distales) et par trois facteurs de transcription : le « nuclear factor κ B » (NF- κ B), l'« activator protein 1 » (AP1) et l'«interferon regulatory factor » (IRF). Ces facteurs de transcription induisent la synthèse des interférons (IFN), du TNF α , des interleukines 1, 6, 10, 12 et de différentes chémokines par les cellules dendritiques. L'activation des synoviocytes via leur TLR, aboutit à la synthèse de l'IL1, de l'IL6, de la prostaglandine PGE2 et des MMPs et celle des macrophages à l'IL1,

Périphérie

The diagram illustrates the peripheral immune response in rheumatoid arthritis. It shows the interaction between various immune cells and their signaling pathways. Key components include:

- Macrophage**: Interacts with **CCP synoviale** (synovial CCP) via **FcγR** and **CD14/CD28**. It produces **TNF-α, IL1, IL6** and **chimiokines**.
- CD** (Dendritic Cell): Expresses **TLR** and **CD20**. It interacts with **LT** (Lymphoid Tissue) and **TH17** cells.
- LT** (Lymphoid Tissue): Interacts with **CD20** and **CD28** on the CD cell. It produces **TNF-α, IL1, IL6**.
- LB** (Lymphocyte): Expresses **BAFFR** and **CD20**. It interacts with **PC** (Plasma Cell) and **TH17** cells.
- PC** (Plasma Cell): Produces **Auto-AC** (Autoantibodies).
- TH17**: Produces **IL17**.
- Treg** (Regulatory T cell): Interacts with **TH17** cells.
- Neovascularization and Recruitment**: Driven by **TNF-α, IL1, IL6** and **chimiokines**.
- Mb synoviale** (Synovial Membrane): Interacts with **RANK** (Receptor Activating Modifying Protein) via **IL1, IL6, PGE2, MMPs**.

(*CCP : protéine cyclique citrullinée, *M : macrophage, *CD : cellules dendritique, *LT : lymphocyte T, *TH17 : lymphocyte T helper, *Treg : lymphocyte T régulateur, *LB : lymphocyte B, *S : synovioocyte, *C : chondrocyte et *O : ostéoclaste)

L'activation des TLR permet aux cellules de l'immunité innée d'exercer pleinement leur fonction de CPA. La cellule capte les néoantigènes (CCP), générés au niveau de l'articulation, et les charge sur les molécules de classe II du CMH. Ce chargement des CCP est facilité par la présence de l'épitope partagé sur les molécules HLA DR. Le complexe CCP-CMH migre vers la membrane de la CPA pour être présenté aux lymphocytes TCD4 (139). Cette interaction entre la CPA et le lymphocyte a lieu, le plus souvent, dans les follicules lymphoïdes ectopiques formés dans la synoviale. En effet, au cours de la PR, les lymphocytes peuvent se regrouper en formations structurées appelées follicules à centre germinatif. Ces follicules,

comparables à ceux des ganglions, sont le siège d'une intense prolifération et différenciation des cellules B et T (161).

- Activation des lymphocytes TCD4 :

Le signal 1 d'activation des lymphocytes TCD4 naïfs est la liaison du complexe « récepteur T de l'antigène (TCR)- CD3 » des lymphocytes avec le complexe « molécule de classe II du CMH chargée des CCP ». Le signal 2 est donné par la liaison des molécules de costimulation exprimées sur la cellule dendritique (CD80/86, CD40) et leurs ligands respectifs sur le lymphocyte (CD28, CD40L) (63). L'activation de ces molécules de surface du lymphocyte TCD4 aboutit à une transduction du signal à travers un ensemble de tyrosines kinases : Lck, Fyn, et « ζ -associated protein of 70 kDa » (ZAP-70). Cette transduction du signal dans le lymphocyte TCD4 est entretenue et amplifiée dans la PR par l'existence d'un allèle de susceptibilité (620W) du gène « tyrosine phosphate non-receptor type 22 » (*PTPN22*) qui n'exerce pas l'inhibition régulatrice normale sur des tyrosines Lck, Zap70 et CD3 ζ et entretient l'activation des lymphocytes T (80, 53 ;140).

Après son activation, le lymphocyte TCD4 se différencie en l'une des trois sous-populations de T effecteurs (T helper 1 (TH1), TH2, TH17) ou en T régulateur (Treg) (65). La PR était connue pour être une pathologie TH1 avec synthèse d'IFN γ et inhibition des lymphocytes TH2. Plusieurs éléments ont permis de changer ce concept : la quasi-absence d'IFN γ au niveau de la membrane synoviale des PR, l'inefficacité des anticorps monoclonaux anti-IFN γ , la découverte du TH17 et la caractérisation des Treg. Le concept actuel de la pathogénie de la PR est donc en faveur d'une balance TH17/Treg et non plus TH1/TH2 (24).

La différenciation du TCD4, en TH17 est induite par deux cytokines : le « transforming growth factor β » (TGF β) et l'IL6. Le TH17 sécrète une cytokine pro-inflammatoire, l'IL17 (129) qui induit la sécrétion de différents facteurs selon les cellules : IL1, IL6, PGE2 et MMPs par les synoviocytes et les chondrocytes, IL1, IL6 et TNF α par les macrophages et l'expression de « receptor activator of NF- κ B ligand » (RANKL) sur les ostéoblastes (70 ;58). L'IL17 intervient ainsi dans le recrutement et l'activation des cellules immunitaires (monocytes et lymphocytes), dans l'angiogenèse, dans la prolifération et l'inflammation de la membrane synoviale, dans la résorption de l'os et dans la dégénérescence de la matrice extracellulaire (109).

Le deuxième élément de la balance est le Treg qui exprime le CD25, le « forkhead box P3 » (FoxP3), le « cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 » (CTLA-4), le récepteur du TNF (TNFR) et le récepteur de TGF β (TGFR). Au cours de la PR, l'action suppressive des Treg

sur l'activation et la prolifération des T effecteurs, des B et des cellules dendritiques est déficiente. La présence d'un taux très élevé de TNF α inhibe Foxp3 et donc la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires (TGF β , IL10), d'où un déséquilibre en faveur des cytokines pro-inflammatoires (132). Physiologiquement, les Treg suppriment l'action des T effecteurs grâce à la liaison de leur molécule CTLA4 aux molécules CD80/86 de la cellule dendritique au lieu de la molécule CD28 (171). Au cours de la PR, l'excès d'internalisation ou le défaut d'acheminement vers la membrane de la molécule CTLA4 entrave l'action de Treg. De plus, les T effecteurs semblent résistants à la régulation par les Treg (64 ; 62). Les Treg entraînent, dans les conditions normales, l'apoptose des lymphocytes B et inhibent leur coopération avec les lymphocytes T. L'action défaillante des Treg dans la PR induit un défaut d'apoptose, lève l'inhibition de la coopération avec les T et par conséquent induit la survie des B autoréactifs. Les CPA, plus particulièrement les cellules dendritiques, dans l'articulation rhumatoïde présentent une surexpression des molécules de classe II du CMH et des récepteurs des chémokines telles que CCR7 et sont donc maintenues à l'état de cellules dendritiques immunogènes.

Cette perturbation est due à la défaillance des Treg qui, normalement, suppriment l'action des cellules dendritiques en les rendant tolérogènes. Physiologiquement, l'interaction du Treg avec la cellule dendritique se fait à travers les liaisons de CTLA4 avec CD80-86 et du « glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor » GITR avec GITR ligand. Suite à cette interaction, la cellule dendritique augmente la synthèse interne de l'enzyme indoleamine dioxygénase (IDO) entraînant une diminution du tryptophane du milieu et une augmentation de la kynurenine. Cet environnement empêche l'activation des cellules dendritiques et les maintient à l'état tolérogène (IDO négatif) ne pouvant pas stimuler les TCD4 naïfs et les transformer en T effecteurs (112). Par ailleurs, la privation en tryptophane et la présence de kynurenine stimulent la transformation des TCD4 naïfs en Treg avec expression du récepteur de l'IL2 (CD25) et l'acquisition des fonctions suppressives (144,23).

- Activation des lymphocytes B :

Le lymphocyte B joue plusieurs rôles dans la PR : synthèse et sécrétion d'auto-anticorps, CPA et sécrétion de cytokines.

Dans les follicules lymphoïdes ectopiques de la synoviale, l'activation du lymphocyte B passe par la coopération avec le lymphocyte TCD4 (32). La formation de ce conjugué B-T permet au lymphocyte B d'avancer dans le cycle cellulaire, de se multiplier et de se différencier en plasmocyte sécréteur d'auto-anticorps (60). L'entretien de cette population de lymphocytes B autoréactifs au cours de la PR est dû à une surproduction du « B-cell

activation factor » (BAFF) et du « a proliferation-inducing ligand » (APRIL) (110). BAFF et APRIL sont des cytokines de la famille des TNF, exprimées par les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les synoviocytes sous l'action des IFN γ , de l'IL10, du « granulocyte colony-stimulating factor » (G-CSF), du CD40L et des peptidoglycanes. La liaison avec leurs ligands sur les lymphocytes B, « transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor » (TACI) et BAFF R, induit une activation de la voie NF- κ B intracellulaire et un signal anti-apoptotique (156).

Une autre molécule importante sur le lymphocyte B est le CD20 exprimée sur les lymphocytes pré B et les B matures. La molécule CD20, présente dans les radeaux lipidiques de la membrane cellulaire, interviendrait après activation du récepteur B de l'antigène (BCR), en tant que canal calcique dans de nombreuses voies de signalisation mises en jeu dans la prolifération, l'activation, la différenciation et l'apoptose du lymphocyte B (149).

L'activation des récepteurs de surface du lymphocyte B déclenche des voies de transduction du signal qui sont initiées par les tyrosines kinases Syk et Src et qui aboutissent à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP1. Les lymphocytes B ainsi activés se transforment en plasmocytes sécréteurs d'auto-anticorps anti-CCP. Ces anticorps, marqueurs spécifiques de la PR, ont permis une classification de la PR en deux phénotypes cliniques : anti-CCP positifs et anti-CCP négatifs. Les patients avec anti-CCP positifs présentent les facteurs génétiques de susceptibilité, une maladie plus agressive avec des manifestations locales et systémiques sévères (95).

2.4.4. Phase de destruction articulaire :

La destruction du cartilage et l'érosion osseuse, caractéristiques de la PR, sont dues à une attaque du cartilage par les MMPs et à un déséquilibre de la balance du remodelage osseux. Dans l'articulation rhumatoïde, sous l'action du TNF α , de l'IL6 et de l'IL17, les synoviocytes sécrètent les MMPs (MMP1 et MMP3) qui détruisent le cartilage.

Les synoviocytes de la couche superficielle bordante ont un caractère particulièrement agressif et invasif qui leur permet de s'attacher fortement au cartilage et d'envahir profondément la matrice extracellulaire. L'attachement solide au cartilage est dû à l'augmentation de l'expression des CAM (β intégrines : « very late antigen » VLA3, 4,5) induite par l'activation des facteurs de transcription AP1 et NF- κ B sous l'action des cytokines. Ces synoviocytes présentent également une résistance à l'apoptose expliquée par une perte partielle de la capacité de réponse aux stimuli pro-apoptotiques (Fas) et une augmentation des facteurs anti-apoptotiques (131). L'érosion osseuse de la PR est due à une activation anormalement entretenue des ostéoclastes. Sous l'action du « macrophage

colonystimulating factor » (M-CSF) et de l'activation de RANK, les pro-ostéoclastes dérivés des précurseurs myéloïdes (monocytes/macrophages) se transforment en ostéoclastes.

RANK est activé par sa liaison avec son ligand RANKL soluble ou exprimé sur les synoviocytes, les ostéoblastes et les T activés. La transduction du signal après liaison de RANKL à RANK emprunte les mêmes voies que les cytokines et aboutit aux facteurs de transcription : AP1, NF- κ B.

Le mécanisme de régulation physiologique représenté par l'ostéoprotégérine (OPG), compétiteur naturel de RANKL vis-à-vis de leur récepteur RANK, est dépassé au cours de la PR : il y a un déséquilibre entre RANKL et OPG en faveur de RANKL qui est dû à la présence des cytokines : IL1, IL17 et TNF α . La défaillance de cette régulation induit une activation continue des ostéoclastes et une destruction osseuse (12, 183).

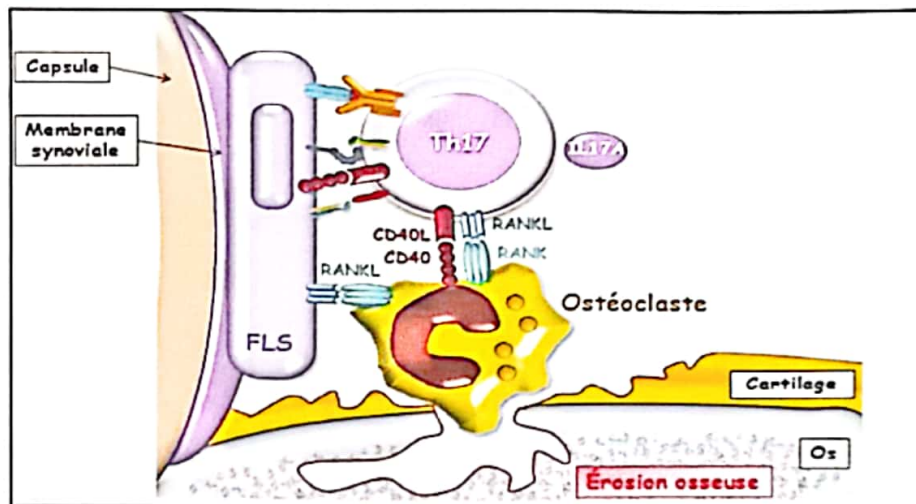


Figure 18 : Action des lymphocytes TH₁₇ sur les macrophages synoviaux.

2.4.5. Phase de réparation :

Cette phase est responsable de la fibrose articulaire mais ne compense pas le processus de destruction. Les facteurs de croissance et le TGF β induisent la synthèse de collagènes et de protéoglycanes par les chondrocytes. Conjointement, les cytokines de type Th2 et notamment l'IL10 inhibent la libération par les cellules synoviales de métalloprotéases de façon dose dépendante. L'IL10 induit également la synthèse d'inhibiteurs des métalloprotéases (TIMP). Enfin, les facteurs de croissance (EGF, FGF, PDGF) favorisent la croissance des synoviocytes fibroblastiques conduisant à la formation de tissu fibreux cicatriciel (104).

2.5. Signes cliniques :

La PR se manifeste par une polyarthrite bilatérale, symétrique et distale. Elle concerne en général plus de 3 articulations, en particulier les poignets, les articulations métacarpo-phalangiennes ou inter-phalangiennes proximales, et les métatarso-phalangiennes (figure 18). Le patient décrit des douleurs de rythme inflammatoire et l'examen objective une synovite (gonflement articulaire). Les ténosynovites (extenseur ulnaire du carpe) et bursites (olécrânienne, achilléenne) sont fréquentes.

2.5.1. Phase de début :

La PR débute souvent de manière insidieuse: les symptômes arrivent très progressivement, sur plusieurs semaines voire plusieurs mois, s'accompagnant parfois d'une altération de l'état général mais qui reste le plus souvent modérée. Plus rarement, certains patients présentent une atteinte monoarticulaire ou inversement, une atteinte multi-viscérale.



Figure 19 : PR à la phase de début (211).

Dans la PR, la douleur est principalement nocturne, ce qui réveille le patient, et s'estompe progressivement avec l'exercice, plus communément appelé dérouillage matinal dont la durée est un indice de gravité de la maladie. Le patient se réveille avec les doigts dits « en fuseau ». Ces phénomènes inflammatoires nocturnes auront un retentissement diurne (55,44).

De manière plus précise, la clinique tout comme la biologie, est différente selon le stade de la PR. Pour une PR débutante, les signes sont globalement discrets. On observera une oligoarthritis distale dans 70% des cas (44 ;141), qui est dite fixe et symétrique et décrite par une synovite au niveau de l'articulation carpienne, métacarpophalangienne, interphalangienne

proximale et puis au niveau de la gaine des tendons fléchisseurs et extenseurs des doigts (ténosynovite dite crépitant).

Les douleurs seront inflammatoires, nocturnes, maximales au réveil avec un enraidissement matinal mais diminuant, comme vu précédemment après un dérouillage articulaire plus ou moins long. Une tuméfaction peut être retrouvée. Dans 20% des cas, il peut s'agir d'une polyarthrite aigue fébrile s'accompagnant d'une altération de l'état général.

2.5.2. Phase d'état :

2.5.2.1. Manifestation articulaires :

Pour une PR dite en phase d'état, les manifestations articulaires montrent une évolution par poussées ou dans 90% des cas, les mains sont touchées avec une déformation, une amyotrophie et une ténosynovite. Une rupture de tendon, type tendon d'Achille sera possible et sera très difficile à prendre en charge et à réparer: dans ce cas, il est dit que la ténosynovite est crépitante. Au niveau articulaire, il y a substitution du tissu détruit par un tissu de granulation qui envahit toute l'articulation laissant apparaître le pannus synovial.

A long terme, ce tissu de remplacement devient gênant, entraînant généralement une intervention chirurgicale par arthroscopie(44).



Figure 20 : PR en phase d'état avec déformation du pouce dite en Z – Synovite des MCP, subluxation et déviation en coup de vent cubital des doigts (211).

Localisation articulaire	Manifestations
Mains (Fig.20)	Déviations cubitales des quatre derniers doigts en « coup de vent » liée à l'atteinte inflammatoire des articulations MCP. Doigts en boutonnière (flexion de l'IPP + hyperextension de l'IPD). Déformation en col-de-cygne (hyperextension de l'IPP + flexion de l'IPD). Pouce en Z (synovite de la 1 ^{ère} MCP + flexion de la MCP). Ténosynovites à la main.
Poignet	Atteinte radio-ulnaire distale (luxation dorsale de la styloïde ulnaire dite en « touche de piano »). Atteinte radio-carpienne (poignet en « dos de chameau »).
Coudes	Attitude en <i>flessum</i> .
Pieds	Atteinte des MTP.
Rachis cervical	Atteinte érosive de la charnière cervico-occipitale avec arthrite occipitoatloïdienne et atloïdoaxoïdienne (diastasis C1, C2) avec risque d'impression basilaire.
Bassin	Coxite rhumatoïde.

Tableau 1: les principales manifestations articulaires lors de la phase d'état (201).

2.5.2.2. Les manifestations extra articulaires :

Les manifestations extra-articulaires traduisent le caractère systémique de la PR, elles s'observent surtout au cours d'une PR sévère, ancienne et avec un titre élevé en facteur rhumatoïde.

Localisation extra-articulaire	Manifestations
Peau	Nodules rhumatoïdes sous-cutanés 10 à 30 %
Poumon	Pleurésie : 2 à 4 % (40 %) Fibrose interstitielle diffuse : 1 à 2 % Nodules rhumatoïdes pulmonaires : 0,4 %
Cœur et vaisseaux	Péricardite : 2 à 10 % (40 %) Lésions valvulaires spécifiques : 3 % Trouble de la conduction Vascularite : 1 % (25 %)
Système nerveux	Névrite d'origine ischémique : 1 % Névrites sensitives distales Neuropathie par compression juxta-articulaire ou cervicale
Œil	Syndrome de Gougerot-sjögren : 21 % Sclérite ou épisclérite : 2 à 5 %
Rein	Amylose 5 % (14 à 26 %)

Tableau 2 : Liste non exhaustive des principales manifestations extra-articulaires de la polyarthrite rhumatoïde (141).

2.6. Signes biologiques :

2.6.1. Bilan inflammatoire :

S'agissant d'une maladie inflammatoire chronique, un bilan sanguin simple à la recherche de marqueurs de l'inflammation est nécessaire.

Dans 90 % des cas, on observe un syndrome inflammatoire non spécifique, avec augmentation de la vitesse de sédimentation (VS) globulaire, parfois de la protéine C réactive (CRP). Cette élévation a aussi une valeur pronostique.

Près de 10 % des PR ont une VS normale mais cela n'élimine pas le diagnostic. L'électrophorèse sérique objective une augmentation des alpha-2 et, de façon plus ou moins importante, des γ -globulines. Il existe parfois une anémie modérée, normo- ou hypochrome, hyposidérémique avec coefficient de saturation de la transferrine peu diminué (141).

2.6.2. Bilan d'auto-immunité :

- **Facteurs rhumatoïdes :**

Les facteurs rhumatoïdes (FR) sont des autoanticorps, principalement d'isotype IgM (parfois d'isotype IgG ou IgA), dirigés contre le fragment Fc (la partie constante) d'IgG humaines et/ou animales.

En faible quantité, ils facilitent l'élimination des complexes immuns par le système réticulo-histiocytaire et participent à la première ligne de défense anti-infectieuse. Ils ont un rôle immunorégulateur en intervenant dans le réseau idiotypique. Au cours des maladies auto – immunes, ils empêchent la capture des complexes immuns par les récepteurs glomérulaires et favorisent l'inflammation en activant le complément au niveau synovial (119 ; 209).

Le FR est positif dans 50 à 60% des cas de PR débutantes. Bien qu'un taux élevé de FR en début de maladie soit un facteur de mauvais pronostic ; à la phase d'état le FR est présent dans 70 à 80 % des cas, ce qui correspond aux PR dites " séropositives " par opposition aux PR "séronégatives " chez lesquelles il n'y a pas de FR décelable.

La présence de FR n'est ni suffisant ni indispensable pour poser le diagnostic. Par ailleurs, le FR n'a à priori pas de rôle direct dans le développement de la synovite rhumatoïde. Ceci étant démontré par la survenue de PR très érosives chez des patients FR négatifs(113).

La spécificité du FR varie en fonction du contexte clinique ; elle est forte en présence d'un tableau de polyarthrite, faible en son absence. Elle présente l'avantage de détecter les trois isotypes de FR (IgA, IgG, IgM) mais elle n'est pas standardisée.

On a observé que la positivité à plusieurs tests, synonyme de détection de plusieurs isotypes de FR, est spécifié que de la PR.

Techniques de détection : Ils sont détectables par différentes méthodes :

- Les techniques d'agglutination (**réaction au latex**) : Les IGM pentamérique agglutinent les particules sur lesquelles ont été fixées les IgG de l'homme qui leur servent de cibles. L'agglutination est considérée comme une réaction positive qui indique la présence du facteur rhumatoïde à un niveau détectable. Le test au latex en tube est considéré comme positif à partir de la dilution au 1/80^e(90).

- Test de **Waler Rose** : C'est une technique d'hémagglutination passive utilisant des hématies de moutons recouvertes d'Ig de lapin anti-hématies de mouton.

C'est le même principe que le test du latex mais dans ce cas c'est les IgG du lapin qui constituent la cible. Cette méthode met principalement en évidence que les FR de type IgM qui sont les seuls agglutinants. Elle nécessite la réalisation d'un témoin avec des hématies non sensibilisées pour éviter les faux positifs dus aux hétéro anticorps(121).

- **Néphélométrie laser** : Elle mesure l'intensité de la lumière dispersée par le complexe formé de particules de polystyrène sensibilisées et de facteurs rhumatoïdes. Les immunoglobulines fixées sur le polystyrène peuvent être d'origine humaine, animale ou constituées d'un mélange. C'est une technique automatisable, reproductible, linéaire, sensible qui, grâce à la forte dilution du sérum, s'affranchit de certaines interférences(90).

- La méthode **ELISA** (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, test d'immuno-absorption enzymatique) : la détection du FR se fait actuellement plutôt par ELISA et par néphélométrie laser. Des immunoglobulines G (humaines ou animales) sont fixées sur une microplaque. La présence de facteurs rhumatoïdes se traduira par une réaction colorée proportionnelle à leur taux.

• **Autoanticorps anti-peptides ou protéines citrullinés (ACCP) :**

L'anti-CCP est un marqueur sérologique de la PR et peut être détecté à des stades très précoces de la maladie pouvant servir de facteurs prédictifs de l'évolution et du pronostic.

Il est présent dans 70% des cas dans les PR anciennes et 40% dans les PR débutantes dans la cohorte ESPOIR. Ce marqueur n'est pas influencé par l'ancienneté de la maladie ni par la biothérapie mais celles-ci diminuent leur taux de 20 à 30%. On les trouve chez 6 à 40% des patients souffrant de PR séronégatifs pour les FR, ce qui prouve l'indépendance entre FR et CCP. La présence de ces anticorps est associée à des formes sévères de la PR. La fréquence des érosions est dix fois plus élevée chez des patients avec des anti-CCP (90). Ces autoanticorps ont reçu successivement plusieurs appellations : anti-périnucléaires (1964), anti-kératine (1979), anti-stratum corneum, anti-filaggrine (1993), anti-peptides cycliques citrullinés (anti-CCP), ou anti-peptides ou protéines citrullinés (APPC) (2000) (147; 59).

Les ACCP sont produits dans l'articulation, au sein de la synoviale rhumatoïde. Ces anticorps reconnaissent des épitopes citrullinés qui apparaissent sur diverses protéines (filaggrine, fibrine, etc.) du tissu synovial inflammatoire par suite de la transformation de leurs résidus arginyl en résidus citrullyl.

Cette desimination de protéines, fréquemment qualifiée de citrullination, est une modification post-traductionnelle catalysée par une famille d'enzymes, les peptidyl-arginine desiminases (PAD) (92).

La production d'auto-anticorps dirigés contre des protéines citrulinées est tout à fait spécifique de la PR. Cette production est la résultante d'une part de la citrullination de protéines, due à l'inflammation, d'autre part de la présence d'autres facteurs dont certains seraient génétiques. On sait en effet qu'il existe un lien très étroit entre la production d'anticorps anti-CCP et les allèles HLA associés à un risque élevé de PR (haplotypes HLA-DR1 et DR4, notamment allèles HLA-DRB1*0401, DRB1*0404, DRB1*0101) ; de plus des polymorphismes génétiques des enzymes PAD ou des récepteurs de cytokines (TNF- α) interviennent probablement dans la susceptibilité à la maladie (92).

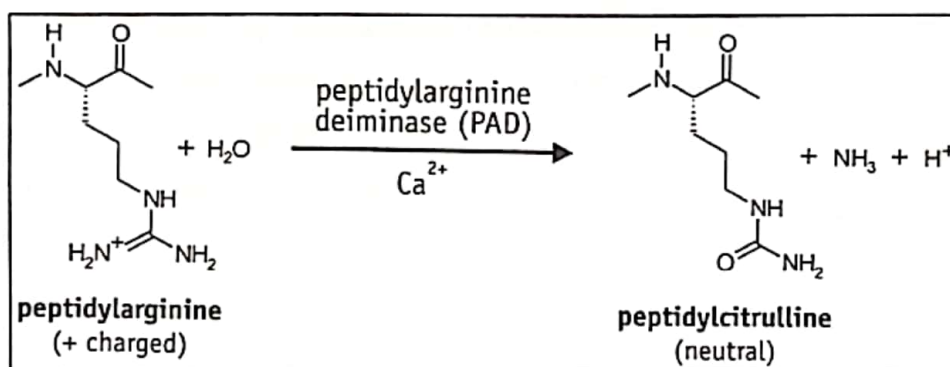


Figure 21 : Citrullination de l'arginine (92).

Techniques de détection :

Seuls les kits à base de peptides citrulinés permettent une reconnaissance spécifique. Le test ELISA IgG/IgA CCP3 est un test semi-quantitatif par immunosorbant lié à une enzyme pour la détection des anticorps IgG et IgA anti-CCP3 (Peptide cyclique citruliné de 3ème génération) dans le sérum des patients, les citrates ou les plasmas EDTA.

Un test ELISA réalisé avec la séquence CCP décrite à l'origine n'a pas été largement commercialisé. Cependant, la seconde génération de tests anti-CCP (CCP2) est largement disponible et possède des performances supérieures à celles du peptide d'origine (173).

Les anticorps anti-CCP sont présents chez les patients atteints d'une PR(15) à un stade précoce, quelquefois sont prédictifs du développement d'une PR plutôt que de FR (181 ; 142). Les anticorps provenant de certains patients atteints de PR, qui sont négatifs vis-à-vis des anti-CCP2, sont réactifs avec d'autres protéines citrulinées (142 ; 180), ce qui laisse penser qu'il

existe des épitopes supplémentaires qui ne sont pas présents dans la séquence antigénique CCP de la seconde génération. En 2005, des trousses utilisant un antigène de 3ème génération (CCP3) sont devenues disponibles. Les tests utilisant cette 3ème génération de peptide ont été montrés approximativement 5% plus sensible que les tests utilisant l'antigène CCP2 et d'une spécificité équivalente(121).

L'antigène utilisé dans la trousse est plus récent; il s'agit d'un peptide CCP3 de 3ème génération. Cette trousse utilise un conjugué qui détecte les anticorps IgA en plus des anticorps IgG habituels. La sensibilité supérieure à celle de la trousse CCP3 vient du fait que quelques patients atteints d'une polyarthrite rhumatoïde ont des anticorps IgA anti CCP3 en l'absence d'anticorps anti IgG(179).

• Les anticorps anti-nucléaires (AAN) :

La recherche des anticorps antinucléaires (AAN) doit être systématique au cours de la PR au début, notamment pour éliminer les connectivites. Dans la PR, les AAN sont positifs dans 15 à 30 % des cas, à un titre généralement assez faible. Les AAN sont des autoanticorps dirigés contre des déterminants antigéniques du noyau mais aussi du cytoplasme des cellules de l'organisme.

Technique de détection : Le dépistage des anticorps antinucléaires se fait, généralement, par immunofluorescence indirecte (IFI). Cette technique étudie la fixation des anticorps du sérum testé sur un noyau. Après incubation et lavage, les anticorps fixés sont révélés par des anticorps anti-immunoglobulines humaines marqués par la fluorescéine ou la rhodamine. Si un anticorps est dépisté il est ensuite titré. Le titre correspond à l'inverse de la dernière dilution du sérum du malade qui donne une fluorescence nucléaire positive. La recherche d'anticorps antinucléaires peut se faire également par ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) ou par Western blot, techniques qui utilisent des antigènes purifiés mais qui sont rarement utilisées en première intention pour le dépistage des anticorps antinucléaires(204).

2.7. Signes radiologiques :

Un bilan radiographique systématique des mains, poignets, pieds et toute autre articulation symptomatique doit être envisagé dès la première consultation médicale en cas de suspicion de PR. Il servira en outre de référence pour apprécier l'évolution de la maladie(203). Ces

examens rechercheront un œdème des parties molles et une déminéralisation épiphysaire en cas de PR débutante (figure 22).



Figure 22: PR débutante : Radiographie standard avec érosions marginales typiques des 2ème, 3ème et 4ème phalanges, déminéralisation épiphysaire et pincement débutant des 2ème, 3ème et 4ème MCP(203).

Si la PR est déjà évoluée, les radiographies mettront en évidence des érosions caractéristiques et des pincements des interlignes articulaires (figure 23).

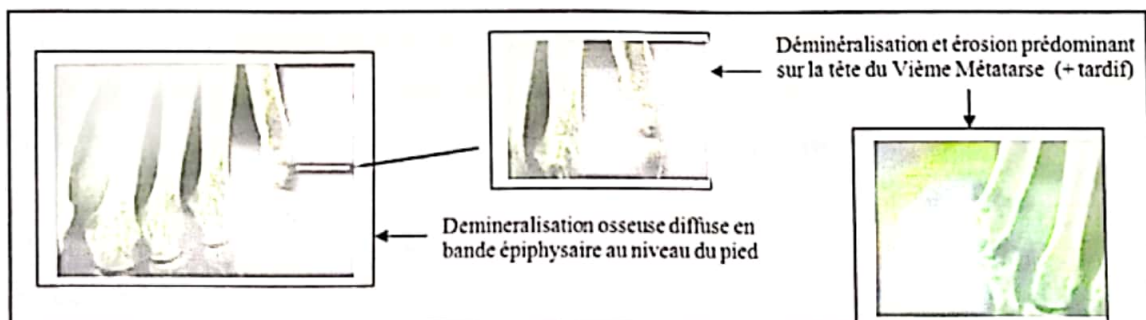


Figure 23 : Aspect radiographique typique d'une PR évoluée ; importantes lésions bilatérales de carpite à tendances fusionnantes, multiples arthropathies globalement bilatérales et symétriques des MCP et IPP (203).

Rappelons toutefois que les atteintes articulaires n'étant pas systématiques au cours de la PR, un bilan radiographique normal ne permet pas d'écarter le diagnostic de PR. En cas de doute, il est possible d'avoir recours à l'échographie articulaire ou à l'IRM (imagerie par résonance magnétique) qui sont plus onéreux mais surtout plus sensibles (notamment pour la mise en évidence des synovites et ténosynovites).

2.8. Diagnostic positif :

En 1987, l'ACR (American College of Rheumatology) a développé des critères de classification pour la PR afin d'améliorer l'homogénéité des populations de patients inclus dans les essais cliniques (9). Ces critères ont progressivement gagné en popularité pour le diagnostic de la PR en pratique clinique quotidienne. Cependant, les critères de l'ACR 1987 avaient une valeur diagnostique limitée pour les stades précoces de la PR (89 ; 85 ; 143), même après l'ajout du titre en anticorps anti-peptides citrullinés (anti-CCP) (108).

En 2010, un panel d'experts de l'ACR et de la Ligue Européenne contre le rhumatisme (European League Against Rheumatism) [EULAR] a rendu public un nouveau set de critères de classification pour la PR (4). Les experts ont commencé par analyser plusieurs cohortes de polyarthrites débutantes afin d'identifier les caractéristiques initiales associées à une thérapie ultérieure par méthotrexate. Ils ont ensuite développé un score basé sur un classement de scénarios correspondant à des cas réels et une classification de cas simulés en se focalisant sur la probabilité la plus grande d'avoir une maladie persistante et/ou érosive (69,125). Afin de déterminer si ces critères de l'ACR/EULAR étaient plus performants que les critères de l'ACR 1987 quant au diagnostic des PR à un stade précoce, il était nécessaire de disposer de cohortes indépendantes de patients atteints d'arthrite débutante (46). Des études ont estimé récemment la valeur diagnostique des critères de l'ACR/EULAR 2010 en se basant sur les données obtenues après un (172, 6 ; 30, 34) ou deux ans (177) de suivi. On a toutefois rapporté précédemment qu'un diagnostic de PR établi par des rhumatologues pouvait changer au cours des premières années de la maladie (124), suggérant la nécessité de périodes de suivi plus longues.

1. Raideur matinale (articulaire ou périarticulaire) d'au moins une heure.
2. Arthrite d'au moins trois articulations (atteinte simultanée constatée par un médecin et du a une hypertrophie des tissus mous ou a un épanchement articulaire. Quatorze articulations ou groupes d'articulations sont prises en compte: inter-phalangiennes proximales (IPP), metacarpo-phalangiennes (MCP), poignets, coudes, genoux, chevilles, metatarso-phalangiennes (MTP)).
3. Arthrite touchant la main (poignet, MCP, IPP).
4. Arthrite symétrique (atteinte simultanée et bilatérale des articulations ou groupes d'articulations définis en 2. L'atteinte simultanée des IPP; MCP et MTP est acceptable même en l'absence de symétrie parfaite).
5. Nodules rhumatoïdes (nodosités sous-cutanées constatées par un médecin sur des crêtes osseuses ou des surfaces d'extension ou en situation périarticulaire).
6. Présence de FR.
7. Lésions radiologiques typiques sur les clichés des mains et des poignets (démminéralisation en bande évidente ou érosions osseuses).
La présence d'au moins 4 critères sur 7 est indispensable pour définir la PR. Les 4 premiers items doivent avoir une durée d'au moins 6 semaines.

Tableau 3 : Les critères de classification de la PR (ACR, 1987) (10)

	Score
A. Atteinte articulaire (0-5)	
- Une grosse articulation	0
- De deux à dix grosses articulations	1
- D'une à trois petites articulations (avec ou sans grosse articulation)	2
- De quatre à dix petites articulations (avec ou sans grosse articulation)	3
- Plus de dix articulations (au moins une petite articulation)	5
B. sérologie (0-3)	
- Absence de facteur rhumatoïde et d'anticorps anti CCP	0
- FR positif à taux faibles ou ACCP positif à taux faibles	2
- FR positif à taux élevés ou ACCP positif à taux élevés	3
C. Durée des symptômes (0-1)	
- Moins de six semaines	0
- Six semaines et plus	1
D. Protéines de phase aiguë (0-1)	
- Taux de protéine C réactive normal et vitesse de sédimentation normale	0
- Taux de protéine C réactive anormal ou vitesse de sédimentation anormale	1
Score (A+B+C+D)	
Un score de 6 et plus est nécessaire pour poser un diagnostic de polyarthrite rhumatoïde.	

Tableau 4 : Critères de classification ACR/EULAR 2010 de la polyarthrite rhumatoïde (3).

2.9. Diagnostic différentiel :

Le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde se pose différemment selon le tableau clinique réalisé.

a) Devant un début aigu polyartculaire : Il faut discuter les affections suivantes.

- Rhumatisme articulaire aigu :

Le problème se pose rarement en pratique chez l'adulte jeune; on recherche une infection streptococcique récente, une atteinte cardiaque associée, et on s'aide, non pas d'un prélèvement de gorge, négatif à ce stade, mais du dosage des antistreptolysines ou des antistreptodornases.

- Polyarthrite inaugurale d'hépatite virale :

Intérêt du dosage des transaminases, de l'antigène HBs et des IgM anti-HBc; la polyarthrite guérit avec l'apparition de l'ictère.

- Autre polyarthrite virale :

Rubéole et Parvovirus B19 surtout, Chikungunia (la Réunion, Océan Indien et Pacifique).

- Manifestations articulaires de l'endocardite d'Osler :

Intérêt des hémocultures, de l'échocardiographie à la recherche de végétations valvulaires; ce diagnostic est d'autant plus important que les facteurs rhumatoïdes sont fréquents (50 p. 100) au cours des endocardites subaiguës(195).

b) Devant un début monoartculaire : Il faut discuter les affections suivantes :

- Tuberculose :

Intérêt de la biopsie synoviale.

- Crise de goutte ou plus souvent de chondrocalcinose articulaire

C'est dire l'intérêt de la recherche des microcristaux dans le liquide synovial.

- Arthrite infectieuse d'expression abâtardie par un traitement antibiotique

Beaucoup plus souvent discutée(195).

c) Devant une polyarthrite non destructrice : On élimine les affections suivantes :

- Connectivite :

Non pas tant une sclérodémie ou une dermatopolymyosite qu'une maladie lupique au cours de laquelle peut survenir une polyarthrite.

En effet, on sait la fréquence des anticorps antinucléaires au cours de la polyarthrite rhumatoïde (25 p. 100). Par ailleurs les facteurs rhumatoïdes se rencontrent dans 20 p. 100 des LED. Cependant, peuvent être utiles au diagnostic du LED : l'absence d'anticorps anti-peptides citrullinés, une hypocomplémentémie. La PR et le lupus sont parfois exceptionnellement associés ("rhupus")(195).

- Syndrome de Sjögren primitif :

Il peut se révéler par des manifestations extra-glandulaires systémiques et notamment une polyarthrite bilatérale et symétrique(195).

d) Devant une polyarthrite destructrice : On élimine les affections suivantes :

- Rhumatisme psoriasique :

Il peut simuler en tous points une polyarthrite rhumatoïde; on y pensera devant :

- . Le caractère moins symétrique de l'atteinte articulaire;
- . L'atteinte, si non exclusive, du moins précoce, des articulations interphalangiennes distales
- . Surtout la découverte de signes cutanés de psoriasis, parfois oubliés car anciens ou cantonnés aux sièges d'élection (cuir chevelu, coudes, genoux, ombilic, sillon interfessier ou rétroauriculaire, ongles); l'atteinte articulaire peut précéder les signes cutanés(195).

- Manifestations périphériques d'une spondylarthrite ankylosante (SPA) :

Il s'agit habituellement d'un homme jeune. L'interrogatoire retrouve les douleurs rachidiennes et sacro-iliaques et l'existence possible d'une iritis. La prédominance des manifestations périphériques doit faire chercher une étiologie (syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter, psoriasis, entérocologie "Crohn et rectocolite hémorragique").

Tous ces rhumatismes inflammatoires avec atteinte axiale surviennent sur un terrain génétique particulier : 85 % des malades ayant une SPA sont porteurs de l'antigène d'histocompatibilité HLA-B27. Les fréquences sont moins élevées dans les autres spondylarthropathies(195).

e) Autres diagnostics différentiels :

Deux diagnostics ne doivent pas être oubliés :

- La pseudo polyarthrite rhizomélisque devant une polyarthrite débutant aux ceintures chez un sujet âgé: l'association à une maladie de Horton fait courir un risque oculaire qui nécessite un traitement urgent
- L'ostéoarthropathie hypertrophiante pneumonique de Pierre Marie devant une " polyarthrite " acromélisque (l'hippocratisme digital doit orienter et mener à la radiographie pulmonaire qui révèle habituellement un cancer pulmonaire).

Un diagnostic est exceptionnel: le rhumatisme de l'hypogammaglobulinémie de type variable à révélation tardive de l'adulte.

Doivent y faire penser les antécédents d'épisodes infectieux à répétition. Ces sujets n'ont pas de facteurs rhumatoïdes(195).

2.10. Evolution et pronostic:**2.10.1. Evolution à long terme :**

L'évolution à long terme de la PR est extrêmement variable à l'échelon individuel, certaines formes dites bénignes, représentant environ 25% des cas, ne vont pas conduire à des déformations articulaires. Dans d'autre cas, des destructions articulaires peuvent se constituer rapidement en quelques années et s'accompagne d'un handicap majeur. Certaines formes de maladies sont caractérisées par une atteinte extra-articulaire pouvant engager le pronostic vital.

La PR diminue l'espérance de vie de 3 à 18 ans selon les séries, en moyenne de 5 à 10 ans par rapport à une population témoin, le décès surviendrait 3 à 4ans plus tôt chez les hommes et 10ans plus tôt chez les femmes (3).

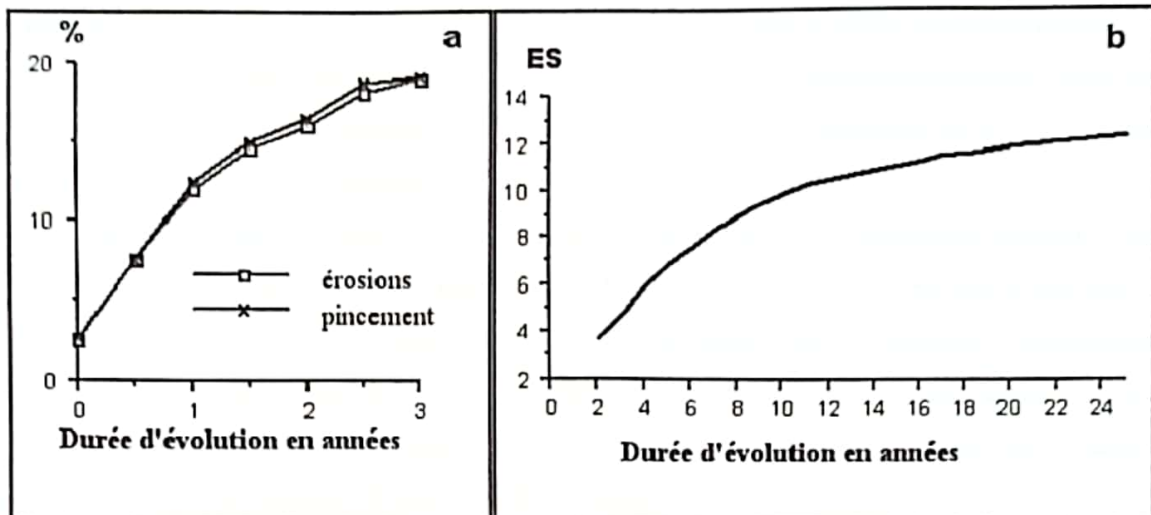


Figure 24 : Rapidité d'évolution des lésions articulaires radiologiques en fonction de l'ancienneté de la maladie. Cette évolution apparaît plus rapide au cours des 3 premières années (a) et se poursuit ensuite tout au long de la maladie (b) (ES= score d'érosions)(3).

. La notion de rémission:

Les remissions sont possibles, parfois durables, souvent transitoires. Elles peuvent survenir sous l'action des thérapeutiques ou de façon spontanée. Certains critères sont nécessaires pour pouvoir parler de rémission:

- raideur matinale d'une durée inférieure à 15 minutes
- absence d'asthénie
- absence de douleur articulaire à l'interrogatoire
- absence de douleur articulaire lors des mouvements
- absence de gonflement articulaire ou de téno-synovite
- VS < 30 mm à la 1^{ère} heure chez la femme, à 20 mm chez l'homme.

Cinq de ces critères doivent être présents pendant au minimum 2 mois consécutifs(102).

.. Mortalité et morbidité :

La PR a été considérée, jusqu'au début des années 80, comme une maladie certes handicapante mais essentiellement bénigne et de bon pronostic. Cette notion a largement évolué et toutes les études de la littérature sauf une concluent que la PR diminue l'espérance de vie des patients, avec un taux standardisé de mortalité (rapport entre le nombre de décès observé dans la population de PR et le nombre de décès attendu par référence à la population générale) variable mais en moyenne supérieur à 2 (165).

Un risque vital est possible dans les formes particulièrement sévères, comportant soit des manifestations systémiques, soit des dégradations ostéo-cartilagineuses importantes. Selon les études, la diminution de l'espérance de vie dans la PR varie en moyenne de 5 à 10 ans par rapport à une population générale de référence.

Les causes de mortalité sont difficiles à évaluer car souvent peu reprises sur les certificats de décès. On considère que l'augmentation de la mortalité dans la PR est due d'une part à l'augmentation des causes non spécifiques (cardiovasculaires, accidents vasculaires cérébraux) et d'autre part à des causes spécifiques de la PR (infections, notamment pulmonaires, leucémie et lymphome, vascularite, atteinte pulmonaire spécifique, cardiopathie, complications neurologiques d'une atteinte cervicale).

Le risque cardiovasculaire de la PR représente le premier facteur de mortalité de cette maladie (165).

2.10.2. Pronostic :

Du fait de la grande hétérogénéité de la PR, les facteurs permettant d'évaluer le pronostic de la maladie doivent être recherchés et identifiés le plus rapidement possible. Ils permettront d'adapter la prise en charge de la pathologie en fonction de sa probable évolution. Les facteurs pronostics sont d'ordre clinique, radiologique, biologique et génétique.

Sur le plan clinique, la maladie sera jugée de moins bon pronostic si elle se déclenche à un âge avancé, chez une femme, avec des manifestations extra-articulaires, suivant un début aigu et avec un nombre élevé d'articulations douloureuses et enflées. Le nombre d'articulations touchées semblent être particulièrement bien corrélé au pronostic de la PR.

Au niveau radiographique, l'existence d'érosions précoces sont en faveur d'une forme sévère de PR associée à des destructions ostéo-cartilagineuses. A moyen terme ceci semble être le meilleur marqueur pronostic (45).

Un mauvais indice de qualité de vie au début de la maladie est souvent corrélé avec un handicap fonctionnel à moyen ou long terme. Les indices de qualité de vie comme le HAQ peuvent donc servir de facteur pronostic.

D'un point de vue biologique, une inflammation persistante et notamment un taux élevé de protéine C-réactive est associée à un caractère érosif ultérieur de la PR. Un important taux de facteurs rhumatoïdes dans le sérum dès le début de la pathologie est aussi signe d'une PR de

mauvais pronostic. Les anticorps anti-CCP semblent de la même façon de bons marqueurs pronostics (87).

La présence d'au moins un allèle à risque HLA-DRB1*0401 ou HLA-DRB1*0404 est identifiée dans 96% des PR sévères avec lésions articulaires importantes et / ou manifestations extra-articulaires (78). Le typage génétique présente donc un intérêt pronostic important.

2.11. Traitement :

Le traitement de la polyarthrite a pour objectif de soulager la douleur et de stopper ou ralentir l'évolution de la maladie afin de prévenir la survenue de lésions articulaires destructrices responsables de l'handicap. Le traitement symptomatique comprend l'utilisation d'antalgiques simples, d'anti-inflammatoires stéroïdiens ou non stéroïdiens, des traitements infiltratifs locaux et des mesures non médicamenteuses (orthèses de repos par exemple).

Le traitement de fond a pour but de limiter la progression de la maladie. De nombreux traitements sont actuellement disponibles. Il existe les traitements de fond non biologiques conventionnels (DMARDS) dont le chef de file est le méthotrexate (MTX), traitement de première intention d'une part et utilisé en association aux traitements biologiques d'autre part. Les traitements biologiques, ou biothérapies, sont majoritairement utilisés en cas d'échec ou d'intolérance au MTX.

2.11.1. Traitements médicamenteux :

2.11.1.1. Traitement de première intention : traitement symptomatique :

- **Antalgiques :**

Le paracétamol seul ou associé à la codéine ou au Tramadol est utilisé pour soulager rapidement la douleur.

- **A.I.N.S :**

Les AINS traditionnels pour la plus part inhibent l'activité de la cyclo-oxygénase1(Cox1) constitutive et la cyclo-oxygénase2 (Cox2) inductible au cours des états inflammatoires. En raison de l'augmentation du risque cardiovasculaire avec le rofécoxib, il convient d'utiliser le célécoxib chez les patients à faible risque cardiovasculaire et présentant des troubles gastro-intestinaux dus aux AINS traditionnels (7).

- **Corticostéroïdes :**

Les corticoïdes utilisés par voie orale à faible dose (5 à 7,5 mg) entraînent une amélioration dans la PR. Dans une PR très évolutive au début, la dose proposée est de l'ordre de 10 à 15

mg par jour. Cette dose étant très lentement réduite au fur et à mesure que le traitement de fond qui est associé manifeste son efficacité (158 ;182).

La prédnisone ou la prédnisolone sont administrées en une prise matinale à 8 heures. La supplémentation en Calcium (1-1,5g) et vitamine D est systématique.

Les corticoïdes en forte dose en bolus à la dose de 1g de méthylprédnisolone en intraveineux pendant 3 jours consécutifs sont utilisés dans les manifestations viscérales sévères de la PR.

2.11.1.2. Traitements de deuxième intention : Traitements de fond :

Ils sont associés aux traitements anti-inflammatoires (35).

a. Méthotrexate (Novatrex®) (C'est le traitement de référence)

S'utilise per os à la posologie maximale de 0,3 mg/kg/semaine. Cette posologie sera à atteindre en trois mois en débutant à 15 mg/semaine, mensuellement augmentée, jusqu'à 25 mg en cas d'effet incomplet, voire utilisée par voie IM ou sous-cutanée (Metoject®) avant d'en abandonner l'usage. En effet, c'est aujourd'hui le produit qui a le meilleur taux de maintenance. Ce taux traduit à la fois l'efficacité et la tolérance. Les intolérances sont avant tout hépatiques (hépatite cytolytique) et hématologiques. Avant traitement, on demandera des transaminases, une sérologie d'hépatite B et C et une radiographie pulmonaire. On surveillera les transaminases 2 fois par mois au début, puis mensuellement ainsi que la numération formule sanguine. Une adjonction d'acide folique (10 mg par semaine) diminuerait la toxicité. Une contraception efficace est indispensable (risque tératogène) (27).

Le MTX agit principalement sur le métabolisme de l'acide folique, donc ce dernier est indispensable pendant le traitement par le méthotrexate.

b. Leflunomide (Arava®): S'utilise par voie orale, à la dose initiale de 20 mg/jour tous les jours. Son efficacité est comparable à celle du méthotrexate (50).

c. La Salazopyrine®

Elle s'utilise per os à la dose de 2 à 3 g/jour (4 à 6 cp).

d. Antimalariques :

A la dose de 400 mg/24 h, l'hydroxychloroquine (Plaquenil®) (2 cp/j) est un traitement de fond efficace dans les polyarthrites bénignes.

e. Parmi les immunosuppresseurs le cyclophosphamide : Son emploi est à réserver aux PR compliquées d'amylose et aux vascularites nécrosantes mettant en jeu le pronostic vital. La

voie orale est remplacée par les bolus mensuels ou bimensuels. On lui préfère actuellement l'azathioprine (3 mg/kg/j).

f. Les autres traitements de fond d'origine chimique (Petites molécules) ne sont plus guère utilisés qu'en cas d'impasse thérapeutique car leur rapport bénéfice / risque est devenu défavorable (peu ou pas d'activité stabilisatrice des détériorations radiographiques et/ou toxicité parfois sévère).

- Sels d'Or : Le seul dérivé disponible par voie parentérale en France est l'aurothiomalate (Allochrysine®). Il s'utilise par voie IM : à la dose de 0,05 à 0,10 g par injection une fois par semaine jusqu'à une dose totale de 1,20 g.
- Dérivés thiolés (Trolovol® et Acadione®) : Ils s'utilisent par voie orale mais actuellement très rarement prescrits.

A la dose progressivement croissante de 300 mg puis 600 mg/24 h, la D-pénicillamine, ou Trolovol®, constituait un traitement de fond alternatif aux sels d'or.

DCI	Effets indésirables Potentiels	Surveillance biologique	Contre-indications	Grossesse	Allaitement
Méthotrexate	Perturbations du bilan hépatique, cirrhose Fibroses pulmonaires Myélosuppression Éruptions cutanées Troubles digestifs	Surveillance hématologique : numération-formule sanguine toutes les semaines le premier mois, puis mensuelle Surveillance de la fonction rénale : urée, créatinine mensuelle Surveillance hépatique : transaminases, albumine, bilirubine plasmatique mensuelle Surveillance respiratoire : présence d'infections pulmonaires	Hypersensibilité au produit, insuffisance hépatique et rénale sévère, anomalie de la crase sanguine, infections sévères (tuberculose, virus de l'immunodéficience humaine, maladie ulcéreuse gastro-intestinale) Vaccination : vaccins Vivants	Contre-indiquée	CI
Leflunomide	Modification du bilan Hépatique Vertige Troubles digestifs Hypertension artérielle	Surveillance hépatique: alanine aminotransférase (ALAT) toutes les 2 semaines au départ, puis tous les 2 mois Surveillance hématologique : tous les 2 mois	Vaccins vivants atténués, Insuffisance hépatique, immunodéficience grave, infections sévères, hypo-protéïnémie	Non, si taux Plasmatique > 0,02 mg/L	Non
Salazopyrine	Hématologie : macrocytose, anémie hémolytique Syndrome d'hypersensibilité Atteintes hépato-biliaires Atteintes rénales	Surveillance hématologique, rénale et hépatique	Allergie aux salicylés, sulfamides Porphyries Déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD)	Oui	Possible
Hydroxychloroquine Sulfate	Effets dose-dépendants Rétinopathie, rarement Maculopathie irréversible Dermatologie : prurit, dermite, alopecie, photosensibilité Érythème généralisé Fébrile, Hématologie : agranulocytose, aplasie Troubles digestifs Neuromyopathies	Surveillance ophtalmologique Surveillance de la fonction rénale et hépatique Adaptation des doses en fonction des résultats	Porphyrie intermittente	Oui, si seule Alternative	Non

Tableau 5 : Éléments de surveillance et effets indésirables des principales molécules utilisées dans la polyarthrite rhumatoïde(35).

2.11.1.3. Traitements par biothérapie:

Elles ont bouleversé la prise en charge thérapeutique de la PR débutante ou avérée. Elles résultent des connaissances sur la physiopathologie de la synovite rhumatoïde. On utilise les anti-TNF α et les anti-cytokines (IL1, mais surtout IL6), les anti-lymphocytes B CD20+ et le CTLA4-Ig (Orencia®). Elles bloquent (ou freinent) très significativement les détériorations structurales radiographiques articulaires. Elles sont capables d'induire une vraie rémission prolongée dans 30% des cas (35).

- **Anti-TNF α** : On dispose du récepteur soluble du TNF α (Enbrel®) qui s'utilise sous-cutané à la dose de 50 mg par semaine, des anticorps monoclonaux anti-TNF α (Remicade® ou Infliximab en perfusion IV toutes les 8 semaines à 3 mg/kg/perfusion après une période d'attaque de 3 perfusions à S0, S2 et S6, de l'adalimumab à 400 mg sous cutané tous les 14 jours (Humira®) et du certolizumab pegylé (Cimzia® à 400 mg à J0, J15, J30 puis 200 mg tous les 14 jours).
- **Anti-IL1** : On dispose de l'inhibiteur naturel ou IL1-Ra (Anakinra Kineret®) 100 mg sous cutané tous les jours.
- **L'anti-CD20 (Rituximab ou Mabthera®)** s'utilise IV 1000 mg deux fois à 14 jours d'intervalle avec réinduction tous les 6 à 9 mois.
- **L'abatacept (Orencia ®) (ou CTLA4 Ig)** est une molécule de fusion qui s'oppose au signal d'activation TB CD28 - B7-1/B7-2. Il s'utilise en perfusion IV à la posologie de 10 mg/kg une fois par mois.
- **Le toxilizumab (Roactemra ®)** est un anticorps monoclonal anti-récepteur de l'IL6 qui bloque l'activité de l'IL6. Il s'utilise à la posologie de 8 mg/kg IV une fois par mois.

2.11.2. Traitement non médicamenteux :

2.11.2.1. Les traitements locaux :

Les traitements locaux sont un complément indispensable aux mesures générales.

Les infiltrations intra-articulaires de corticoïdes peuvent être justifiées à tous les stades de la maladie, devant la persistance d'une synovite d'une ou deux articulations, alors qu'un contrôle global de l'activité de la maladie a été obtenu par les traitements de fond.

La chirurgie orthopédique peut être nécessaire dans deux circonstances : à un stade précoce, la réalisation d'une synovectomie sous arthroscopie peut permettre de guérir une synovite rebelle aux traitements généraux ou locaux. À un stade tardif, le chirurgien orthopédique peut être sollicité pour corriger des lésions tendineuses, des déformations des doigts ou des orteils ou réaliser un remplacement prothétique d'une articulation détruite (77).

2.11.2.2. La réadaptation fonctionnelle :

La rééducation doit être prescrite en dehors des poussées inflammatoires. Un autoprogramme de renforcement musculaire des membres, comportant des exercices de moyenne ou forte intensité, est capable de diminuer l'activité de la maladie et de prévenir le handicap fonctionnel (51 ;74). Ces exercices physiques doivent être prescrits et surveillés par un spécialiste de médecine physique et réadaptation, qui coordonne les activités de rééducation incluant les interventions du kinésithérapeute, de l'ergothérapeute, du pédicure, du podologue et de l'orthoprothésiste.

2.11.2.3. L'éducation thérapeutique :

Celle-ci comporte une information sur la nature de la maladie et son potentiel destructeur, le mécanisme d'action et les effets indésirables des médicaments, l'adaptation de la vie sociale et des loisirs, l'aménagement des conditions professionnelles en accord avec le médecin du travail (et éventuellement la reconnaissance du statut de travailleur handicapé), enfin l'information de l'existence d'associations de malades atteints de PR (61).

Bien que de nombreuses études ont confirmé le rôle des allèles HLA-DRB1 et en particulier le rôle de l'épitope partagé dans la pathogenèse de la PR, et de façon plus spécifique dans la progression et la sévérité de la maladie, il apparaît que cette association n'est pas universelle et qu'elle ne se retrouve pas dans certaines populations. Il existe par ailleurs des problèmes méthodologiques dans plusieurs de ces études, qui ne prennent par exemple pas en compte la durée d'évolution comme fonction de la progression radiologique. Nous avons donc entrepris une étude prospective afin de mieux caractériser le rôle des HLA de classe II chez les patients atteints de PR.

1. Objectif principal :

Rechercher une association entre les molécules HLA de classe II et la susceptibilité à la polyarthrite rhumatoïde.

2. Objectifs secondaires :

- Etudier l'association entre les allèles HLA de classe II et la présence des auto-anticorps.
- Rechercher une éventuelle association entre les allèles du Shared épitope et la sévérité de la polyarthrite rhumatoïde.

III. OBJECTIF

1. Matériel :

1.1. Matériel biologique :

1.1.1. Cadre et type d'étude :

Il s'agit d'une étude Cas-Témoin à caractère rétrospectif. Elle s'est déroulée au sein de l'unité d'immunologie de l'UHU Hassiba ben Bouali (CHU de Blida). Les patients ont été recrutés à partir du service de rhumatologie de l'EPH « Ibrahim Tirichine » durant une période de six mois allant de Novembre 2013 jusqu'au mois d'Avril 2014.

1.1.2. Population d'étude :

- Les 130 malades ont été choisis selon les critères suivants :

Les critères d'inclusion :

Tout patient consulté ou hospitalisé dans le service de rhumatologie durant la période d'étude et remplissant au moins 4 des 7 critères pour la PR, tels que définis par l'ACR.

Les critères d'exclusion : sont exclus de l'étude :

- . Les patients, chez lesquelles on a suspecté une polyarthrite rhumatoïde.
- . Les patients ayant moins de 15 ans.
- . Ceux dont le bilan est incomplet.

Les caractéristiques démographiques de notre échantillon de malades :

- Age :

L'âge moyen des patients est de 49 ans avec des extrêmes de 20 à 84 ans. Le pic de fréquence de la maladie se situe entre 40 et 60 ans.

IV. MATERIEL ET METHODES

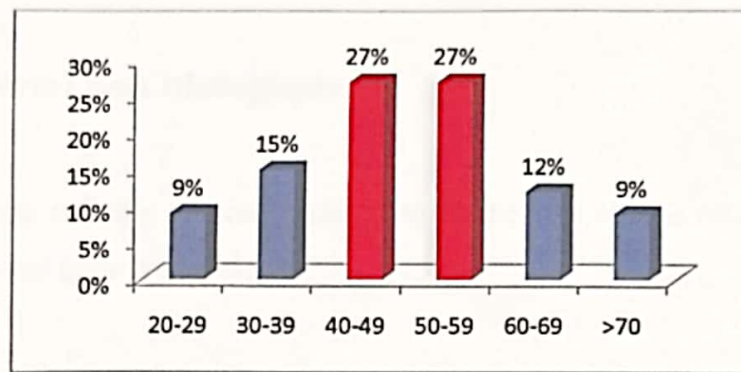


Figure 25 : Répartition des patients atteints de PR selon les tranches d'âge

- Sexe :

Les femmes atteintes de PR représentent 80% des cas avec un sexe ratio de 4/1.

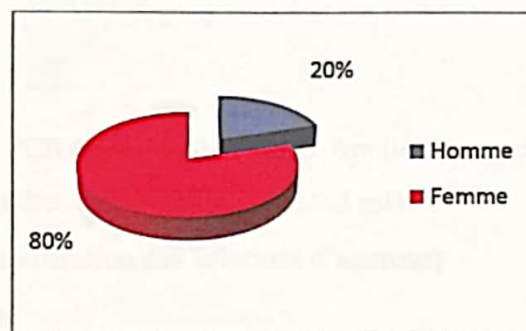


Figure 26 : Répartition des patients atteints de PR selon le sexe

Pour l'étude génétique, parmi les 130 patients de notre échantillon, 40 ont bénéficié d'un typage HLA par la technique PCR/SSP.

- **La population témoin** est recrutée au niveau du centre de transfusion sanguine (CHU Beni messous). Elle est composée de 90 sujets sains et indemnes de toute pathologie rhumatismale inflammatoire, d'âge moyen de 28 ans dont 79 sujets sont des femmes et 11 hommes.

1.2. Matériel non biologique :

- **Fiche de renseignement :** Elle a été établie pour chaque patient au moment de recrutement (voir Annexe1).

- **Appareillage** (voir Annexe 11):

- Laser néphélémètre type BN prospec-marque Dade behring
- Densitomètre pour l'électrophorèse des protéines type process 24 marque Helena
- Microscope à fluorescence type Jenamed 2 marque Carl Zeiss iena
- Lecteur ELISA (spectrophotomètre) type MRXe marque Dinex magellan biosciences
- Vortex
- Thermoblock
- Microcentrifugeuse
- Thermocycleur pour PCR type 9700 marque Applied biosystem (adapté au format des plaques 96 puits, aux tubes à parois minces de 0,2 ml)
- Four à micro-ondes (préparation des solutions d'agarose)
- Chambre de migration
- Générateur pour cuve d'électrophorèse (capacité minimum 150V),
- Appareil photographique ou système capteur d'image type Geldoc marque Bio-Rad.
- Transilluminateur marque Bio-Rad (Lecteur UV pour électrophorèse sur gel).

- **Instrumentations :**

- Tubes citraté, hépariné, sec et ACD.
- Eppendorf
- Column
- Pipettes 20µl, 200µl et 500µl
- Pipettes (telles que Gilson® P-20, Gilson® P200 Pipetman®)
- Embouts de pipettes jetables.

2. Méthodes :

2.1. Bilan inflammatoire : deux marqueurs de l'inflammation sont dosés :

- La vitesse de sédimentation (VS) :

Principe : La détermination de la vitesse de sédimentation des globules rouges repose sur le principe que dans du sang rendu incoagulable, les globules rouges sédimentent spontanément avec une certaine vitesse. Cette vitesse est liée à l'équilibre protéique du plasma. Normalement, elle est lente. Dans un grand nombre de maladie (syndrome inflammatoire), elle est augmentée, en raison de l'augmentation des protéines dans le plasma. La hauteur de la colonne de plasma au dessus de la couche de globules rouges mesurée en mm représente la vitesse de sédimentation.

Protocole : (voir annexe 2)

Valeurs de références :

Hommes : 1 à 10 mm par heure (Europe) 1 à 25 mm par heure pour l'Afrique.

Femmes : 3 à 14 mm par heure (Europe) 3 à 25 mm par heure pour l'Afrique.

- La protéine C-réactive (CRP) :

Principe : Les particules de CRP-Latex sont recouvertes d'anticorps anti-CRP humaine. Le réactif CRP-latex est standardisé pour détecter des taux de CRP dans le sérum aux environs de 6 mg/L, taux considéré comme étant la plus petite concentration ayant une signification clinique. Le mélange du réactif latex avec le sérum contenant la CRP conduit à une réaction antigène-anticorps qui se traduit par une agglutination facilement visible dans les 2 minutes. La présence ou l'absence d'agglutination visible indique la présence ou l'absence de CRP dans le spécimen.

Protocole : (voir annexe 3)

Lecture :

- **Réaction négative :** La suspension reste homogène
- **Réaction positive :** Agglutination nette en 2 minutes.

La sensibilité du test CRP LATEX étant de 6 mg/l. Les sérums donnant une réaction positive ont une concentration supérieure à 6mg/l de CRP.

2.2. Bilan d'auto-immunité :

- **Facteurs rhumatoïdes :** Les méthodes de dosage des facteurs rhumatoïdes utilisées sont :

▪ Réaction au Latex :

Principe :

C'est une technique d'agglutination de particules recouverts d'Ig humaines. De réalisation facile sur lame, elle devra être associée à une autre technique car sujette à des faux positifs.

Protocole : (voir annexe 4).

Lecture et interprétation :

- Réaction positive (agglutination) : présence de facteurs rhumatoïdes dont la concentration peut être estimée grâce à la technique semi-quantitative (valeur supérieur à 8 UI/mL).
- Réaction négative (suspension homogène) : absence de facteurs rhumatoïdes (valeur inférieur à 8 UI/mL) ou présence à un taux inférieur à la limite de détection (environ 8 UI/ml).

▪ Technique de Waaler rose :

Principe :

C'est une technique d'héماغglutination passive utilisant des hématies de mouton recouverts d'Ig de lapin anti-hématies de mouton. Elle nécessite la réalisation d'un témoin avec des hématies non sensibilisées pour éviter les faux positifs dues aux hétéroanticorps. Le titre obtenu par dilution sur lame ou mieux en microplaque est transformé en UI/ml grâce à un étalon OMS.

Protocole : (voir annexe 5)

Lecture et interprétation :

Examiner macroscopiquement la présence ou l'absence d'agglutination visible en évitant immédiatement tout mouvement ou soulever la lame lors de l'observation. La présence d'une agglutination visible indique une concentration en HF égale ou supérieure à 8.

Le titre, dans le procédé semi-quantitatif, est définie comme étant la dilution la plus élevée présentant une hémagglutination positive.

- **Anticorps anti peptides citrulinés** : On a utilisé la technique d'ELISA

Principe :

Ce dosage ELISA permet la réalisation d'un dosage semi-quantitatif ou quantitatif *in vitro* pour la détermination d'auto anticorps humains de classe IgG dirigé contre les peptides cycliques citrulinés (CCP). Le coffret contient des barrettes de microtitration de 8 puits de réactif sécables, coâtés avec des peptides cycliques citrulinés synthétiques. Lors de la première étape de la réaction, les échantillons patients dilués (sérum ou plasma sur EDTA, héparine ou citrate) sont incubé dans les puits. Dans le cas d'échantillon positifs, les anticorps spécifiques de classe IgG (mais aussi IgA et IgM) se fixeront sur les antigènes correspondants. Pour détecter les anticorps fixés, une seconde incubation est réalisée en utilisant un anticorps anti-IgG humaine couplé à une enzyme (conjugué enzymatique). Ce conjugué est capable de générer une réaction colorée.

Protocole : (Voir annexe 6).

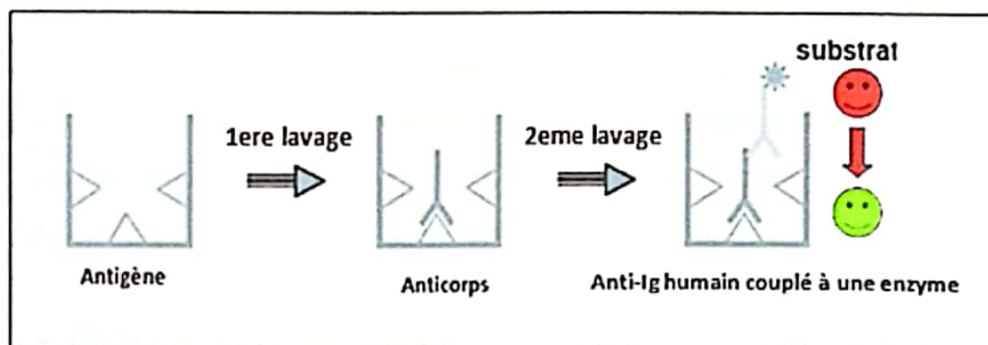


Figure 27 : Principe de la technique d'ELISA

Lecture :

La mesure photométrique de l'intensité de coloration doit être faite à la longueur d'onde 450 nm avec une longueur d'onde de référence comprise entre 630nm et 650nm dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction, avant de mesurer, agiter soigneusement la microplaque pour s'assurer une bonne homogénéisation de la distribution de la solution d'arrêt.

Calculs des résultats :

- Dosage qualitatif/semi quantitatif : Les résultats peuvent être évalués semi-quantitativement par le calcul d'un ratio avec la DO du contrôle ou de l'échantillon patient et la DO du calibrateur. Calculer se ratio selon la formule suivante :

$$\frac{\text{DO du contrôle ou de l'échantillon patient}}{\text{DO du calibrateur 2}} = \text{Ratio}$$

EUROIMMUN recommande d'interpréter les résultats de la manière suivante :

Ratio	Résultats
$\leq 1,0$	Négatif
> 1.0	Positif

- Dosage quantitatif : La courbe standard à partir de laquelle la concentration des anticorps anti-CCP dans les échantillons patients aura être lue, est obtenue en traçant une courbe point à point reliant les valeurs de DO mesurées pour les 3 sérums de calibration (linéaire, axe y) contre les unités de concentrations correspondantes (logarithmique, axe x).

La courbe standard peut être calculée par ordinateur en utilisant un des modes suivants : régression logistique à 4 paramètres, régression logistique à 5 paramètres, spline d'ajustement, courbe log-logit et courbe lim/limit.

- Facteurs anti-nucléaires :

Ils sont dosés par la technique d'**Immunofluorescence indirecte (IFI)** :

Principe :

Ce kit est exclusivement destiné au dosage in vitro des anticorps humains dans le sérum ou le plasma. Le dosage peut être réalisé de manière qualitative ou quantitative.

Les combinaisons de substrats sont incubées avec l'échantillon patient dilué. Si une réaction positive est obtenue, les anticorps spécifiques de classes IgA, IgG et IgM se fixent sur les antigènes. Dans une seconde étape, les anticorps fixés sont révélés avec des anticorps anti-humain couplés à la fluorescéine, les rendant ainsi visibles avec un microscope à fluorescence.

Protocole : (voir annexe 7)

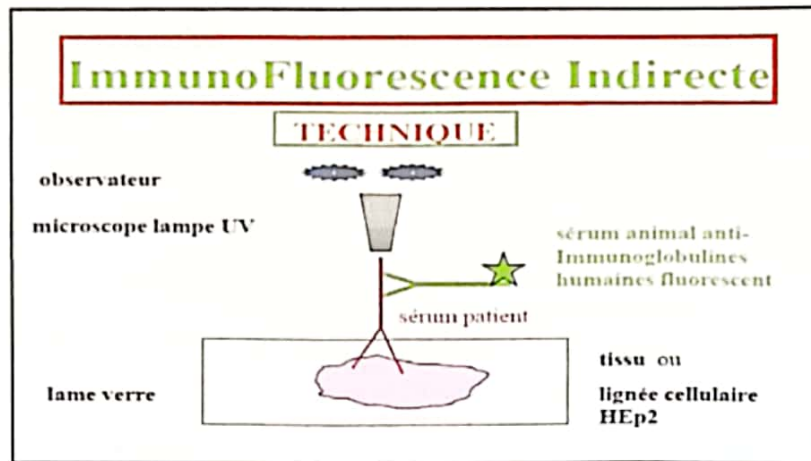


Figure 28 : Principe de la technique d'immunofluorescence indirecte

Evaluation : Interpréter la fluorescence au microscope.

- Evaluation qualitative :

Réactivité ANA	Evaluation
Pas de réaction au 1 :100	Négative, pas d'AC dirigés contre les noyaux cellulaires détectables dans l'échantillon du patient.
Réaction positive au 1 :100	Traces, pour les types IFI aspect homogène, centromère, nucléaire dots, J0-1, aspect typique SSA, SSB, Sm/RNP possible indication dans diverses maladies rhumatismales et autres maladies.
Réaction positive au 1 :320	Positive, indication dans diverses maladies rhumatismales et autre maladies.

- Evaluation quantitative :

Le titre est défini comme le facteur de dilution auquel la fluorescence spécifique est juste identifiable, ceci doit être comparé à la réaction obtenue en utilisant un sérum négatif dilué à une dilution équivalente.

2.3. Typage HLA :

Il nécessite d'abord l'extraction d'ADN qui permet d'isoler l'ADN de cellules. L'ADN ainsi extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire, telles que la PCR. On a utilisé la technique de "buffy coat" qui consiste à mélanger le buffy coat, la couche jaunâtre qui contient les leucocytes ou globules blancs et les plaquettes se trouvant entre les érythrocytes ou globules rouges et le plasma, avec un tampon de lyse qui permet de rompre les membranes des cellules, puis ce mélange est déposé dans une colonne contenant une membrane de silicate qui permet de fixer l'ADN. Seul l'ADN se lie à cette membrane, les protéines et autres impuretés sont éliminées grâce à deux lavages. L'ADN est ensuite récupéré par centrifugation, grâce à un tampon d'élution de pH basique et de faible concentration ionique, dans un tube stérile. **Protocole** (voire Annexe 8).

La deuxième étape est le contrôle de qualité de l'ADN :

On a utilisé la méthode d'électrophorèse sur gel d'agarose à PH égale à 8,3. C'est une méthode simple et efficace pour la séparation, l'identification et la purification des fragments d'ADN. Elle consiste à faire migrer dans un gel soumis à un champ électrique des molécules chargées négativement, leurs distances de migration dépendent principalement de leurs poids moléculaire, de la concentration d'agarose et de l'intensité du courant appliqué.

Protocole : (voir annexe 9)

La troisième étape est la technique de PCR/SSP :

Principe : La technique PCR-SSP est basée sur le principe que l'amplification par la Taq Polymérase est plus effective lorsque l'amorce oligonucléotidique est parfaitement complémentaire de la séquence de l'ADN cible. Les couples d'amorces sont définis pour être spécifiques d'un seul allèle ou d'un groupe d'allèles. Dans des conditions très précises de PCR, le couple d'amorces spécifiques permet l'amplification des séquences cibles (résultat positif), tandis que les couples d'amorces non complémentaires ne donnent pas d'amplification (résultat négatif). Après la PCR, les fragments d'ADN amplifiés sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose et visualisés par coloration avec le bromure d'éthidium sous lumière UV. L'interprétation des résultats PCR-SSP est basée sur la présence ou l'absence de fragment spécifique amplifié.

De nombreux facteurs peuvent affecter l'efficacité de la PCR (erreurs de pipetage, mauvaise qualité de l'ADN, présence d'inhibiteurs, etc.), c'est pourquoi un couple d'amorces de

contrôle interne est intégré dans chaque réaction PCR. Ce couple d'amorces témoin amplifie une région conservée du gène de la β -globine humaine qui est présente dans tous les échantillons d'ADN et permet de vérifier l'intégrité de la réaction PCR. Dans le cas d'une amplification spécifique d'un allèle HLA (bande positive), la bande du contrôle interne peut être faible ou absente en raison des différences de concentration et de température de fusion entre les couples d'amorces spécifiques et celles du contrôle interne.

Les fragments d'ADN amplifiés spécifiques sont plus petits que le contrôle interne, mais sont plus gros que la bande diffuse des amorces non incorporées. Par conséquent, une réaction positive spécifique d'un allèle ou d'un groupe d'allèles HLA est visualisée sur le gel par un fragment ADN amplifié qui sera situé entre la bande de contrôle interne et la bande d'amorce non incorporée.

Protocole : (Voir Annexe 10).

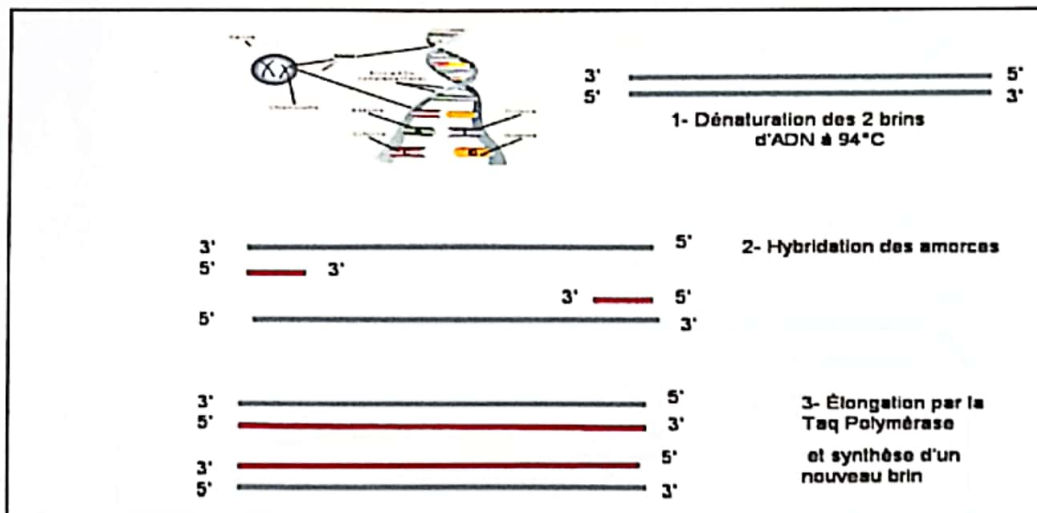


Figure 29 : les principales étapes de la réaction de PCR

Analyse des données :

1) Une bande de contrôle interne (à migration plus lente) doit toujours être présente dans les puits considérés négatifs (à l'exception du puits témoin contrôle négatif) pour vérifier la parfaite amplification. L'absence d'amplification d'un des puits peut annuler les résultats du test.

2) Le gel électrophorétique donnera une bande positive (à migration plus rapide) si le gène HLA spécifique a été amplifié pendant la PCR, indiquant un résultat positif.

3) La bande de contrôle interne peut être faible ou absente dans les puits positifs.

4) Faire correspondre le schéma des puits positifs aux fiches de travail Micro SSP™ pour définir le typage HLA de l'échantillon d'ADN.

5) La présence d'une bande de contrôle interne et/ou d'une bande positive dans le puits de contrôle négatif annule les résultats du test.

6) Analyses facultatives - logiciel HLA Fusion™.

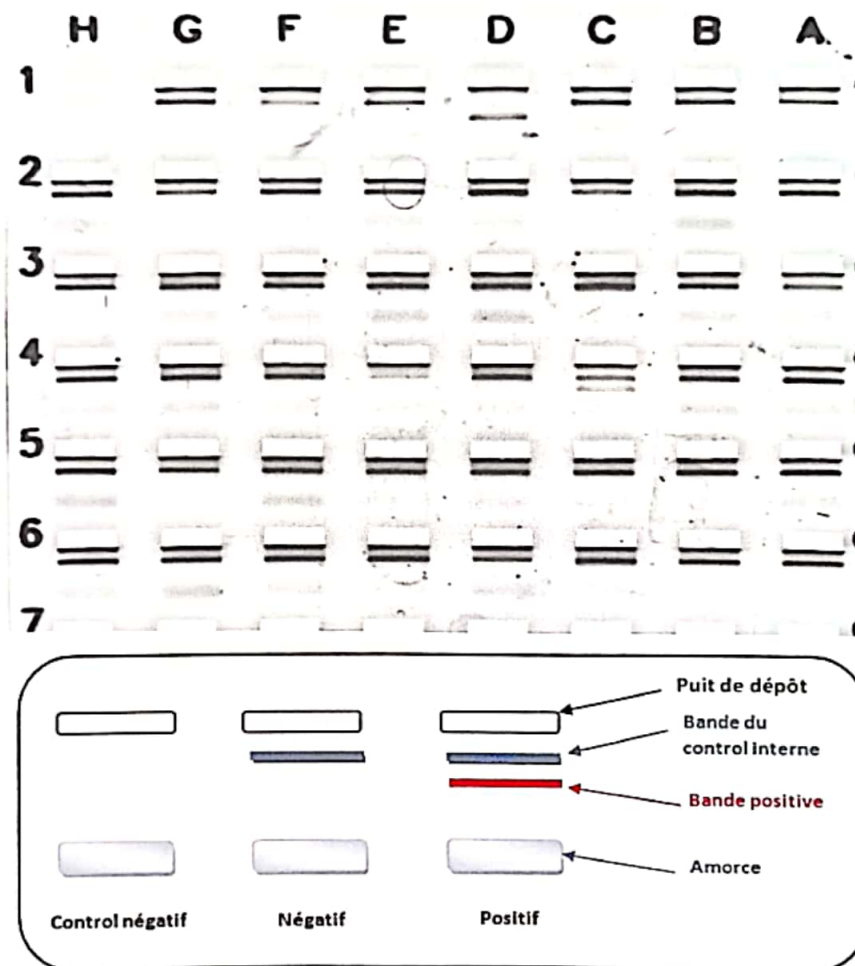


Figure 30 : Lecture du gel d'agarose

Interprétation :

La bande de contrôle interne et la large bande d'amorce non incorporée font office de marqueurs de taille. Toute bande visible entre les deux marqueurs doit être considérée comme une bande spécifique positive.

Les mélanges d'amorces HLA Biotest contiennent des amorces témoins qui amplifient un fragment de l'hormone de croissance de l'homme (human growth hormone, HGH), long de 1069 pb.

Ces amorces présentent une concentration plus faible que les paires d'amorces spécifiques des allèles et servent de contrôle interne de l'amplification.

Cette amplification témoin a généralement toujours lieu, c'est-à-dire aussi bien en présence qu'en l'absence d'un fragment de PCR spécifique d'un allèle ou d'un groupe. La bande témoin est donc visible dans toutes les prises d'essai d'amplification génique.

En présence d'un produit de PCR spécifique d'un groupe HLA, la bande témoin peut être faible ou totalement absente. Ceci ne constitue pas une limite du test, car la bande spécifique retrouvée témoigne dans de tels cas du déroulement correct de l'amplification.

L'interprétation du test repose sur le fait de savoir si une bande d'ADN spécifique est présente dans le gel ou non. La taille des fragments amplifiés d'ADN ne devra pas nécessairement être prise en compte, mais pourra l'être à titre d'aide lors de l'interprétation du test. Pour l'interprétation, le profil des bandes spécifiques est transposé sur les feuilles de travail jointes et le résultat du typage est lu à l'aide des schémas des profils de réactions ou à l'aide de la logiciel Bio-Rad HLA-SSP Typing Software.

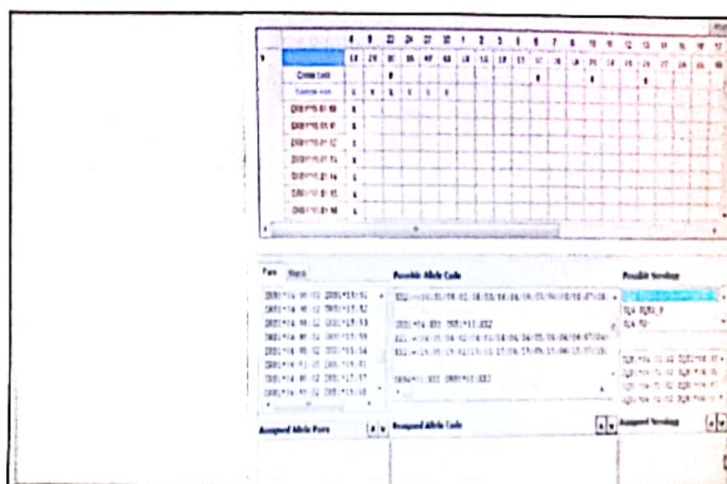


Figure 31 : Interprétation des résultats de la lecture par un logiciel

Comme les études les plus récentes tendent à montrer que les molécules HLA classe II sont impliqués dans la pathogenèse de la PR, nous avons également analysé le polymorphisme de HLA-DRB1 *04 et *01 pour déterminer une possible modulation de la susceptibilité de la maladie

2.4. Analyse statistique :

Afin d'identifier les facteurs de risque pour la survenue d'une polyarthrite rhumatoïde ainsi que les facteurs protecteurs, nous avons comparé un groupe de 40 patients atteints de PR à un groupe de 90 témoins, en analysant les phénotypes HLA qui sont hypothétiquement liés à la susceptibilité de développer une PR.

La force d'association entre le marqueur génétique et le risque de PR a été obtenu par le calcul des **odds ratios**. Par exemple, un odds ratio de 2 signifie que le risque de PR est doublé chez les porteurs des marqueurs concernés, un odds ratio de 1 indique que le risque de PR n'est pas influencé par le marqueur, et un odds ratio de 0,5 signifie que le risque de PR est réduit de moitié.

Les calculs ont été réalisés à l'aide du GraphPad, et du logiciel d'analyse statistique « Compare2 » et (fréquences, valeurs de p , Odds ratio (OR), intervalle de confiance IC à 95%). Les valeurs corrigées de p inférieurs à 0.05 ont été considérées statistiquement significatives.

V. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Bilan inflammatoire :

- Répartition des patients atteints de PR selon les résultats de la VS :

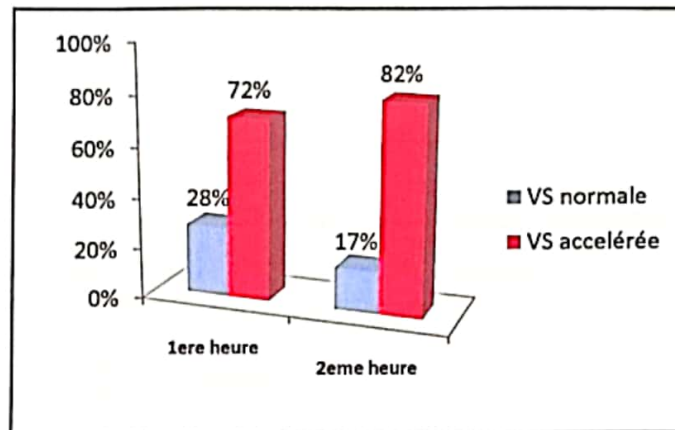


Figure 32: Répartition des patients atteints de PR selon les résultats de la VS

On note que la VS est accélérée chez la majorité des malades de notre échantillon dont 72% pour la 1ere heure et 82% pour la 2eme heure, ce qui peut être expliqué par le fait que nos malades étaient en poussée au moment du prélèvement qui a nécessité une hospitalisation.

- Répartition des patients atteints de PR selon les résultats de la CRP :

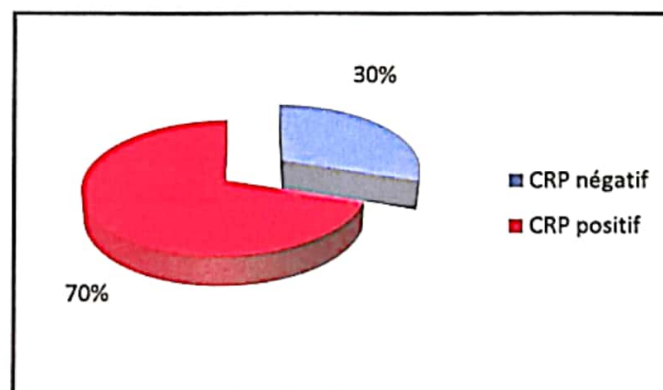


Figure 33 : Répartition des patients atteints de PR selon les résultats de la CRP

On note que la CRP est augmentée chez la majorité des malades de notre échantillon (70%), ce qui peut être expliqué par le fait que nos malades ont été en poussée au moment du prélèvement qui a nécessité une hospitalisation.

Les poussées de la PR sont prédominées par l'exacerbation du syndrome inflammatoire, qui est à l'origine de modifications biologiques (accélération de la VS, augmentation de la CRP avec installation d'une anémie de type inflammatoire normocytaire normochrome (56% ayant un taux d'hémoglobine $<12\text{g/l}$) ainsi que des manifestations cliniques et radiologiques.

2. Bilan d'auto-immunité :

- Répartition des patients et des témoins selon les résultats des facteurs rhumatoïdes :

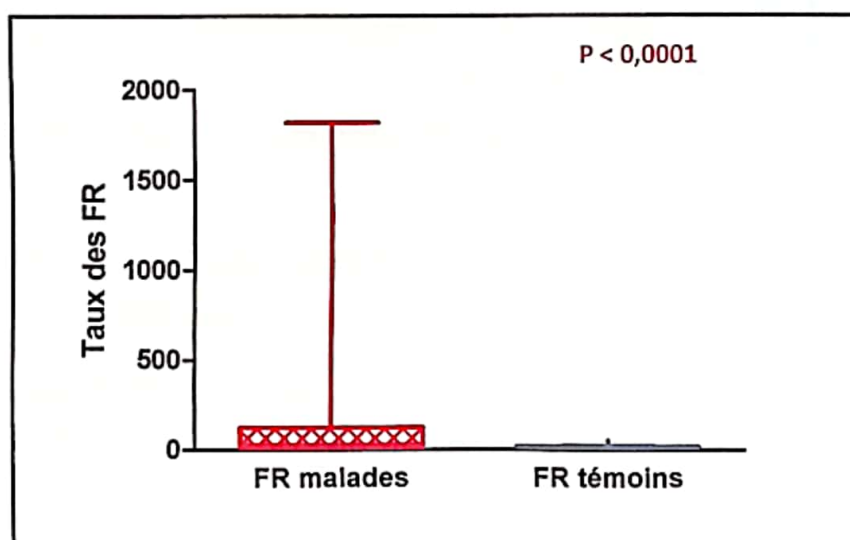


Figure 34 : Répartition des patients et témoins selon les résultats des FR

Il y a une différence significative entre les taux des facteurs rhumatoïdes chez nos patients en comparaison avec la population témoin ($151,2 \pm 26,89$ vs $1,233 \pm 32,08$; $p < 0,0001$).

- Répartition des patients et témoins selon les résultats des ACCPs

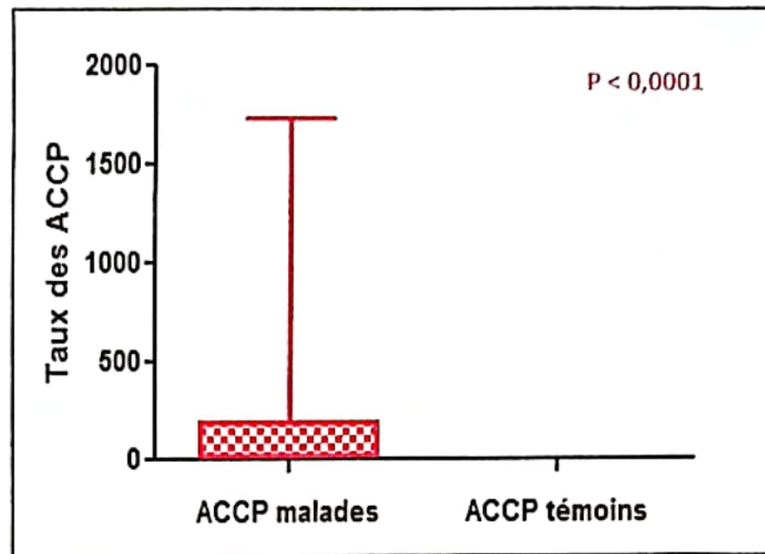


Figure 35 : Répartition des patients et témoins selon les résultats des ACCP

Il y a une différence significative entre les taux des ACCP chez nos patients atteints de PR comparés à la population témoin ($171,9 \pm 26,89$ vs $1,233 \pm 0,067$; $p < 0,0001$).

Il est décrit dans la littérature d'après plusieurs études effectuées par plusieurs équipes de recherche que l'anticorps anti-peptide citrulinées (CCP3) était présent dans la majorité des sérums de patients atteints de PR avec une spécificité allant de 89 à 98% (145 ;189 ;106) et une sensibilité allant de 41 à 75% (145 ;59).

3. Typage HLA :

3.1. Les allèles HLA-DRB1 et la susceptibilité à la PR :

Les résultats du typage HLA-DR générique déterminés chez 40 patients et 90 sujets sains, montrent :

- Répartition phénotypique selon les résultats du typage du locus HLA DR :

HLA-DRB1	Patients		Témoins		P	OR	IC à 95%
	N = 40	FP (%)	N = 90	FP (%)			
HLA-DRB1*01	09	22	06	06	0,02	3,48	1,29 - 8,85
HLA-DRB1*03	11	27	29	32	0,11	--	
HLA-DRB1*04	13	32	13	14	0,03	2,85	1,06 - 7,56
HLA-DRB1*07	06	15	27	26	0,23	--	
HLA-DRB1*08	01	02	08	07	0,44	--	
HLA-DRB1*09	01	02	04	04	1	--	
HLA-DRB1*10	02	05	06	06	1	--	
HLA-DRB1*11	07	17	32	31	0,16	--	
HLA-DRB1*13	06	15	21	20	0,63	--	
HLA-DRB1*14	01	02	05	05	0,87	--	
HLA-DRB1*15	09	23	20	19	0,83	--	
HLA-DRB1*16	01	02	07	06	0,55	--	

Tableau 6 : Répartition des fréquences phénotypiques (FP) chez les patients et témoins

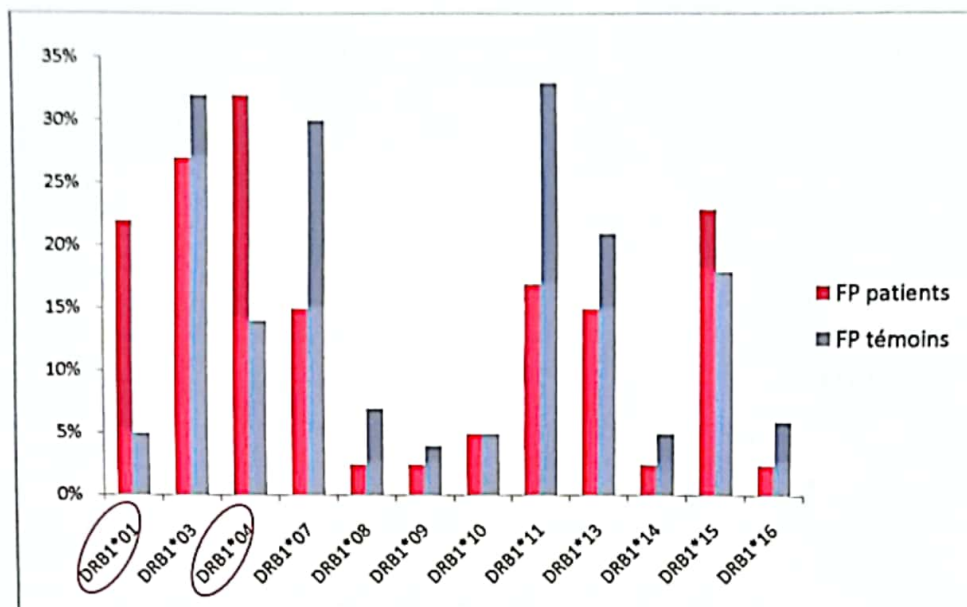


Figure 36 : Répartition des fréquences phénotypiques chez patients et témoins

On note une différence significative des fréquences phénotypique des allèles HLA-DRB1*01 et HLA-DRB1*04 entre nos patients et les témoins avec des fréquences respectives (22% vs 06%, $P=0,02$, $OR=3,48$; $IC=1,29 - 8,85$) et (32% vs 14%, $p=0,03$, $OR=2,85$; $IC=1,06 - 7,56$) (Tableau 6).

Pour les autres allèles HLA-DRB1, il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes.

- Répartition allélique selon les résultats du typage du locus HLA-DR :

HLA-DRB1	Patients		Témoins		P	OR	IC à 95%
	2N = 80	FA (%)	2N = 180	FA (%)			
HLA-DRB1*01	10	12,5	06	03	0,01	4,14	1,29 – 14,33
HLA-DRB1*03	12	15	30	16	0,87	--	
HLA-DRB1*04	16	20	13	07	0,005	3,21	1,35 – 7,67
HLA-DRB1*07	08	10	29	14	0,55	--	
HLA-DRB1*08	01	01	08	04	0,46	--	
HLA-DRB1*09	01	01	06	03	0,71	--	
HLA-DRB1*10	02	2,5	06	03	1	--	
HLA-DRB1*11	10	12	32	15	0,72	--	
HLA-DRB1*12	00	--	01	0,4	--	--	
HLA-DRB1*13	06	7	21	10	0,69	--	
HLA-DRB1*14	01	01	05	02	0,88	--	
HLA-DRB1*15	10	12	24	11	1	--	
HLA-DRB1*16	01	01	07	03	0,58	--	

Tableau 7 : Répartition des fréquences alléliques chez patients et témoins

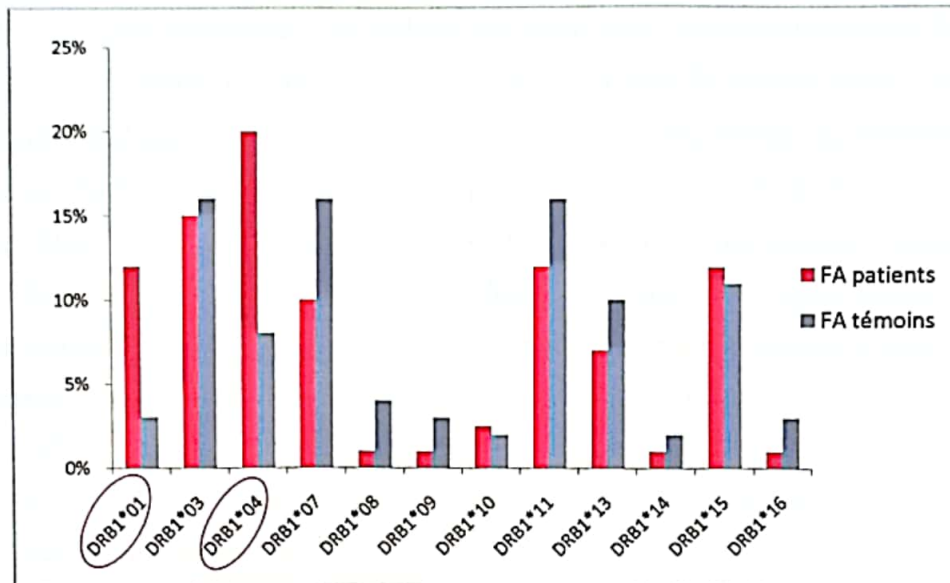


Figure 37 : Fréquences des allèles HLA-DRB1 chez patients et témoi

L'analyse des typages HLA-DRB1 a révélé une différence statistiquement significative des fréquences des allèles HLA-DRB1*01 et HLA-DRB1*04 entre les patients et les témoins avec des fréquences respectives (12% vs 03%, $P=0,01$, OR=4,14 ; IC= 1,29 – 14,33) et (20% vs 07%, $p=0,005$, OR=3,22 ; IC= 1,35 – 7,67).

Pour les autres allèles HLA-DRB1, il n'ya pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes.

Notre étude confirme l'association de la PR avec l'allèle HLA-DRB1*01 et HLA-DR*04 dont les fréquences phénotypiques respectives étaient significativement augmentées par rapport au groupe témoins (22% vs 06% et 32% vs 14%). Ce qui corrobore avec les résultats de la littérature.

L'association entre PR et différents allèles HLA-DRB1 a été largement rapportée par plusieurs auteurs dans diverses populations. Notamment avec les allèles HLA-DRB1*01,*04,*10 et *14.

HLA-DRB1*04 a été retrouvé associé à la PR chez une population tunisienne selon une étude réalisée par Ayed et al en 2002, qui montrait des fréquences phénotypiques de l'ordre de 50% chez les patients, et de 25% chez les témoins. Ce résultat pourrait être expliqué par la taille élevée de l'échantillon (90 patients atteints de PR et 100 sujets témoins)(16).

Une autre étude marocaine a été réalisée par Atouf et al, parue sur la revue « *Joint Bone Spine* » en 2008, ayant pris comme échantillon 49 patients Marocains atteints d'une PR précoce (moins d'une année d'évolution), recrutés au sein du service de rhumatologie de l'hôpital universitaire Ibn Sina à Rabat. Ces patients ont été comparés à 183 contrôles sains. Le typage HLA-DR générique des patients vs témoins, a montré une association avec l'allèle HLA-DRB1*04 chez les patients séropositifs dont les fréquences alléliques étaient de 30.9% chez les patients et 17.2% chez les témoins. Ces résultats sont supérieurs à ceux retrouvés dans notre population d'étude (20% patients vs 7% témoins) (11).

L'allèle HLA-DRB1*01 est également associé à la PR chez les Caucasiens d'Europe et d'Amérique du Nord (22 ;192;17).

Les autres allèles de susceptibilité connus (HLA-DRB1*10 et *14) n'étaient pas associés avec la susceptibilité à la PR chez nos patients.

3.2. Epitope partagé et la susceptibilité à la PR :

Génotypes	Patients N (%)	Témoins N(%)	P	OR	IC à 95%
SE+/SE+	6(15%)	1(1%)	0,005	15,71	1,76 – 730,23
SE+/X	14(35%)	16(20%)	0,11	--	
X/X	20(50%)	74(80%)	--	--	

Tableau 8 : Répartition des allèles HLA-DRB1*SE+ chez les patients et les témoins

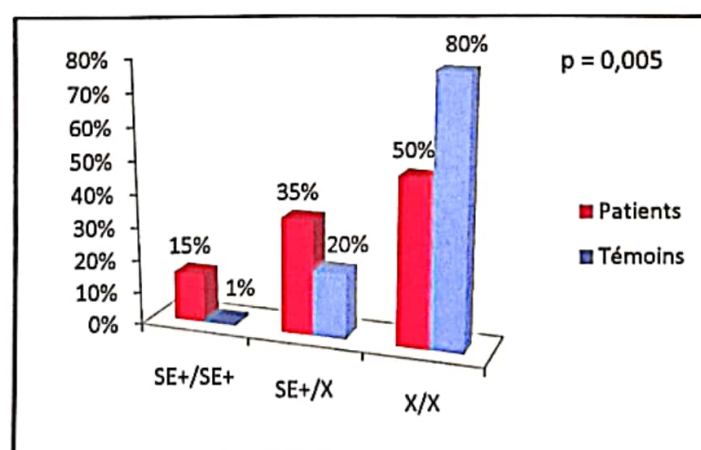


Figure 38 : Répartition des allèles de l'EP chez patients et témoins

Ces résultats montrent une augmentation significative des allèles HLA-DRB1 contenant une double dose de l'épitope partagé (SE+/SE+) chez nos patients atteints de PR par rapport au groupe témoins (15% vs 1% ; $p=0.005$; OR= 15,71 ; IC = 1,76 – 730,23).

L'analyse des différents allèles HLA-DRB1 dans notre étude des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde confirme le rôle de l'épitope partagé comme marqueur de susceptibilité. En effet, la fréquence des allèles contenant l'épitope partagé est nettement augmentée dans le groupe PR. Cette augmentation est encore plus significative pour la fréquence de l'épitope partagé à double dose (15% patients vs 1% témoins ; $p=0,005$: OR= 15,75). Cette augmentation résulte avant tout des fréquences plus élevées des allèles HLA-B1*04 et HLA-DRB1*01 chez nos patients atteints de PR par rapport au groupe témoins. Ce qui corrobore avec les données de la littérature.

La susceptibilité de l'épitope partagé à la PR a été largement rapportée dans les populations caucasoïdes (22 ; 66 ; 76 ; 97). La fréquence de l'EP semble être plus importante (deux tiers environ) chez les patients atteints de PR d'Europe du Nord, du Sud, chez les Caucasoïdes d'Amérique du Nord que dans les pays méditerranéens (190 ; 76 ; 127 ; 187 ; 25).

Une étude réalisée sur une population d'Amérique latine indique une association significative entre la PR et le gène HLA-DRB1, les patients portants l'épitope partagé ont 3,5 fois plus de risque de développer une PR que les non-porteurs(8).

Une autre étude faite sur une population tunisienne montre l'effet de l'épitope partagé sur la susceptibilité à la PR dont la fréquence est de 41,1% (16).

3.3. Epitope partagé et la sévérité de la polyarthrite rhumatoïde :

Génotypes	DAS28> 5	DAS28 <5	P	OR	IC à 95%
SE+	15(37%)	5(12%)	0,02	4,2	1,22 – 16,46
SE-	09(22%)	11(27%)	0,43	--	

Tableau 9 : Répartition des allèles de l'épitope partagé selon le DAS28

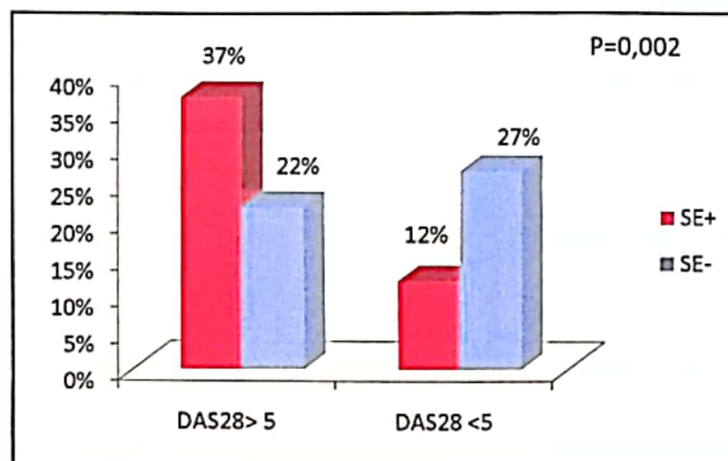


Figure 39 : Répartition des allèles de l'EP selon les valeurs de DAS28

On note que les patients porteurs de l'épitope partagé présentent un degré de sévérité plus élevé (37% vs 12% ; $p=0,02$; OR=4,2 ; IC=1,22 – 16,46).

Dans notre étude, on a trouvé une association entre les allèles de l'EP (allèles HLA-DRB1*01 et HLA-DRB1*04) et la sévérité de la PR ($p=0,002$; OR= 4,2).

Plusieurs travaux ont objectivé une relation entre la sévérité clinique et structurale de la PR et la présence des allèles HLA-DRB1*04 et HLA-DRB1*01 ou d'un autre allèle codant l'épitope partagé avec un effet-dose.

Pour certains auteurs, les allèles HLA-DRB1 sont davantage associés à la sévérité et la progression de la PR, plutôt qu'à sa susceptibilité (184; 120).

Plusieurs études, mais pas toutes, ont montré une corrélation entre les allèles HLA-DRB1 *04 et une forme de PR plus sévère et érosive; d'autres ont montré une incidence plus élevée de HLA-DRB1 *01 chez les patients avec une PR moins sévère ou séronégative (117). Selon certains travaux, tous les allèles portant l'épitope partagé n'induisent donc pas le même risque, la combinaison d'allèles DRB1 *04/*04 étant associée au plus grand risque de développer une maladie sévère. Certaines études, mais pas toujours confirmées, ont montré qu'en cas d'« homozygotie » pour l'épitope partagé (double présence), on observe une maladie plus sévère, caractérisée par une incidence plus élevée de manifestations extra-articulaires et d'érosions, impliquant un effet « double-dose » (184; 176).

Le risque maximum d'avoir une PR sévère est observé chez les homozygotes et hétérozygotes (DR4 et DR1) des populations caucasiennes, de l'Europe du Nord et du Sud (76 ;42 ; 110). Par contre cette association n'est pas retrouvée chez les patients d'origine grecque(25).

Cette association avec la sévérité de la maladie fait toujours l'objet d'un grand débat, n'étant pas reconnue par tous.

3.4. Epitope partagé et la production des auto-anticorps (ACCP et FR) :

- Association entre Epitope partagé et la production des facteurs rhumatoïdes :

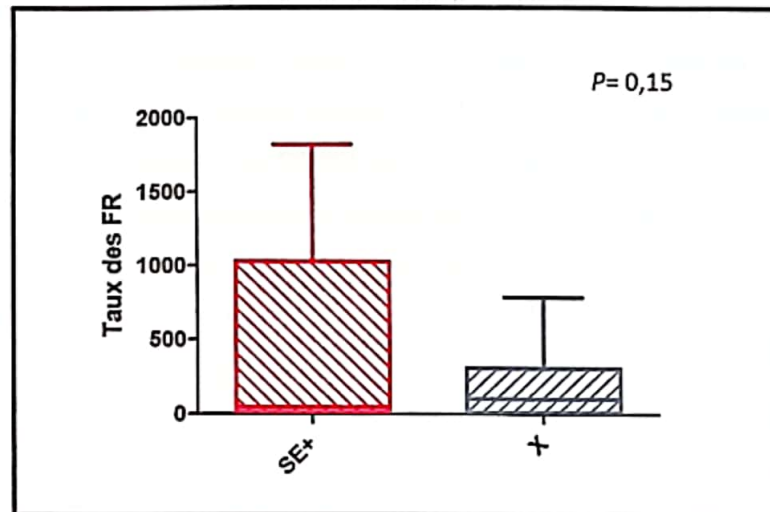


Figure 40 : Répartition des allèles de l'EP selon la présence des FR

Il n'y a pas de différence significative dans les taux des FR entre les patients porteurs (SE+) de l'épitope partagé et les non-porteurs ($391,6 \pm 131,2$ vs $188,2 \pm 52,05$; $p=0,15$).

- Association entre l'épitope partagé et la production des ACCP :

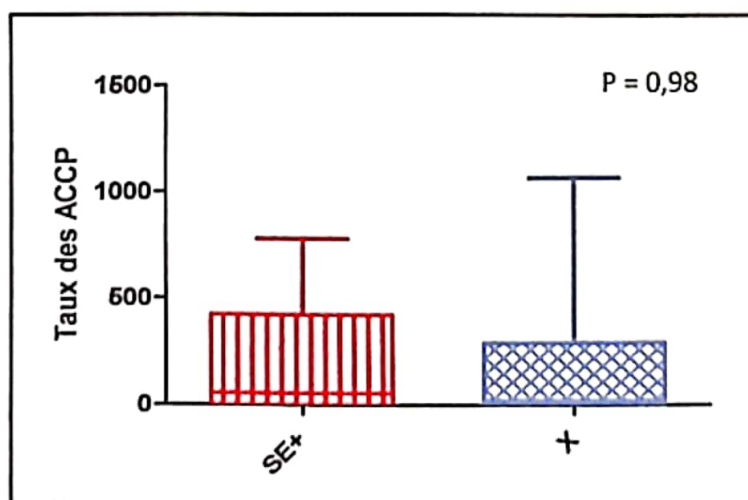


Figure 41 : Répartition des allèles de l'EP selon la présence des ACCP

Il n'y a pas de différence significative entre la présence de l'épitope partagé et la production des ACCP ($195,6 \pm 65,45$ vs $198,1 \pm 71,08$; $p = 0,98$).

La force d'association entre les spécificités HLA-DRB1 de susceptibilité et la production du FR varie selon les études (Tableau 10).

Dans notre étude, on ne retrouve pas une association entre les allèles contenant l'épitope partagé aux PR séropositives (FR et ACCP). Ce résultat pourrait être expliqué par la taille réduite de notre échantillon. Contrairement à ce qui a été décrit en Europe et au Maroc, une étude de population européenne a montré une forte association entre les allèles de l'épitope partagé notamment entre les allèles HLA-DRB1*01,*04 et *10 et la production des ACCPs ($p=0,004$ et $OR=1,35$; $p<0,001$ et $OR=3,76$; $p<0,001$ et $OR=2,37$)⁽¹¹²⁾.

Une étude de population marocaine a montré une association avec l'allèle HLA-DRB1*04 chez les patients séropositifs (FR+) dont la fréquence était largement significative ($p=0,004$ $OR=3,07$; $IC\ 95\%=1,4 - 6,5$)⁽¹¹⁾.

Population	Patients PR	Association SE/FR	Gènes
Syrienne ⁽⁹⁷⁾	156	positive	HLA DRB1*01, *04
Marocaine ⁽¹¹⁾	49	positive	HLA DRB1*04
Hongroise ⁽¹⁷⁴⁾	53	positive	HLA DRB1*04
Française ⁽⁷⁹⁾	160	négative	-

Tableau 10: Association des allèles de l'EP et la production des FR dans différents études

VI. CONCLUSION

Ce travail a été mené dans le but de participer à la compréhension des mécanismes complexes intervenant dans la pathogénie de la polyarthrite rhumatoïde, et à une meilleure appréciation de la part respective des différents facteurs impliqués. Ces facteurs qui, par leurs natures génétiques, ont l'avantage d'être déterminables immédiatement au début de la maladie, pourraient donc jouer un rôle important dans le dépistage précoce des sujets prédisposés à la PR et/ou à leurs complications métaboliques et dégénératives. Ceci permettrait, dans un objectif de médecine préventive de prendre en compte une variabilité génétique (identification de sujets à risque) dans le développement et l'élaboration de stratégies diagnostiques et thérapeutiques.

Notre étude montre une association entre les allèles HLA-DRB1 dont ceux codant pour l'épitope partagé avec la susceptibilité et la sévérité de la polyarthrite rhumatoïde.

Les allèles HLA-DRB1*01 et HLA-DRB1*04 sont les principaux facteurs de prédisposition à la PR. Par ailleurs, l'homozygotie de l'épitope partagé est quinze fois plus fréquent chez nos patients que chez les sujets sains, donc l'épitope partagé joue un rôle important dans la susceptibilité à la PR chez les patients relevant de notre étude.

Ces résultats devront toutefois être confirmés par des études longitudinales, prospectives et/ou par une étude cas-témoin en améliorant la taille de l'échantillon d'étude.

VII. BIBLIOGRAPHIE

1. Hershkovitz E. The genetic basis of rheumatoid arthritis. *Ann NY Acad Sci* 1974; 249: 1-15.
2. Hershkovitz E, Hershkovitz R, Hershkovitz P, Hershkovitz M. Rheumatoid arthritis: a genetic disease. *Ann NY Acad Sci* 1974; 249: 16-25.
3. Hershkovitz E, Hershkovitz R, Hershkovitz P, Hershkovitz M. Rheumatoid arthritis: a genetic disease. *Ann NY Acad Sci* 1974; 249: 26-35.
4. Hershkovitz E, Hershkovitz R, Hershkovitz P, Hershkovitz M. Rheumatoid arthritis: a genetic disease. *Ann NY Acad Sci* 1974; 249: 36-45.
5. Hershkovitz E, Hershkovitz R, Hershkovitz P, Hershkovitz M. Rheumatoid arthritis: a genetic disease. *Ann NY Acad Sci* 1974; 249: 46-55.
6. Hershkovitz E, Hershkovitz R, Hershkovitz P, Hershkovitz M. Rheumatoid arthritis: a genetic disease. *Ann NY Acad Sci* 1974; 249: 56-65.
7. Hershkovitz E, Hershkovitz R, Hershkovitz P, Hershkovitz M. Rheumatoid arthritis: a genetic disease. *Ann NY Acad Sci* 1974; 249: 66-75.
8. Hershkovitz E, Hershkovitz R, Hershkovitz P, Hershkovitz M. Rheumatoid arthritis: a genetic disease. *Ann NY Acad Sci* 1974; 249: 76-85.
9. Hershkovitz E, Hershkovitz R, Hershkovitz P, Hershkovitz M. Rheumatoid arthritis: a genetic disease. *Ann NY Acad Sci* 1974; 249: 86-95.
10. Hershkovitz E, Hershkovitz R, Hershkovitz P, Hershkovitz M. Rheumatoid arthritis: a genetic disease. *Ann NY Acad Sci* 1974; 249: 96-105.
11. Hershkovitz E, Hershkovitz R, Hershkovitz P, Hershkovitz M. Rheumatoid arthritis: a genetic disease. *Ann NY Acad Sci* 1974; 249: 106-115.
12. Hershkovitz E, Hershkovitz R, Hershkovitz P, Hershkovitz M. Rheumatoid arthritis: a genetic disease. *Ann NY Acad Sci* 1974; 249: 116-125.
13. Hershkovitz E, Hershkovitz R, Hershkovitz P, Hershkovitz M. Rheumatoid arthritis: a genetic disease. *Ann NY Acad Sci* 1974; 249: 126-135.
14. Hershkovitz E, Hershkovitz R, Hershkovitz P, Hershkovitz M. Rheumatoid arthritis: a genetic disease. *Ann NY Acad Sci* 1974; 249: 136-145.
15. Hershkovitz E, Hershkovitz R, Hershkovitz P, Hershkovitz M. Rheumatoid arthritis: a genetic disease. *Ann NY Acad Sci* 1974; 249: 146-155.
16. Hershkovitz E, Hershkovitz R, Hershkovitz P, Hershkovitz M. Rheumatoid arthritis: a genetic disease. *Ann NY Acad Sci* 1974; 249: 156-165.
17. Hershkovitz E, Hershkovitz R, Hershkovitz P, Hershkovitz M. Rheumatoid arthritis: a genetic disease. *Ann NY Acad Sci* 1974; 249: 166-175.
18. Hershkovitz E, Hershkovitz R, Hershkovitz P, Hershkovitz M. Rheumatoid arthritis: a genetic disease. *Ann NY Acad Sci* 1974; 249: 176-185.
19. Hershkovitz E, Hershkovitz R, Hershkovitz P, Hershkovitz M. Rheumatoid arthritis: a genetic disease. *Ann NY Acad Sci* 1974; 249: 186-195.
20. Hershkovitz E, Hershkovitz R, Hershkovitz P, Hershkovitz M. Rheumatoid arthritis: a genetic disease. *Ann NY Acad Sci* 1974; 249: 196-205.

Les articles bibliographiques :

1. Alarcon GS. Epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 1995 ; 21 (3) : 589-604.
2. Alarcon GS, Koopman WJ, Acton RT, Barger BO. Seronegative rheumatoid arthritis. A distinct immunogenetic disease? *Arthritis Rheum* 1982;25:502-7.
3. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ et coll. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010; 62 (9) : 2569-81. Reproduction autorisée.
4. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, 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.
5. AL-SWAILEM R, Al-Rayes H, Sobki S, Arfin M, Tariq M. HLA-DRB1 association in Saudi rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int* 2006;26 (11):1019-2.
6. Alves C, Luime JJ, van Zeben D, et al. Diagnostic performance of the ACR/EULAR 2010 criteria for rheumatoid arthritis and two diagnostic algorithms in an early arthritis clinic (REACH). *Ann Rheum Dis* 2011;70:1645-7.
7. American College of rheumatology subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. 2002 update. *Arthritis Rheum* 2002;46:328-46.
8. Angélica M. Delgado-Vega, Juan-Manuel Anaya. Meta-analysis of HLA-DRB1 polymorphism in Latin American patients with rheumatoid arthritis. Unidad de Biología Celular e Inmunogenética, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia School of Medicine, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia 2006.
9. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association used criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.
10. ARNETT FC, edworthy SM, Block DA et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-324.
11. ATOUF O, Benbouazza K, Bzami F et al. HLA polymorphism and early rheumatoid arthritis in the Moroccan population. *Joint Bone Spine* 2008;75:824-30.
12. Atouf O, Benbouazza K, Brick C, Bzami F, Bennani N, Amine B, et al. HLA polymorphism and early rheumatoid arthritis in the Moroccan population. *Joint Bone Spine* 2008;75:554-8.
13. Auger I, Roudier J. HLA-DR and the development of rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 1997;26:123-8.
14. Avouac J, Uzan G, Kahan A, Boileau C, Allanore Y. Endothelial progenitor cells and rheumatic disorders. *Joint Bone Spine* 2008;75:131-7.
15. Avova j et al: diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. A systematic literature review. *Ann Rhum Dis* 65:845-851 (2006)
16. Ayed.Kh, T.Dhaouadi, S.Jendoubi-Ayed, M.Makhlouf, I.Sfar, Y.Gorgi, Laboratoire d'Immunologie. R.Zouari, L.Abdelmoula. Service de rhumatologie. EPS. Charles Nicolle. In 2002 Tunis.
17. Balsa A, Cabezon A, Ororco G, Cobo T, et al. Influence of HLA DRB1 alleles in the susceptibility of rheumatoid arthritis and the regulation of antibodies against citrullinated proteins and rheumatoid Factor. *Arthritis Reseach & Therapy* 2010, 12: R62.
18. Banerjee A, Gerondakis S. Coordinating TLR activated signaling pathways in cells of the immune system. *Immunol Cell Biol* 2007;85:420-4.

19. Bang S.Y., K.H. Lee, S.K. Cho, H.S. Lee, K.W. Lee, S.C. Bae. Smoking increases rheumatoid arthritis susceptibility in individuals carrying the HLA-DRB1 shared epitope, regardless of rheumatoid factor or anti-cyclic citrullinated peptide antibody status. *Arthritis Rheum.* 2010, 62, (2), p.369-377.
20. Bardin T, Legrand L, Naveau B, Marcelli-Barge A, Debeyre N, Lathrop GM, et al. HLA antigens and seronegative rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1985;44:50-3.
21. Begovich, A.B., Carlton, V.E., Honigberg, L.A., Schrodi, S.J., Chokkalingam, A.P., Alexander, H.C., Ardlie, K.G., Huang, Q., Smith, A.M., Spoecker, J.M. & others (2004) A missense singlenucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *The American Journal of Human Genetics*, 75, 330-337.
22. Benazet JF, Reviron D, Mercier P, Roux H, Roudier J (1995) HLA-DRB1 alleles associated with rheumatoid arthritis in southern France. Absence of extraarticular disease despite expression of the shared epitope. *J Rheumatol* 22: 607-610.
23. Boissier MC, Assier E, Biton J, Denys A, Falgarone G, Bessis N. Les cellules T régulatrices (Treg) dans la polyarthrite rhumatoïde. *Rev Rhum* 2009;76:10-5.
24. Boissier MC, Assier E, Falgarone G, Bessis N. Du déséquilibre de la balance Th1-Th2 à celui de la balance Th17-Treg : évolution du paradigme de la polyarthrite rhumatoïde. *Rev Rhum* 2008;75:555-7.
25. BOKI KA, Drosos AA, Tzioufas AG et al. Examination of HLA-DR4 as a severity marker for rheumatoid arthritis in Greek patients. *Ann Rheum Dis* 1993;52:517-519.
26. BOSE S, Stratford FL, Broadfoot KI, et al. Phosphorylation of 20S protéasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation oh protéasome complexes by gamma-interferon. *Biochem J* 2004; 378:177-184.
27. Braun J., P. Kästner, P. Flaxenberg, J. Währisch, P. Hanke, W. Demary et al. Comparison of the clinical efficacy and safety of subcutaneous versus oral administration of methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis: results of a six months, multicenter, randomized, double blind, controlled, phase IV trial. *Arthritis Rheum*, 58 (2008), pp. 73-81.
28. Brennan P, Silman A. Breast-feeding and the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994;37:808-813.
29. Brentano F, Kyburz D, Schorr O, Gay R, Gay S. The role of Tolllike receptor signalling in the pathogenesis of arthritis. *Cell Immunol* 2005;233:90-6.
30. Britsemmer K, Ursum J, Gerritsen M, et al. Validation of the 2010 ACR/EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis: slight improvement over the 1987 ACR criteria. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1468-70.
31. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern U, Urban RJ, Strominger JL et al. three-dimensional structure of the Human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993; 364: 33-9.
32. Bugatti S, Codullo V, Caporali R, Montecucco C. B cells in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2007;7:137-42.
33. Burr, M.L., Naseem, H., Hinks, A., Eyre, S., Gibbons, L.J., Bowes, J., Wilson, A.G., Maxwell, J., Morgan, A.W., Emery, P., Steer, S., Hocking, L., Reid, D.M., Wordsworth, P., Harrison, P., Thomson, W., Worthington, J. & Barton, A. (2010) PADI4 genotype is not associated with rheumatoid arthritis in a large UK Caucasian population. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69, 666-670.
34. Cader MZ, Filer A, Hazlehurst J, et al. Performance of the 2010 ACR/EULAR criteria for rheumatoid arthritis: comparison with 1987 ACR criteria in a very early synovitis cohort. *Ann Rheum Dis* 2011;70:949-55.
35. Carli C, Landais, M. Aletti, J.-M. Cournac, E. Poisnel, J.-F. Traitement actuel de la polyarthrite rhumatoïde Current treatment of rheumatoid arthritis Pdf. Paris 2009.
36. CARTHY D, Ollier W, Papasteriades C, Pappas H, and Thomson W: A shared HLA-DRB1 sequence confers RA susceptibility in Greeks. *Eur J Immunogenet* 1993; 20:391-398.

37. CESBRON GUATIER A, Gagne K, Retière C, Devys A, Bignon JD. Système HLA EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Hématologie, 13-000-M-53, 2007.
38. Champy V, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases: rôle dans les maladies rhumatismales. *Rev Rhum* 2007;74:636-43.
39. CHAN SH, Lin YN, Wee GB, Koh WH, Boey ML. HLA class 2 genes in Singaporean Chinese rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1994 ;33 : 713-717.
40. Choo SY. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J* 2007; 48:11—23.
41. COLOMBANI J. HLA. Fonctions immunitaires et applications médicales. Ed. John Libbey Eurotext. 1993 : 22-30.
42. COMBE B, Dougados M, Goupille P, Cantagrel A, Eliaou JF, Sibilia J et al. Prognostic factors for radiographic damage in early rheumatoid arthritis : a multiparameter prospective study. *Arthritis rheum* 2001;44(8):1736-43
43. Combe B, Eliaou JF, Meyer O, Clot J, Sany J. Prognostic factors in rheumatoid arthritis. Comparative study of two subsets of patients according to severity of articular damage. *Br J Rheumatol* 1995;34:529-534.
44. Combe B. Polyarthrite rhumatoïde: clinique et diagnostic. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Appareil locomoteur, 14-220-A10, 2007.
45. Combe B. Progrès dans la polyarthrite rhumatoïde. *Revue du Rhumatisme*. 2007, 74, (3), p.14-21.
46. Combe B. The new classification criteria for rheumatoid arthritis and their impact on therapeutic decisions. *Joint Bone Spine* 2011;78:539-41.
47. Costenbader K.H. , D. Feskanich, L.A. Mandl, E.W. Karlson. Smoking intensity, duration, and cessation, and the risk of rheumatoid arthritis in women. *Am J Med*. 2006, 119, (6), p.503.e1-9.
48. CRESSWELL P. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 1996; 84:505-7.
49. Cutolo M, Seriolo B, Villaggio B, Pizzorni C, Cravotto C, Sulli A. Androgens and estrogens modulate the immune and inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;966:131-142.
50. Dayer J.M. , M. Cutolo Is there a rationale to using leflunomide in early rheumatoid arthritis? *Clin Exp Rheumatol*, 23 (2005), pp. 404-412.
51. De Jong Z. , M. Munneke, A.H. Zwinderman, H.M. Kroon, K.H. Roday, W.F. Lems et al. Long-term high intensity exercise and damage of small joints in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 63 (2004), pp. 1399-1405.
52. Deighton CM, Walker DJ, Griffiths ID, Roberts DF. The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. *Clin Genet* 1989;36:178-82.
53. Dieudé, P. & Cornélis, F. (2005) Genetic basis of rheumatoid arthritis. *Joint, Bone, Spine: Revue Du Rhumatisme*, 72, 520-526.
54. Dobloug JH, Forre O, Kaess E, Thorsby E. HLA antigens and rheumatoid arthritis. Association between HLA-DRw4 positivity and IgM rheumatoid factor production. *Arthritis Rheum* 1980;23:309-13.
55. Dubucquoi S, Fily-Nalewajk S. Prise en charge de la polyarthrite rhumatoïde en 2008: la biologie peut-elle répondre aux attentes d'un clinicien? *Revue Francophone des Laboratoires*, No 404, 2008, p51-56.
56. Emery P, Salmon M, Bradley H, Wordsworth P, Tunn E, Bacon PA, et al. Genetically determined factors as predictors of radiological change in patients with early symmetrical arthritis. *Br Med J* 1992;305:1387-1389.
57. Essakalli M, Atouf O, Bennani N, Benseffaj N, Ouadghiri S, Brick C. Toll Like receptor. *Pathol Biol* doi:10.1016/j.patbio.2008.04.003.
58. Essakalli M, Brick C, Bennani N, Benseffaj N, Ouadghiri S, Atouf O. Le lymphocyte TH17 dernier-né de la famille des lymphocytes T CD4+. *Pathol Biol* 2009;doi:10.1016/j.patbio.2009.01.001.

59. Fabien N, Goetz J, Sordet C, Humbel RL, Sibilia J. Groupe d'étude de l'auto-immunité. Nouveaux auto-anticorps de la polyarthrite rhumatoïde : les auto-anticorps anti-peptides ou protéines citrullinées et les autres. *Presse Med* 2008;37:1756—66.
60. Falgarone G, Jaen O, Boissier MC. Rôle de l'immunité innée dans la polyarthrite rhumatoïde. *Rev Rhum* 2005;72:17-26.
61. Fautrel B., T. Pham, B. Combe, R.M. Flipo, P. Goupille, X. Le Loet et al. Place et forme de l'information et de l'éducation dans la prise en charge de personnes souffrant de polyarthrite rhumatoïde. Établissement de recommandations pour la pratique clinique à partir de données de la littérature et d'opinions d'experts. (rencontres d'experts en rhumatologie). *Rev Rhum*, 71 (2004), pp. S146–S155.
62. Fiocco U, Sfriso P, Oliviero F, Pagnin E, Scagliori E, Campana C, et al. Co-stimulatory modulation in rheumatoid arthritis: The role of (CTLA4-Ig) abatacept. *Autoimmun Rev* 2008;8:76-82.
63. Firestein GS. Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Rheum* 2005;11(3):S39-S44.
64. Flores-Borja F, Jury EC, Mauri C, Ehrenstein MR. Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *PNAS* 2008;105(49):19396-401.
65. Fournier C. Que reste-t-il du lymphocyte T dans la polyarthrite rhumatoïde ? *Rev Rhum* 2005;72:290-6.
66. FRIES JF, Wolfe F, Apple R, Erlich H, Bugawan T, Holmes T, Bruce B. HLA-DRB1 genotype association in 793 white patients from a rheumatoid arthritis inception cohort. Frequency, severity, and treatment bias. *Arthritis Rheum* 2002 ; 46(9) :2320-9.
67. François Cornélis. Génétique de la polyarthrite rhumatoïde : un tournant décisif, *Revue de rhumatisme monographies* 77(2010)279–282.
68. François Lemoine, Yvon Lebranchu, Olivier Boyer, Marie Christine Béné, Yacine Taoufik. Immunité adaptative : Lymphocytes T régulateurs et notion de tolérance, page 82-13,
69. Funovits J, Aletaha D, Bykerk V, et al. The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: methodological report phase I. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1589–95.
70. Furuzawa-Carballeda J, Vargas-Rojas MI, Cabral AR. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmun Rev* 2007;6:169-75.
71. GACZYNSKA M, Roch KL, Goldberg AL et al. IFN and expression of MHC genes regulate peptides hydrolysis by protéasome. *Nature* 1993; 365: 246-267.
72. GARBI N, Hammerling G, and Tanaka S. Interaction of ERp57 and tapasin in the generation of MHC class I-peptide complexes. *Curr Opin Immunol* 2007;19:99-10.
73. Garboczi DN, Ghosh P, Utz U, Fan QR, Biddison WE, Wiley DC, structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA A2 *Nature* 1996; 384. 134-41.
74. Gaudin P., S. Leguen-Guegan, B. Allenet, A. Baillet, L. Grange, R. Juvin. Is dynamic exercises beneficial in patients with rheumatoid arthritis? *Joint Bone Spine*, 75 (2008), pp. 11–17.
75. GHOSH P, Amaya M, Mellins E, Wiley DC. The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* 1995;378:457-462.
76. GORMAN JD, Lum RF, Chen JJ, Suarez-Almazor ME, Thomson G, Griswell LA. Impact of shared epitope genotype and ethnicity on erosive disease : a meta-analysis of 3,340 rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2004,(50) :400-12.
77. Gossec L., S. Pavy, T. Pham, A. Constantin, S. Poiraudou, B. Combe et al. Les traitements non médicamenteux dans la prise en charge des personnes atteintes de polyarthrite rhumatoïde récente : établissement de recommandations pour la pratique clinique à partir de données de la littérature et d'opinion d'experts. *Rev Rhum*, 72 (2005), pp. S47–S54.
78. Gough A, J. Faint, M. Salmon, A. Hassell, P. Wordsworth, D. Pilling, A. Birley, P. Emery. Genetic typing of patients with inflammatory arthritis at presentation can be used to predict outcome. *Arthritis Rheum*. 1994. 37. (8). p. 1166-1170.

79. Gourraud PA, Boyer JF, Barnetche T, Abbal M, Cambon-Thomsen A, Cantagrel A, et al. A new classification of HLA-DRB1 alleles differentiates predisposing and protective alleles for rheumatoid arthritis structural severity. *Arthritis Rheum.* february 2006. Vol. 54 (2), pp. 593-599.
80. Gregersen PK, Lee HS, Batliwalla F, Begovich AB. PTPN22: Setting thresholds for autoimmunity. *Semin Immunol* 2006;18:214-23.
81. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis: an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987;30:1205-1213.
82. Guillemin F. Prévalence de la polyarthrite rhumatoïde et des spondylarthrites en France en 2001. *Rev Rhum* 2002;69:1014.
83. GYETVAI A, Szekanecz Z et al. New classification of shared epitope in rheumatoid arthritis : impact on the production of various citrullinated protein antibodies. *Rheumatology* 2010; 49 :25-33.
84. Hall FC, Weeks DE, Camilleri JP, Williams LA, Amos N, Darke C, et al. Influence of the HLA-DRB1 locus on susceptibility and severity in rheumatoid arthritis. *QJM* 1996;89:821-9.
85. Harrison BJ, Symmons DP, Barrett EM, et al. The performance of the 1987ARA classification criteria for rheumatoid arthritis in a population based cohort of patients with early inflammatory polyarthritis. *American Rheumatism Association. J Rheumatol* 1998;25:2324-30.
86. Haslett C, Chilvers E R., Hunter J A A, Boon N A. Polyarthrite Rhumatoïde : Médecine interne Principes et pratique ; 8e Edition Anglaise, Londres 2003, P 835-48.
87. Haute Autorité de Santé. Polyarthrite rhumatoïde : diagnostic et prise en charge initiale. Synthèse des recommandations. 2007,p.2-9.
88. Hill JA, Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E. The conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. *J Immunol* 2003;171:538-541.
89. Hülsemann JL, Zeidler H. Diagnostic evaluation of classification criteria for rheumatoid arthritis and reactive arthritis in an early synovitis outpatient clinic. *Ann Rheum Dis* 1999;58:278-80.
90. Humbel, R.L N.O Olsson-BiotribuneLe point sur les autoanticorps anti-protéines et anti-peptides citrulinés. 2005 ;n°17, pages 34-36.
91. IRIGOYEN Pm Lee AT, and wener MH et al. Regulation of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis: contrasting effects of HLA-DR3 and shared epitope alleles. *Arthritis Rheum* 2005;52:3813-8.
92. Jean-Jacques PERRIER 2006 Le dosage des anticorps antiprotéines citrulinées : intérêt pour le diagnostic et le pronostic de la polyarthrite rhumatoïde. , page 3.
93. J. Sany. Polyarthrite rhumatoïde de l'adulte : conception actuelle. John Libbey Eurotext, Montrouge, 2003.
94. Jacobson, C.C., Kumar, S. & Kimball, A.B. (2011) Latitude and psoriasis prevalence. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 65, 870-873. Kurreeman, F.A.S., Padyukov, L., Marques, R.B., Schrodin, S.J., Seddighzadeh, M., Stoeken Rijsbergen, G., van der Helm-van Mil, A.H.M., Allaart, C.F., Verduyn, W., Houwing-Duistermaat, J., Alfredsson, L., Begovich, A.B., Klareskog, L., Huizinga, T.W.J. & Toes, R.E.M.(2007) A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. *PLoS Medicine*, 4, e278.
95. Kallberg H, Padyukov L, Plenge RM, Ronnelid J, Gregersen PK, Van der Helm-van Mil AHM, et al. Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2007;80:867-75.
96. Kallberg H. , H. Padyukov, R.M. Plenge, J. Ronnelid, P.K. Gregersen, A.H. Van Der Helm-Van Mil, R.E. Toes, T.W. Huizinga, L. Klareskog, L. Alfredsson. Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet.* 2007, 80, (5), p.867-875.

97. KAZKAZ L, Marotte H, Hamwi M, Angelique Cazalis M, et al. Rheumatoid arthritis and genetic markers in syrian and french populations : different effect of the shared epitope, *Ann Rheum Dis* 2007 ; 66(2) :195-201.
98. KERZERHO J.E valuation des proteins midkine et survivine surexprimées dans les cellules tumorales comme cible de l'immunité cellulaire anti-tumorale. Thèse de doctorat de l'université paris XI 2009.
99. Klareskog L, Catrina AI, Paget S. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2009;373:659-72.
100. Klareskog L, Padyukov L, Rönnelid J, Alfredsson L. Genes, environment and immunity in the development of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Immunol* 2006;18:650-5.
101. Klinman D. Does activation of the innate immune system contribute to the development of rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* 2003;48:590-593.
102. KOBELT G, Woronoff AS, et al, Disease status, costs and quality of life of patients with rheumatoid arthritis in France : the ECO-PR study, *joint Bone Spine*, 2008;75 (4):804-812.
103. Kurreeman, F.A.S., Padyukov, L., Marques, R.B., Schrodi, S.J., Seddighzadeh, M., Stocken-Rijsbergen, G., van der Helm-van Mil, A.H.M., Allaart, C.F., Verduyn, W., Houwing-Duistermaat, J., Alfredsson, L., Begovich, A.B., Klareskog, L., Huizinga, T.W.J. & Toes, R.E.M. (2007) A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. *PLoS Medicine*, 4, e278.
104. Lacraz S, Nicod L, Chicheportiche R et al - IL10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 1995 ; 96 : 2304-2310.
105. LEE C, Mc Connell MH. A general model of invariant chain associated with class II histocompatibility complex proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:8269-73.
106. Lee DM, Schur PH. Clinical utility of the anti CCP assay in patients with rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2003;62:870-4.
107. Lee, Y.H., Bae, S.-C., Choi, S.J., Ji, J.D. & Song, G.G. (2011) The association between the PTPN22 C1858T polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis update. *Molecular Biology Reports* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21706348> [Consulté octobre 16, 2011].
108. Liao KP, Batra KL, Chibnik L, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1557-61.
109. Lubberts E. IL-17/Th17 targeting: On the road to prevent chronic destructive arthritis? *Cytokine* 2008;41:84-9.
110. MACGREGOR A, Ollier W, Thomson W, et al. HLA-DRB1*0401/*0404 genotype and rheumatoid arthritis : increased associated association in men, young age at onset, and disease severity. *J Rheumatol* 1995;22.1032-6.
111. Mackay F, Silveira PA, Brink R. B cells and the BAFF/APRIL axis: Fast-forward on autoimmunity and signalling. *Curr Opin Immunol* 2007;19:327-36.
112. Mahnke K, Bedke T, Enk AH. Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression. *Cell Immunol* 2007;250:1-13.
113. Malika Essakallia,b,*, Nadia Benseffaja,b, Ouafa Atoufa,b, Chehrazade Bricka, La polyarthrite rhumatoïde : un vieux système dans un nouveau concept, pdf 2010 , page 1.
114. MARSH SG. Nomenclature for factors of HLA system, update August 2010. *Int J Immunogenet*. 2011;38:89-97.
115. McDaniel DO, Alarcon GS, Pratt PW, Reveille JD. Most African-American patients with rheumatoid arthritis do not have the rheumatoid antigenic determinant (epitope). *Ann Intern Med* 1995;123:181-7.
116. McInnes IB, Schett G, The pathogenesis of thumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011; 6:2205-19. McMahon MJ, Hillarby MC, Clarkson RWE et al. Major histocompatibility complex variants and articular disease severity in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*. 1993 ; 32 : 899.
117. McMahon MJ, Hillarby MC, Clarkson RWE et al. Major histocompatibility complex variants and articular disease severity in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*. 1993 ; 32 : 899.

118. MEWR D, Coote A, Moore D J, Marinou I, Keyworth J, et al. Independent associations of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor with radiographic severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2006, 8 :R128.
119. Meyer O., devant un rhumatisme inflammatoire, quels auto-anticorps demander et quand ?, *revue du rhumatisme* (2003), 70; 803-817.
120. MEYER P WA, Hodgkinson B, Ally M et al. HLA-DRB1 shared epitope genotyping using the revised classification and its association with circulating autoantibodies, acute phase reactants, cytokines, and clinical indices of disease activity in a cohort of South African rheumatoid arthritis patients. *Arthritis patients. Arthritis Research & Therapy* 2011, 13 :R160.
121. Mittermayer S et al.: comparison of the frequency of autoantibodies to cyclic citrullinated peptides using a third generation CCP assay (CCP3) in systemic sclerosis, primary biliary cirrhosis and rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* Jun 15, e-pub ahead of print (2007).
122. Morita, C., T. Horiuchi, H. Tsukamoto, N. Hatta, Y. Kikuchi, Y. Arinobu, T. Otsuka, T. Sawabe, S. Harashima, K. Nagasawa and Y. Niho (2001). "Association of tumor necrosis factor receptor type II polymorphism 196R with Systemic lupus erythematosus in the Japanese: molecular and functional analysis." *Arthritis Rheum* 44(12): 2819-27.
123. Morel J : (Chef de clinique-assistant) Unité Inserm U454 et service d'immuno-rhumatologie, centre hospitalier universitaire Lapeyronie, 371, avenue du Doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier cedex 5 France. P. Miossec : (Professeur des Universités-praticien hospitalier) Unité d'immunologie clinique, service de rhumatologie, hôpital Édouard Herriot, 5, place d'Arsonval, 69437 Lyon cedex 03 France. B. Combe : (Professeur des Universités-praticien hospitalier) Unité Inserm U454 et service d'immuno-rhumatologie, centre hospitalier universitaire Lapeyronie, 371, avenue du Doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier cedex 5 France. *Immunopathologie de la polyarthrite rhumatoïde* : [14-220-A-15].
124. Morvan J, Berthelot JM, Devauchelle-Pensec V, et al. Changes over time in the diagnosis of rheumatoid arthritis in a 10-year cohort. *J Rheumatol* 2009;36:2428-34.
125. Neogi T, Aletaha D, Silman AJ, et al. The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: phase 2 methodological report. *Arthritis Rheum* 2010;62:2582-91.
126. Nouha R, Laure G, Xavier A, Maxime D. Quelle nouveauté dans le diagnostic et le traitement d'une polyarthrite rhumatoïde récente. *Rev Rhum* 2005 ; 72 : 195-200.
127. OLLIER W, Thomson W. population genetics of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1992;18:741-59.
128. OLLIER WE, Stephens C, Awad J, et al. Is rheumatoid arthritis in Indians associated with HLA antigens sharing a DR beta 1 epitope? *Ann Rheum Dis* 1991 ; 50 :295-7.
129. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T Helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008;28:454-67.
130. Panayi GS, Wooley P, Batchelor JR. Genetic basis of rheumatoid disease: HLA antigens, disease manifestations, and toxic reactions to drugs. *Br Med J* 1978;2:1326-8.
131. Pap T, Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Fibroblast biology role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000;2:361-7.
132. Piccirillo CA. Regulatory T cells in health and disease. *Cytokine* 2008;43:395-401.
133. Pratt AG, Isaacs JD, Mathey DL. Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Cl Rh* 2009;23:37-48.
134. RAISSOUNI NOUHA, LAURE GOSSEC, XAVIER AVRAL, MAXIME DOUGADOS. Quelles nouveautés dans le diagnostic et le traitement d'une polyarthrite rhumatoïde récente. *Revue du rhumatisme* 2005 ; 72 :195-200.
135. Remmers, E.F., Plenge, R.M., Lee, A.T., Graham, R.R., Hom, G., Behrens, T.W., de Bakker, P.I., Le, J.M., Lee, H.S., Batliwalla, F. & others (2007a) STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *The new england journal of medicine*, 357, 977.

136. Reviron D, Perdriger A, Toussiroit E, Wendling D, Balandraud N, Guis S, et al. Influence of shared epitope-negative HLA-DRB1 alleles on genetic susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001;44:535-40.
137. Rhodes DA, Trowsdale J. Genetics and molecular genetics of the MHC. *Rev Immunogenet* 1999; 1: 21-31.
138. ROCHE PA. HLA-DM: An in vivo facilitator of MHC class II peptide loading. *Immunity*, 1995;3:259-262.
139. Rutella S, De Cristofaro R, Ferraccioli G. Function and dysfunction of dendritic cells in autoimmune rheumatic diseases. *Hum Immunol* 2009;10.1016/j.humimm.2009.01.023.
140. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Yoshitomi H, Hata H, Takahashi T, Nomura T. Spontaneous development of autoimmune arthritis due to genetic anomaly of T cell signal transduction: Part 1. *Semin Immunol* 2006;18:199-206.
141. SANY. J, COMBE. B, JORGENSEN. C. Polyarthrite rhumatoïde de l'adulte (I). Aspects cliniques. *Encycl Med Chir, Appareil locomoteur*, 14-220-A-10, 1997
142. Saraux A et al.: value of antibodies to citrulline-containing peptides for diagnosing early reumatoid arthritis. *J rheumatol* 30: 2550-2539 (2003)
143. Saraux A, Berthelot JM, Chalès G, et al. Ability of the American College of Rheumatology 1987 criteria to predict rheumatoid arthritis in patients with early arthritis and classification of these patients two years later. *Arthritis Rheum* 2001;44:2485-91.
144. Sarkar S, Fox DA. Regulatory T cell defects in rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum* 2007;56(3):710-3.
145. Sauerland U, Becker H, Seidel M et al. Clinical utility of the ACPA assay: experiences with 700 patients. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1050:314-8.
146. Sebbag M, Chapuy-Regaud S, Auger I, Petit-Teixeira E, Clavel C, Nogueira L, et al. Intérêt clinique et rôle physiopathologique de la réponse auto-immune contre les protéines citrulinées dans la polyarthrite rhumatoïde. *Rev Rhum* 2004;71:872-82.
147. Sebbag M, Simon M, Vincent C, Masson-Bessiere C, Girbal E, Durieux JJ, et al. The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1995;95:2672-9.
148. Seldin MF, Amos CI, Ward R, Gregersen PK. The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42.
149. Sibilia J, Gottenberg JE, Mariette X. Le rituximab : une nouvelle possibilité thérapeutique dans la polyarthrite rhumatoïde. *Rev Rhum* 2008;75:782-9.
150. Silman AJ, Newman J, MacGregor AJ. Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from a nationwide study of disease-discordant twins. *Arthritis Rheum* 1996;39:732-735.
151. Singal, D. P., J. Li and Y. Zhu (2000). "HLA class III region and susceptibility to rheumatoid arthritis." *Clin Exp Rheumatol* 18(4): 485-91.
152. Stastny P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 1978;298:869-71.
153. Stastny P. Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *J Clin. Invest* 1976;57:1148-57.
154. Stastny P. Rheumatoid arthritis. In: Terasaki PJ, editor. *Histocompatibility testing* 1980. Copenhagen: Munksgaard; 1980. p. 681-6.
155. Sugiyama D. K. Nishimura, K. Tamaki, G. Tsuji, T. Nakazawa, A. Morinobu, S. Kumagai. Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis*. 2010, 69, (1), p.70-81.
156. Sun J, Lin Z, Feng J, Li Y, Shen B. BAFF-targeting therapy, a promising strategy for treating autoimmune diseases. *Eur J Pharm* 2008;597:1-5.
157. Suzuki, A., Yamada, R., Chang, X., Tokuhira, S., Sawada, T., Suzuki, M., Nagasaki, M., Nakayama-Hamada, M., Kawaida, R., Ono, M., Ohtsuki, M., Furukawa, H., Yoshino, S., Yukioka,

- M., Tolma, S., Matsubara, T., Wakitani, S., Teshima, R., Nishioka, Y., Sekine, A., et al. (2003) Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylargininedeiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nature Genetics*, 34, 395-402.
158. Svensson B., Boonen A, K. Albertsson, D. Van der Heijde, I. Hafström. Low dose prednisolone in addition for the initial disease modifying antirheumatic drug in patients with early active Rheumatoid arthritis reduces joint destruction and increases the remission rate. *Arthritis Rheum*, 52 (2005), pp. 3360–3370.
159. Sweeney SE, Firestein GS. Primer signal transduction in rheumatic disease-a clinician's guide. *Nat Clin Prac Rheum* 2007;3(11):651-60.
160. Szekanecz Z, Koch AE. Angiogenesis and its targeting in rheumatoid arthritis, *Vasc Pharm* 2009; doi:10.1016/j.vph.2009.02.002.
161. Takemura S, Braun A, Crowson C, Kurtin PJ, Cofield RH, O'Fallon WM, et al. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J Immunol* 2001;167:1072-80.
162. TANEJA V, Giphart MJ, Verdujin W, et al. Polymorphism of HLA-DRB1, -DQA1, and -DQB1 in rheumatoid arthritis in Asian Indians : association with DRB1*0405 and DRB1*1001. *Hum Immunol* 1996;46:35-41.
163. Teller K, Budhai L, Zhang M, Haramati N, Keiser HD, Davidson A. HLA-DRB1 and DQB typing of Hispanic American patients with rheumatoid arthritis: the "shared epitope" hypothesis may not apply. *J Rheumatol* 1996;23:1363–8.
164. Thomsen M, Morling N, Snorrason E, Svejgaard A, Sorensen SF. HLA-Dw4 and rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 1979;13:56–60.
165. THOMSON W, Barton A, Ke X, et al, rheumatoid arthritis association at 6q23, *Nat Genet* 2007;39:1431-3.
166. Thomson W, Harrison B, Ollier B, Wiles N, Payton T, Barrett J et al. Quantifying the exact role of HLA-DRB1 alleles in susceptibility to inflammatory polyarthritis : results from a large, population-based study. *Arthritis Rheum*. 1999 ; 42 : 757-762.
167. Thorsby E. Invited Anniversary Review: HLA-associated diseases. *Hum Immunol* 1997;53:1–11.
168. TOBON .GJ, Touimou .P, Saranx .A, The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 2010; 35:10-4.
169. Tokuhira, S., R. Yamada, X. Chang, A. Suzuki, Y. Kochi, T. Sawada, M. Suzuki, M. Nagasaki, M. Ohtsuki, M. Ono, H. Furukawa, M. Nagashima, S. Yoshino, A. Mabuchi, A. Sekine, S. Saito, A. Takahashi, T. Tsunoda, Y. Nakamura and K. Yamamoto (2003). "An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis." *Nat Genet* 35(4): 341-8.
170. Tran CN, Lundy S, Fox DA. Synovial biology and T cells in rheumatoid arthritis. *Pathol Physiol* 2005;12:183-9.
171. Tran DQ, Shevach EM. Therapeutic potential of FOXP3 regulatory T cells and their interactions with dendritic cells. *Hum Immunol* 2009;doi: 10.1016/j.humimm.2009.02.007.
172. Van der Linden MPM, Knevel R, Huizinga TWJ, et al. Classification of rheumatoid arthritis: comparison of the 1987 American College of Rheumatology criteria and the 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria. *Arthritis Rheum* 2011;63:37–42.
173. Van gaalen FA et al.: A comparison of the diagnostic accuracy and prognostic value of the first- and second anti-cyclic citrullinated peptid autoantipody (CCP1 and CCP2) tests for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 64: 1510-1512 (2005).
174. Van Gaalen FA, Linn-Rasker SP, van Venrooij WJ, de Jong BA, Breedveld FC, Verweij CL, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis : a prospective cohort study. *Arthritis Rheum*. 2004. Vol. 50 (3), pp. 709-715.

175. VAN GAALEN FA, van Aken J et al. association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50 :2113-12.
176. Van Zeben D, Hazes JMW, Zwinderman AH et al. Association of HLA-DR4 with a more progressive disease course in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1991 ; 34 : 822-30.
177. Varache S, Cornec D, Morvan J, et al. Diagnostic accuracy of ACR/EULAR 2010 criteria for rheumatoid arthritis in a 2-year cohort. *J Rheumatol* 2011;38:1250-7.
178. VERPOORT KN, Van Gaalen FA, van der Helm-van Mil AH, et al. association HLA-DR3 with anti-cyclic citrullinated peptide antibody- negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52:3058-62.
179. Vieira LEA et al: Rheumatoid arthritis diagnosis : a comparative study of second and third generation of anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) ELISAs. *Arthritis Rheum* 56:S724 (2007).
180. Vittecoq O et al.: Autoantibodies recognizing citrullinated rat filaggrin in an ELISA using citrullinated and non -citrullinated recombinant proteins as antigens are highly diagnostic for rheumatoid arthritis. *Clin EXP Immunol* 135:173-180 (2004).
181. Vossenaar ER and Van Venrooij WJ: Anti-CCP antibodies, a highly specific marker for (early) rheumatoid arthritis. *Clin applied Immunol Rev* 4: 239-262 (2004).
182. Wassenberg S , R. Rau, P. Steinfeld, Zeidler. Very low-dose prednisolone in early rheumatoid arthritis retards radiographic progression over two years. A multicenter double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*, 52 (2005), pp. 3371-3380.
183. Wei S, Siegal GP. Mechanisms modulating inflammatory osteolysis: A review with insights into therapeutic targets. *Pathol Res Pract* 2008;204:695-706.
184. Weyand CM, MacCarthy TG, Goronzy JJ. Correlation between disease phenotype and genetic heterogeneity in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1995;95:2120-2126.
185. Weyand CM, Xie C, Goronzy J. Homozygosity for the HLA-DRB1 alleles selects for extraarticular manifestations in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 1992 ; 89 : 2033-2039.
186. William TM. Human leukocyte antigen gene polymorphism and the histocompatibility laboratory. *J Mol Diagn* 2001; 3: 98-104.
187. WOODROW J C, Nichol FE, Zaphiropoulos G. DR antigens and rheumatoid arthritis: a study of two populations. *Br Med J* 1981 ; 283 :1287-8.
188. Wordsworth BP, Bell JI. The immunogenetics of rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 1992;14:59-78.
189. Wu R, Shovman O, Zhang Y, Gilburd B, Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. Increased prevalence of anti-third generation cyclic citrullinated peptide antibodies in patients with rheumatoid arthritis and CREST syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007;32:47-56.
190. YELAMOS.J, Garcia-Lozano JR, Moreno I, Aguilera I, Gonzalez MF, Garcia A, Nunez-Roldan A, Sanchez B. Association of HLA-DR4Dw15 (DRB1*0405) and DR10 with rheumatoid arthritis in a spanish population. *Arthritis Rheum* 1993; 22:607-10.
191. YORK IA, Mo A X, Lemeris K, Zeng W, Shen Y, Abraham C R, Saric T, et al. The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. *Immunity* 2003; 18:429-440.
192. ZANELLI E, Breedveld.F.C, et al. HLA class II association with rheumatoid arthritis : Facts and interpretations, *Human Immunology* 2000 ;61,1254-61.

• **Les ouvrages bibliographiques :**

193. AL-YOUSSEF Abir. Thèse pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES /2006/ Laboratoire d'Immunologie, UMR CNRS 6101 (pages 26 ; 33)
194. CHARLES – JOEL MANKES : La polyarthrite rhumatoïde de l'adulte, pages 13.
195. Cours DCEM3 – Polyarthrite rhumatoïde – Mise à jour du 20/03/2011, Polyarthrite rhumatoïde : Etiologie, diagnostic, évaluation, principes de traitement et surveillance, pages 10-11.
196. Cours13bichat2012-2013.weebly.com/uploads/9/6/0/.../2_cmh_roneo.pdf.
197. GHOMARI Mourad Boumediene « Etude Clinique & Epidemiologique » thèse présentée par '6ème année de médecine' et corrigée par Pr. MEGUENNI et Dr. CHABNI.
198. Jean-Pierre Revillard. Immunologie 4e édition De Boeck & Larcier 2001. page 48.
199. MEDDOUR.Y Thèse « DE LA PHYSIOPATHOLOGIE AU TRAITEMENT » ; page 11.
200. Thomas BARNETCHE « Enjeux méthodologiques de l'analyse de marqueurs génétiques dans les études d'association de maladies multifactorielles : application à la polyarthrite rhumatoïde ». Thèse Présentée et soutenue par Le 21 Septembre 2007. Page22-46.
201. Pr. Malika Bouali-Benhalima, Cours supérieur méditerranéen d'immunologie, Gènes et molécules HLA. 22 Septembre 2010.

• **Les sites internet :**

202. 21e Congrès annuel de la Société Marocaine de Rhumatologie le 18/04/2011.http://www.amp.ma/actualite_detail.php?id=79.
203. Club Rhumatismes et Inflammation. <http://www.cri-net.com/> (Le 20/06/2012).
204. Elsevier Masson SAS, Anticorps antinucléaires © 2006. Doi : PM-02-2006-35-2-C2-0755-4982-101019-200601404Claire Goulvestre.
205. Elsevier Masson SAS, Régulation cellulaire et cytokinique de la synovite rhumatoïde. Adresse e-mail : boissier@univ-paris13.fr (Marie-Christophe Boissier) © 2010 Société Française de Rhumatologie.
206. François PILLONa,* Docteur en pharmacie et en médecine Yves MICHIELSb Maître de conférences associé en pharmacie clinique. Épidémiologie et physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde<http://dx.doi.org/10.1016/j.actpha.2013.09.018>
207. http://fr.wikipedia.org/wiki/Polyarthrite_rhumato%C3%AFde.
208. Jacques Morel et Bernard Combe Service d'Immuno-Rhumatologie. POLYARTHRITE RHUMATOÏDE/ RHEUMATOID ARTHRITIS., CHU Lapeyronie 34295 MONTPELLIER cedex 5 j-morel@chu-montpellier.fr
209. Monier J.C., Fabien N. Les Auto-anticorps 2003-200, cédérom,
210. www.medix.free.fr/sim/systeme-hla-hematologie.php.
211. <http://www.revuedesante.com/Article/polyarthrite-rhumatoide-fmc-1447.html>.
212. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.27366/pdf>.
213. Dr Michelle Rosenzweig, Laboratoire de Biothérapie, Hôpital de la Pitié Salpêtrière. [22/05/2014 22:52:17] : Reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T
214. http://www.chusa.upmc.fr/pedagogie/dcem1/immuno/Reconnaissance_antigene_par_les_LT.pdf.

VIII. ANNEXES

- I. Annexe 1 : La fiche de renseignement
- II. Annexe 2 : Protocole de la technique de dosage de la VS
- III. Annexe 3 : Protocole de la technique du latex(CRP)
- IV. Annexe 4 : Protocole de la technique du latex (FR)
- V. Annexe 5 : Protocole de la technique Waaler rose
- VI. Annexe 6 : Protocole de la technique d'ELISA
- VII. Annexe 7 : Protocole de la technique d'IFI
- VIII. Annexe 8 : Protocole d'extraction d'ADN (Buffy coat)
- IX. Annexe 9 : Protocole de contrôle de qualité d'ADN
- X. Annexe 10 : Protocole de la technique PCR/SSP
- XI. Annexe 11 : Appareillages
- XII. Tableau de quelques résultats

Annexe 1 : La fiche de renseignement

CENTRE HOSPITALO - UNIVERSITAIRE DE BLIDA
UNITE HASSIBA BEN-BOUALI
UNITE HOSPITALO - UNIVERSITAIRE D'IMMUNOLOGIE
Tél : 025411895/96 poste : 220

Fiche de renseignement des malades atteints de polyarthrite rhumatoïde

N° d'identification : Date :
Nom : Prénom(s) :
Date de naissance : Sexe : Homme ☐ Femme ☐
Adresse :
Numéro de téléphone :
Hospitalisé ☐ Externe ☐
CHU : Service : Médecin traitant :

Antécédents personnels:

Tabac : Oui ☐ Non ☐
HTA : Oui ☐ Non ☐
Hypercholestérolémie : Oui ☐ Non ☐
Diabète : Oui ☐ Non ☐
Autre affection auto-immune : Oui ☐ Non ☐
Si oui préciser
Autres pathologies : Oui ☐ Non ☐
Si oui préciser

Antécédents familiaux :

Rhumatisme inflammatoire chronique : Oui ☐ Non ☐
Si oui préciser.....

Début de la symptomatologie :

Signes cliniques :

- Durée raideur matinale (mn) :
- Nombre d'articulations douloureuses sur 28 sites (NAD) :
- Nombre d'articulations gonflées sur 28 sites (NAG) :
- Evaluation globale de la maladie par le malade (mm) :
- Evaluation globale de la maladie par le médecin (mm) :

Siège de la synovite :

	Droite	Gauche
• Main	☐	☐
• Poignet	☐	☐
• Coude	☐	☐
• Epaule	☐	☐
• Hanche	☐	☐
• Genoux	☐	☐
• Cheville	☐	☐
• Pied	☐	☐

Score critères ACR/ EULAR 2009 :

Score DAS28 :

Manifestations extra- articulaires : Oui ☐ Non ☐

Si oui, préciser :

Pleuro-Pulmonaire	☐	Cardio-vasculaire	☐
Oculaire	☐	Ténosynovite	☐
Fièvre	☐	Fatigue	☐

Traitements :

AINS :	Oui ☐ Non ☐	Antalgiques :	Oui ☐ Non ☐
Corticoïdes :	Oui ☐ Non ☐	Hydroxychloroquine :	Oui ☐ Non ☐
Sulfasalazine :	Oui ☐ Non ☐	Leflunomide :	Oui ☐ Non ☐
Méthotrexate :	Oui ☐ Non ☐	Rituximab :	Oui ☐ Non ☐
Etanercept :	Oui ☐ Non ☐	Infliximab :	Oui ☐ Non ☐
Adalimumab :	Oui ☐ Non ☐	Acide folique :	Oui ☐ Non ☐

Examens demandés :

- **Bilan inflammatoire :**

- VS ☐
- CRP ☐
- EPP/PPS ☐
- FNS ☐

- **Bilan d'auto-immunité :**

- FR ☐
- ACCP ☐
- FAN ☐
- Autres

Tubes prélevés :

- Tube citraté ☐
- Tube EDTA ☐
- Tube sec ☐
- Tube ACD ☐

Médecin traitant :

Annexe 2 : Protocole de la technique de dosage de la VS

Le citrate trisodique à 3,8 % n'est pas stérile et le prélèvement du citrate à l'aiguille n'est pas effectué de manière stérile. Il est donc absolument exclu de prélever le citrate dans la seringue, puis d'utiliser la même seringue ou pire encore la même seringue et la même aiguille pour prélever le sang. La seule méthode sans risque pour le patient est la suivante :

- A l'aide d'une pipette de 1 ml et d'un ballon à pipeter, placer dans un tube en plastique à usage unique 0,4 ml de citrate trisodique à 3,8 % (le citrate trisodique se conserve un mois au frigo ou 1 semaine à température ambiante. Remplacer toute solution de citrate contenant "des petits poissons"). Inscrire le numéro du patient sur le tube.
- Prélever 2 ml de sang veineux (seringue graduée de 2 ml).
- Enlever l'aiguille (jeter la dans le conteneur à aiguilles) et ajouter 1,6 ml de sang au tube contenant 0,4 ml de citrate trisodique. Mélanger le tube par inversion. Les étapes 2 et 3 doivent être rapides pour éviter la coagulation du sang. Le test doit être réalisé dans les 2 heures.
- Aspirer le sang citraté dans un tube de Westergren (propre et sec) jusqu'à la graduation 0 (utiliser un ballon à pipeter).
- Fixer le tube au support, en s'assurant que le tube et le support sont **ABSOLUMENT** verticaux et qu'il n'y a pas de bulle d'air dans le tube.
- Régler la minuterie sur 60 minutes.
- Noter la hauteur de la couche de plasma en mm après 1 heure. (Si la démarcation entre le plasma et la colonne de globules rouges n'est pas nette, prendre la mesure à l'endroit où la couleur de la couche de globules redevient d'une densité normale. Ceci se rencontre principalement dans des anémies sévères).
- Directement après usage, les tubes de WESTERGREN sont rincés à l'eau filtrée, puis mis à tremper une nuit dans une solution d'hypochlorite. Elles sont ensuite rincées à l'eau filtrée et mises à sécher. (Ne pas utiliser de savon, d'alcool ou d'acide pour nettoyer une pipette de WESTERGREN). Les pipettes doivent être complètement propres et sèches avant réutilisation.

Annexe 3 : Protocole de la technique du latex (CRP)

Ramener les réactifs et les sérums à tester à température ambiante (18-25°C).

Test qualitatif :

Déposer successivement sur la carte:

- goutte du contrôle positif
- goutte du contrôle négatif
- goutte (50 µl) de sérum à tester.
- Placer à côté de chaque dépôt 1 goutte de Latex anti-CRP bien homogénéisé.
- Mélanger les 2 gouttes à l'aide d'un agitateur et les étaler.
- Placer la plaque dans un agitateur, un mouvement de rotation et 3 minutes et observer l'apparition éventuelle d'une agglutination.

Test semi-quantitatif :

Préparer une série de dilutions du sérum à tester en solution de NaCl 8,5 g/l. Répéter le test pour chaque dilution de la même manière que pour le test qualitatif et rechercher la dernière dilution donnant encore une agglutination. La concentration du sérum testé en CRP est estimée en multipliant le titre obtenu par le seuil de sensibilité du test 6mg/l.

Annexe 4 : Protocole de la technique du latex (FR)

Ramener les réactifs et les sérums à tester à température ambiante (18-25°C).

TEST QUALITATIF

- Déposer successivement sur la plaque :
 - goutte du contrôle positif
 - goutte du contrôle négatif
 - goutte (50 µl) des sérums à tester
- A côté de chaque dépôt, ajouter 1 goutte de réactif Latex bien homogénéisé.
- Mélanger à l'aide d'un agitateur.
- Imprimer à la carte un lent mouvement de rotation.
- Noter l'apparition d'une agglutination en 2 minutes.

LECTURE

- **Réaction positive** (agglutination) : présence de facteurs rhumatoïdes dont la concentration peut être estimée grâce à la technique semi-quantitative.
- **Réaction négative** (suspension homogène) : absence de facteurs rhumatoïdes ou présence à un taux inférieur à la limite de détection (environ 8 UI/ml).

TEST SEMI-QUANTITATIF

En cas de réaction positive, titrer le sérum par une série de dilutions de raison 2 en solution saline 9 g/l.

Tester chaque dilution selon le protocole décrit précédemment.

Le titre du sérum en facteurs rhumatoïdes, exprimé en UI/ml est obtenu en multipliant l'inverse de la dernière dilution donnant une réaction faiblement positive, par le seuil de sensibilité de la technique (8UI/ml).

Annexe 5 : Protocole de la technique Waaler rose

Ramener les réactifs et les sérums à tester à température ambiante (18-25°C).

Test qualitatif :

- Placer 50µl du sérum de l'échantillon et une goutte de chacun des témoins positifs et négatifs dans des cercles distincts sur le test de glissement.
- Agiter le réactif de WR doucement avant de l'utiliser puis ajouter une goutte à côté de l'échantillon à tester.
- Mélanger les gouttes à l'aide d'un agitateur, les répartissant sur toute la surface du cercle. utiliser agitateur différent pour chaque échantillon.
- Laisser la plaque sur une surface plane pendant 2 minutes.
- Après ce temps, tordre très soigneusement la plaque une fois à environ 45° à l'horizontale puis la laisser à nouveau sur une surface plane pendant une minute de plus.

Test semi-quantitatif :

En cas de réaction positive, titrer le sérum par une série de dilutions de raison 2 en solution saline 9 g/l.

Tester chaque dilution selon le protocole décrit précédemment.

Le titre du sérum en facteurs rhumatoïdes, exprimé en UI/ml est obtenu en multipliant l'inverse de la dernière dilution donnant une réaction faiblement positive, par le seuil de sensibilité de la technique (8UI/ml).

Annexe 6 : Protocole de la technique d'ELISA

EUROIMMUN

Medizinische
Labordiagnostika
AG



ELISA Anti-CCP (IgG) Mode d'emploi

REFERENCE	ANTICORPS ANTI	CLASSE IG	SUBSTRAT	FORMAT
EA 1505-9601 G	peptides cycliques citrullinés (CCP)	IgG	Puits coatés avec les Ag	96 x 01 (96)

Indication: Polyarthrite rhumatoïde

Principe du test: Ce dosage ELISA permet la réalisation d'un dosage semi-quantitatif ou quantitatif in vitro pour la détermination d'auto anticorps humains de classe IgG dirigés contre les peptides cycliques citrullinés (CCP). Le coffret contient des barrettes de microtitration de 8 puits de réactif sécables, coatés avec des peptides cycliques citrullinés synthétiques. Lors de la première étape de la réaction, les échantillons patients dilués (sérum ou plasma sur EDTA, héparine ou citrate) sont incubés dans les puits. Dans le cas d'échantillons positifs, les anticorps spécifiques de classe IgG (mais aussi IgA et IgM) se fixeront sur les antigènes correspondants. Pour détecter les anticorps fixés, une seconde incubation est réalisée en utilisant un anticorps anti-IgG humaine couplé à une enzyme (conjugué enzymatique). Ce conjugué est capable de générer une réaction colorée.

Composition du kit:

Composants	Couleur	Format	Symbole
1. Puits de la microplaque coatés avec des antigènes 12 barrettes de 8 puits sécables sur leur support, coatés avec les antigènes. Prêts à l'emploi	—	12 x 8	[STRIPS]
2. Calibrateur 1 à 5 1, 5, 20, 100, 200 UR/ml (IgG, humain), prêts à l'emploi	rouge	5 x 2.0 ml	[CAL 1-5]
3. Contrôle positif (IgG, humain), prêt à l'emploi	bleu	1 x 2.0 ml	[POS CONTROL]
4. Contrôle négatif (IgG, humain), prêt à l'emploi	vert	1 x 2.0 ml	[NEG CONTROL]
5. Conjugué enzymatique anti-IgG humaine (lapin) couplé à la peroxydase, prêt à l'emploi	vert	1 x 12 ml	[CONJUGATE]
6. Tampon échantillon prêt à l'emploi	violet	1 x 100 ml	[SAMPLE BUFFER]
7. Tampon de lavage concentré 10x	incolore	1 x 100 ml	[WASH BUFFER 10x]
8. Solution du chromogène/substrat TMB/H ₂ O ₂ , prête à l'emploi	incolore	1 x 12 ml	[SUBSTRATE]
9. Solution d'arrêt acide sulfurique 0.5 M, prête à l'emploi	incolore	1 x 12 ml	[STOP SOLUTION]
10. Mode d'emploi	—	1 livret	
11. Protocole avec les valeurs cibles	—	1 feuille	
[LOT] Lot	K€		Température de conservation
[IVD] Diagnostic in vitro			Non ouvert, utilisable jusqu'à

Conservation et stabilité: Le kit doit être conservé entre +2°C et +8°C. Ne pas congeler. Non ouvert, tous les composants du kit sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée.

Evacuation des déchets: Les échantillons patients non dilués et les barrettes de microplaque incubées doivent être manipulés comme des déchets infectieux. Il n'est pas nécessaire de collecter les autres réactifs séparément, sauf si cela est spécifié par la réglementation officielle.



Protocole de pipetage

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C 2	P 6	P 14	P 22			C 1	P 2	P 10	P 18		
B	pos.	P 7	P 15	P 23			C 2	P 3	P 11	P 19		
C	neg.	P 8	P 16	P 24			C 3	P 4	P 12	P 20		
D	P 1	P 9	P 17	P 25			C 4	P 5	P 13	P 21		
E	P 2	P 10	P 18				C 5	P 6	P 14	P 22		
F	P 3	P 11	P 19				pos.	P 7	P 15	P 23		
G	P 4	P 12	P 20				neg.	P 8	P 16	P 24		
H	P 5	P 13	P 21				P 1	P 9	P 17	P 25		

Le protocole de pipetage pour les barrettes de 1 à 4 est donné à titre d'exemple pour un dosage qualitatif/semi-quantitatif de 25 échantillons patients (P 1 à P 25).

Le protocole de pipetage pour les barrettes de 7 à 10 est donné à titre d'exemple pour un dosage quantitatif de 25 échantillons patients (P 1 à P 25).

Les calibrateurs (C 1 à C 5), les contrôles positif (pos.) et négatif (neg.), et les échantillons patients ont été incubés chacun dans un puits. La fiabilité du dosage ELISA peut être améliorée en dosant chaque échantillon en double. Les contrôles positif et négatif servent au contrôle interne de la fiabilité des procédures du dosage. Ils doivent être inclus dans chaque série de dosage.

Calcul des résultats

Dosage qualitatif/semi-quantitatif: Les résultats peuvent être évalués semi-quantitativement par le calcul d'un ratio avec la DO du contrôle ou de l'échantillon patient et la DO du calibrateur 2. Calculer ce ratio selon la formule suivante:

$$\frac{\text{Do du contrôle ou de l'échantillon patient}}{\text{Do du calibrateur 2}} = \text{Ratio}$$

EUROIMMUN recommande d'interpréter les résultats de la manière suivante:

Ratio ≤ 1.0 : négatif
Ratio > 1.0 : positif

Dosage quantitatif: La courbe standard à partir de laquelle la concentration des anticorps anti-CCP dans les échantillons patients pourra être lue, est obtenue en traçant une courbe point à point reliant les valeurs de DO mesurées pour les 3 sérums de calibration (linéaire, axe y) contre les unités de concentrations correspondantes (logarithmique, axe x). La courbe standard peut être calculée par ordinateur en utilisant un des modes suivants: régression logistique à 4 paramètres, régression logistique à 5 paramètres, spline d'ajustement, courbe log-logit et courbe lim/limit. Le graphique suivant est un exemple de courbe de calibration typique. Ne pas utiliser cette courbe pour évaluer les concentrations en anticorps dans les échantillons patients.



(EV_0010_F_DEUK_H02)

Inkubation: Anti-CCP-ELISA und Anti-Sa-ELISA
Incubation: Anti-CCP ELISA and Anti-Sa ELISA

		Antigen-beschichtete Reagenzgefäße Antigen-coated wells	
	Pipettieren: 100 µl je Reagenzgefäß Pipette: 100 µl per well	Kalibratoren, Kontrollen, verdünnte Proben calibrators, controls, diluted samples	
1.	Inkubieren: 60 min bei Raumtemperatur (18°C bis 25°C) Incubate: 60 min at room temperature (18°C to 25°C)		
	Waschen: 300 µl (man.)/450 µl (aut.) je Reagenzgefäß Einwirkzeit: 30-60 s je Waschzyklus Wash: 300 µl (man.)/450 µl (aut.) per well reaction time: 30-60 s per washing cycle	3x	
	Pipettieren: 100 µl je Reagenzgefäß Pipette: 100 µl per well	Enzym-Konjugat enzyme conjugate	
2.	Inkubieren: 30 min bei Raumtemperatur (18°C bis 25°C) Incubate: 30 min at room temperature (18°C to 25°C)		
	Waschen: 300 µl (man.)/450 µl (aut.) je Reagenzgefäß Einwirkzeit: 30-60 s je Waschzyklus Wash: 300 µl (man.)/450 µl (aut.) per well reaction time: 30-60 s per washing cycle	3x	
	Pipettieren: 100 µl je Reagenzgefäß Pipette: 100 µl per well	Chromogen/Substrat chromogen/substrate	
3.	Inkubieren: 30 min bei Raumtemperatur (18°C- 25°C) Incubate: 30 min at room temperature (18°C- 25°C)		
	Pipettieren: 100 µl je Reagenzgefäß Pipette: 100 µl per well	Stopplösung stop solution	
	Auswerten: Photometrische Messung (450 nm) Evaluate: photometric measurement (450 nm)		

Annexe 7 : Protocole de la technique d'IFI

EUROIMMUN

Medizinische
Labordiagnostika
AG



Réalisation du test

La technique TITERPLANE a été développée par EUROIMMUN pour standardiser les analyses immunologiques. Les échantillons ou les anticorps marqués sont d'abord déposés dans les puits de réaction du support de réactifs. Les lames à BIOCHIPs sont ensuite placées dans leur position correspondante sur le support de réactifs (avec l'ergot de repérage), afin de mettre en contact les BIOCHIPs de la lame et les puits contenant les échantillons. Ainsi, au moment de l'incubation, toutes les réactions individuelles commencent en même temps. La position et la taille des gouttes sont définies précisément par la géométrie du système. Comme les fluides sont confinés dans un espace clos, l'utilisation d'une "chambre humide" conventionnelle n'est pas nécessaire. Il est possible d'incuber n'importe quel nombre d'échantillons les uns à côté des autres et simultanément sous les mêmes conditions.

Préparation: La préparation des réactifs, des échantillons de sérums et de plasma est décrite à la page 4 de ce mode d'emploi.

Pipetage: Déposer un volume défini (voir schéma page suivante) d'échantillon dilué dans chaque puits de réaction du Titerplane en évitant les bulles d'air. Transférer tous les échantillons à tester, avant de commencer l'incubation (jusqu'à 200 dépôts). Utiliser le Titerplane avec son support en polystyrène.

Incubation: Commencer les réactions en mettant chaque lame à BIOCHIPs dans la position correspondante sur le Titerplane (avec l'ergot de repérage). Vérifier que chaque échantillon est bien en contact avec son BIOCHIP, qu'il ne déborde pas et qu'il ne vienne pas en contact avec un autre échantillon. Incuber 30 min. à température ambiante (+18°C à +25°C).

Lavage: Rincer les lames à BIOCHIPs avec un flux de tampon PBS-Tween (utiliser un bécher) et les immerger immédiatement dans un bac de lavage contenant du tampon PBS-Tween pendant au moins 5 min. Si possible agiter sur un agitateur rotatif. Laver au maximum 16 lames par cuvette, ensuite remplacer le tampon PBS-Tween avec du tampon neuf.

Pipetage: Sur un Titerplane propre, déposer un volume défini (voir schéma page suivante) d'anti-globuline humaine marquée à la fluorescéine dans chaque puits de réaction. Faire tous les dépôts avant de continuer l'incubation. Utiliser une pipette à répétition. Le sérum anti-humain marqué doit être mélangé avant son utilisation. Pour gagner du temps, durant l'incubation des échantillons, le conjugué peut être déposé sur un autre support de réaction.

Incubation: Sortir une lame à BIOCHIP du bac, et dans les 5 secondes, essuyer le dos et le côté bas de la lame, avec une serviette en papier. Placer la lame à BIOCHIPs immédiatement dans sa position sur le Titerplane (avec l'ergot de repérage). Ne jamais sécher les zones entre les puits de réaction. Vérifier que les BIOCHIPs sont bien en contact avec les solutions. Procéder de la même façon pour les autres lames. A partir de ce stade, protéger les lames de la lumière directe du soleil. Incuber 30 min. à température ambiante (+18 à +25°C).

Lavage: Remplir le bac de lavage avec du tampon PBS-Tween neuf. Rincer les lames à BIOCHIPs avec un flux de tampon PBS-Tween (utiliser un bécher) et les immerger dans un bac de lavage contenant du tampon PBS-Tween pendant au moins 5 min. Si possible agiter sur un agitateur rotatif. 10 gouttes de bleu Evans pour 150 ml de tampon phosphate peuvent être ajoutées pour la contre coloration. Laver au maximum 16 lames par cuvette, ensuite remplacer le tampon PBS-Tween avec du tampon neuf.

Inclusion: Placer le milieu d'inclusion sur une lamelle couvre-objet en verre – voir le schéma à la page suivante pour le volume par puits de réaction. Utiliser le support d'inclusion en polystyrène. Sortir une lame à BIOCHIPs du tampon PBS-Tween et essuyer avec une serviette en papier le dos, les 4 bords de la lame, ainsi que toute la surface autour (sauf entre les puits). Placer, face vers le bas, la lame avec les BIOCHIPs jusqu'à ce qu'elle soit en contact avec la lamelle couvre-objet préalablement préparée. Vérifier immédiatement que la lamelle couvre-objet est bien positionnée. Corriger la position si nécessaire.

Evaluation: Interpréter la fluorescence au microscope.
Recommandations générales: Objectif 20x (coupes de tissus, cellules infectées et transfectées), 40x (substrats cellulaires).
Filtre d'excitation: 488 nm, séparateur de couleur: 510 nm, filtre de blocage: 520 nm.
Source lumineuse: lampe à vapeur de mercure, 100W, EUROIMMUN LED, EUROStar Blueight.

**Technique TITERPLANE**Lames à BIOCHIP
BIOCHIPs

support de réactifs

Pipetage: 10 µl par puits (3x3 mm)
30 µl par puits (5x5 mm)
70 µl par puits (9x7 mm)



échantillons dilués



Incubation: 30 min



Lavage: Rincer 1 seconde
5 min. dans le bac de lavage



PBS-Tween

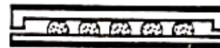
Pipetage: 10 µl par puits (3x3 mm)
25 µl par puits (5x5 mm)
65 µl par puits (9x7 mm)



Anticorps conjugué



Incubation: 30 min



Lavage: Rincer 1 seconde
5 min. dans le bac de lavage



PBS-Tween

Inclusion: max. 10 µl par puits (3x3 mm)
max. 10 µl par puits (5x5 mm)
max. 20 µl par puits (9x7 mm)

milieu d'inclusion
lamelle

Evaluation: microscope à fluorescence

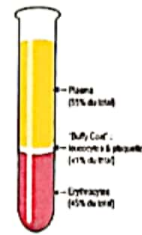


Annexe 8 : Protocole d'extraction d'ADN (Buffy coat)

Prélèvement : le sang est recueilli dans un tube ACD

Procédure :

- Récupérer 200µl du Buffy coat (couche jaunâtre qui contient les leucocytes ou globules blancs et les plaquettes se trouvant entre les érythrocytes ou globules rouges et le plasma) dans un Epen dorff stérile et numéroté.
- Ajouter 200µl du Tampon AL (solution détergente)
- Ajouter 20µl de l'enzyme Protéinase K (elle va dégrader les protéines de la cellule).
- Vortexer
- Placer 10min dans le Thermoblock (à température 56°C)
- Ajouter 200µl d'éthanol (il sera plus efficace que l'isopropanol pour éliminer les restes de la solution de lyse, car il contient 30% d'eau)
- Vortexer
- Microcentrifugation rapide (quelques secondes)
- Verser le mélange dans un Column stérile numéroté
- Microcentrifugation 13000tr/min pendant 1min
- Jeter la poubelle et la remplacer par autre
- Ajouter 500µl du Tampon WA1
- Centrifugation 13000 tr/min pendant 1 min
- Jeter la poubelle et la remplacer par autre
- Ajouter 500µl du Tampon WA2
- Microcentrifugation 14000 tr/min pendant 3min
- Jeter la poubelle et la remplacer par un Epen dorff stérile numéroté
- Ajouter 200µl du Tampon AE
- Laisser 5min
- Microcentrifugation 13000tr/min pendant 1min
- Etiqueter (Nom, Prénom, Numéro et la date du prélèvement)
- Congeler l'ADN récupéré et le tube ACD du sang totale à -20°C



Sample



Lyse



Bind



Wash
(Buffer AW1)

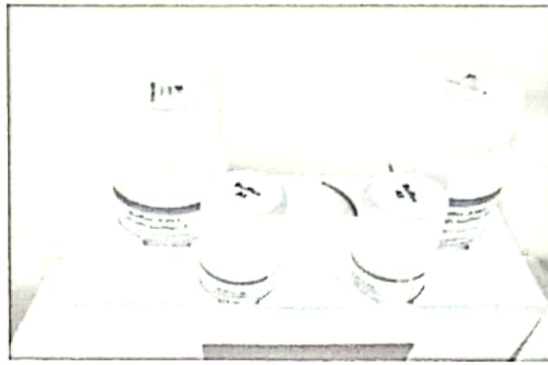


Wash
(Buffer AW2)



Elute





Annexe 9 : Protocole de contrôle de qualité d'ADN

- Préparer un gel d'agarose à 0,8% dans un tampon tris-acétate-EDTA (TAE) (1M tris, 200mM acétate et 50mM EDTA), PH = 8 contenant 0,5µg/ml de Bromure d'éthidium ;
- Préparer les échantillons de la façon suivante :
5µl d'ADN génomique et 5µl de bleu de dépôt (0,05% bleu de bromophénol, 60% glycérol) ; déposer 10 µl dans différents échantillons dans les différents puits du gel et le control positif (ADN humaine) de poids moléculaire variable ;
- Faire migrer le gel dans le tampon Tris acide borique et EDTA (TBE) (0,5M) pendant 30min à 100V ;
- Révéler l'ADN par exposition du gel aux rayons UV.

Annexe 10 : Protocole de la technique de PCR/SSP

- Sortir de la température de conservation indiquée : le (volume) tube de Micro SSP™ D-Mix correspondant à la plaque d'amorces Micro SSP™ sélectionnée, la (les) plaque(s) d'amorces, ainsi que le nombre approprié d'échantillons d'ADN. Décongeler à température ambiante (20 – 25 °C).

Remarque : la plaque et sa feuille adhésive peuvent être coupées en fonction du nombre de tests à effectuer. Remplacer immédiatement la partie non utilisée à la température de conservation préconisée.

- Agiter les échantillons d'ADN sur Vortex.
- Placer la plaque PCR sur un portoir adapté (Robbins Scientific, Cat. #1044-39-5) et retirer la feuille adhésive.
- Sortir la Taq Polymérase du congélateur et conserver dans de la glace jusqu'à l'emploi.
- A l'aide d'un Pipetman® (ou équivalent), ajouter 1 µl de diluant ADN dans le tube de contrôle négatif de la plaque d'amorces.
- A l'aide d'un Pipetman® (ou équivalent), ajouter 2µl de la Taq Polymérase (5-unités/µl) dans le tube de D-mix.
- Boucher le tube, agiter sur vortex pendant 5 secondes, et centrifuger pour bien faire descendre le liquide au fond du tube.

- A l'aide d'un Pipetman® P20 (ou équivalent), ajouter 9 µl de D-mix au tube contrôle négatif.
- A l'aide d'un Pipetman® (ou équivalent), ajouter 39µl d'échantillon d'ADN dans le tube de D-mix.
- Boucher le tube de Micro SSP™ D-mix et l'agiter sur Vortex pendant 5 secondes. Centrifuger plusieurs fois pendant un court instant.
- A l'aide d'un Pipetman® P20 ou d'une pipette électronique, distribuer 10 µl du mélange réactionnel provenant du tube de Micro SSP™ D-mix dans chaque tube de réaction, à l'exception du tube contrôle négatif, de la plaque d'amorces Micro SSP™.

Important : Veiller à ce que l'échantillon soit bien déposé sur les amorces lyophilisées dans le fond de chaque tube, pour éviter toute contamination croisée entre les tubes. Toucher la paroi intérieure du tube avec le cône pour permettre à l'échantillon de glisser jusqu'au fond du tube. Avant de commencer la PCR, vérifier que chaque échantillon soit bien descendu au fond du puits, sinon tapoter légèrement la plaque pour permettre à la goutte de descendre.

- Couvrir les tubes de réaction avec la feuille adhésive fournie (marquer sur la feuille le nom et le prénom du malade ainsi que son numéro d'ordre). Vérifier que les tubes de réaction sont parfaitement recouverts pour éviter l'évaporation pendant la PCR.
- Placer la plaque d'amorces Micro SSP™ dans le thermocycleur.
- Placer le Pressure Pad sur la plaque (côté texturé vers le haut) et refermer le couvercle du thermocycleur. (Voir le Protocole du Pressure Pad Micro SSP™ pour le choix en fonction du thermocycleur).
- Entrer votre numéro de programme Micro SSP™ PCR. Sélectionner l'option 10 µl pour le volume de la réaction.
- Démarrer le programme PCR qui dure environ 1 heure et 16 minutes. La dernière étape conserve l'échantillon à 4°C jusqu'à l'arrêt.

Dénaturation initiale:	94°C 2 min.	
Dénaturation:	94°C 10 s	} 10 cycles
Hybridation et Elongation:	65°C 60 s	
Dénaturation:	94°C 10 s	} 20 cycles
Hybridation:	61°C 50 s	
Elongation:	72°C 30 s	

- Enlever la plaque d'amorces du thermocycleur. Retirer délicatement la feuille adhésive en évitant les projections ou conserver l'échantillon sur la plaque d'amorces à une température égale ou inférieure à -20 °C pour effectuer l'électrophorèse en gel plus tard.
- Préparation du gel d'agarose à 2.5% :
 - Ouvrir la vis de fixation de la base.
 - Insérer le plateau du gel, en faisant correspondre les bords colorés pour une parfaite orientation.
 - Verrouiller la boîte de gel contre l'embase en déplaçant la broche de verrouillage dans la position verrouillée.
 - Ajuster le niveau de la base à l'aide de la bulle d'air et des trois pieds à hauteur réglable.
 - Orienter et introduire les 14 peignes sur le portoir.

- Dans une bouteille de verre de 500 ml, ajouter 1,25 g d'agarose pour électrophorèse à 50 ml de tampon EDTA 1x Tris Borate (1x TBE) . Chauffer jusqu'à l'obtention d'une solution homogène (mettre à la micro-onde pendant 4min). Ajouter 7µl de bromure d'éthidium.
- Couler 30 ml de gel dans la boîte en s'assurant que l'agarose recouvre toute la surface de manière uniforme, en la faisant osciller par un mouvement de va-et-vient après avoir déposé le gel. Placer rapidement le portoir de peignes en respectant le code des couleurs. Laisser refroidir 15 minutes.
- Retirer le portoir de peignes tout en maintenant la plate-forme.
- Transférer chaque réaction PCR (10 µl) sur le gel d'agarose à 2,5 %, déjà préparé (l'utilisation d'un Pipetman® à 8 ou 12 multicanaux ou du Transfer Device 96 puits est conseillé).

Remarque : S'assurer du bon ordre de transfert des échantillons, en orientant la plaque avec le puits contrôle négatif en haut à gauche. Suivant la feuille de travail, l'ordre des échantillons est de gauche à droite, et de haut en bas. Il n'est pas nécessaire d'ajouter du colorant pour l'électrophorèse.

- Faire migrer les échantillons à 140–150 Volts jusqu'à ce que le front de migration atteigne 0,5 cm (environ 3–5 minutes, selon l'agarose utilisé).
- Photographier le gel sur un transilluminateur UV.
- Interpréter les résultats en utilisant la fiche de travail fournie avec les plaques ou à l'aide du logiciel HLA, disponible chez One Lambda, Inc.

Remarque : Lorsque les plaques de typage ADN One Lambda ne remplissent que quelques rangées sur le gel, il est possible de déposer plusieurs échantillons sur le même gel, en veillant à bien noter leur emplacement

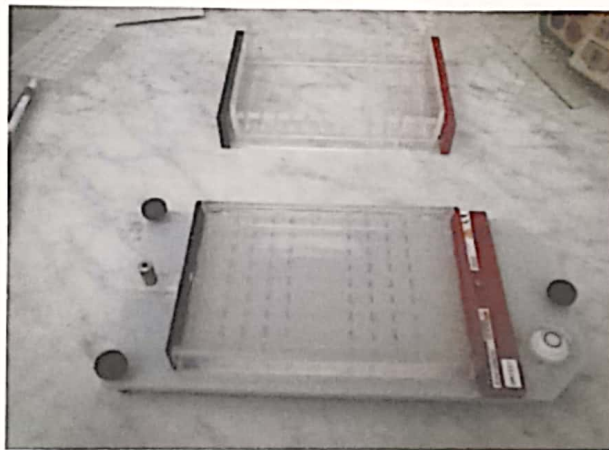
Annexe 11 : Appareillages



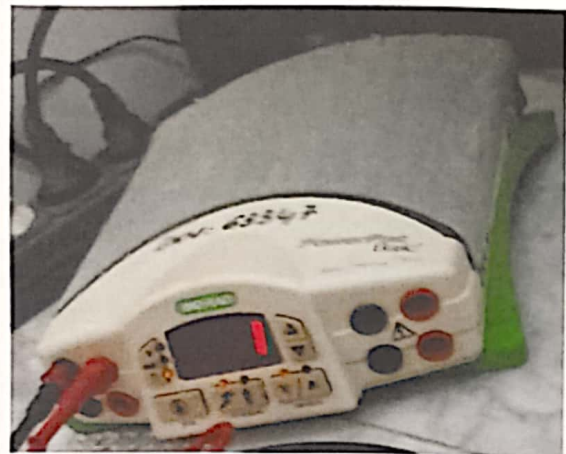
Thermocycleur



Microcentrifugeuse



Chambre de migration



Générateur



Thermoblock



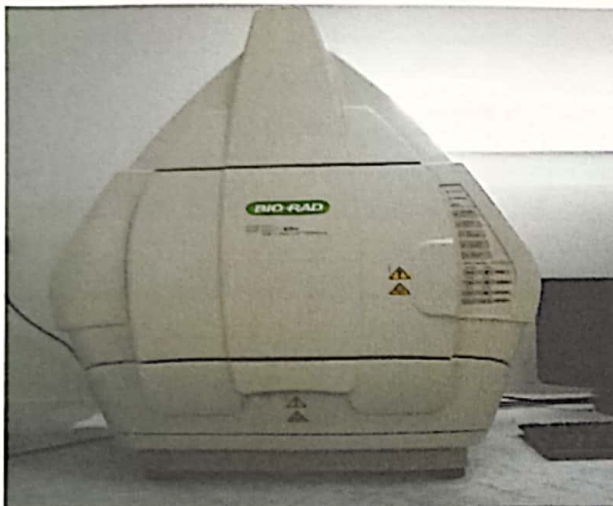
Agitateur Vortex



Laser néphélémètre



BioRobot EZ1



GelDoc



Lecteur ELISA



Microscope à fluorescence

Annexe 12 : Tableau de quelques résultats

Patients	Sexe	Service	VS1	VS2	Hb	CRP	FR	ACCP
1	F	Externe	5	21	12,7	N	N	2
2	F	Hospitalisée	27	56	9,2	96	N	175
3	F	Externe	48	74	11,7	24	128	40
4	H	Externe	39	90	12,7	48	512	1063
5	F	Externe	115	133	9,2	24	N	617
6	H	Hospitalisé	133	147	6,3	48	2048	424
7	F	Externe	16	40	10,4	N	8	76
8	H	Hospitalisé	70	126	9,4	96	512	69
9	F	Externe	41	81	9,3	N	N	4
10	F	Hospitalisée	7	17	11,4	48	8	808
11	H	Hospitalisé	6	20	13,8	6	1024	489
12	H	Hospitalisé	19	48	9,2	12	8	2
13	F	Externe	9	14	13,3	48	128	17
14	H	Externe	10	31	13,3	12	1024	50
15	H	Hospitalisé	15	26	13	12	128	27

Résumé

Objectif :

La polyarthrite rhumatoïde est un rhumatisme inflammatoire chronique de la membrane synoviale. C'est une maladie multifactorielle à conséquence auto-immune, touchant environ 0.5 à 1 % de la population générale, particulièrement la femme d'âge moyen entre 35 et 55 ans.

Notre étude a pour but de rechercher d'une part une éventuelle association entre les molécules HLA classe II et la susceptibilité à la PR, et d'une autre part, la relation entre la présence du Shared épitope HLA-DRB1 et la sévérité de la PR

Patients et méthodes :

Les allèles HLA-DRB1 ont été déterminés chez 40 patients atteints de PR et chez 90 sujets témoins, à l'aide d'une méthode de biologie moléculaire utilisant des amorces spécifiques d'allèles ou de groupe d'allèles (PCR-SSP).

Résultats :

Les fréquences respectives des allèles HLA-DRB1*04 et *01 étaient significativement plus élevées chez nos patients par rapport aux témoins ($p < 0,005$; $p < 0.01$).

Chez nos patients, on note une augmentation significative des allèles HLA-DRB1 contenant l'épitope partagé et une nette prédominance d'« homozygotes » ($p < 0.005$) ce qui est associé au développement de formes sévères de la maladie.

Nous n'avons pas trouvé une association entre la présence de l'épitope partagé et la production des auto-anticorps.

Conclusion :

L'étude génétique pourrait jouer un rôle important dans la détermination précoce de la sévérité de la PR et donc sa prise en charge thérapeutique.

Actuellement, la recherche des allèles du SE ne constitue, en aucun cas, un test génétique de la PR à l'échelon individuel.

Les mots clés : Polyarthrite Rhumatoïde; auto-immune; HLA.

- Mazouz Meriem
- mimi.maz@live.fr

- Meguellati Sarah
- sweetsara14@live.fr

Résumé :

La polyarthrite rhumatoïde est un rhumatisme inflammatoire chronique de la membrane synoviale. C'est une maladie multifactorielle à conséquence auto-immune, touchant environ 0.5 à 1 % de la population générale, particulièrement la femme d'âge moyen entre 35 et 55 ans.

Notre étude a pour but de rechercher d'une part une éventuelle association entre les molécules HLA classe II et la susceptibilité à la PR, et d'une autre part, la relation entre la présence du Shared épitope HLA-DRB1 et la sévérité de la PR.

Nos résultats montrent que les allèles du SE (HLA-DRB1*04 et HLA-DRB1*01) sont plus représentés chez les malades atteints de PR par rapport au témoin. Par ailleurs on n'a pas trouvé une corrélation entre les allèles HLA-DRB1*SE+ et la production d'auto-anticorps (ACCP et FR).

L'étude génétique pourrait jouer un rôle important dans la détermination précoce de la sévérité de la PR et donc sa prise en charge thérapeutique.

Actuellement, la recherche des allèles du SE ne constitue, en aucun cas, un test génétique de la PR à l'échelon individuel.

Mots clés : polyarthrite rhumatoïde, auto-immune, HLA.

Abstract:

The rheumatoid arthritis is inflammatory chronic rheumatism of the synovial membrane. It is a multifactorial disease with multiple manifestations auto-immune consequences, affecting approximately 0.5 to 1% of the general population, particularly, the middle-age woman between 35 and 55 years.

In this present study, focused looking for eventual association between class II molecules HLA and the susceptibility in RA, and of one somewhere else, the relation between the presence of shared épitope HLA-DRB1 and the severity of RA.

Our results show that alleles of HLA-DRB1*04 and HLA-DRB1*01 are more represented at the sick affected by RA compared with the witness. Besides we did not find a correlation between alleles HLA-DRB1*SE+ and the production of auto-antibodies (ACCP and FR).

Genetic factors of RA allow taking a decisive turn in research to clarify their contribution in the multifactorial determinism of the disease, to lead to a definitive treatment and target the ultimate goal of preventing the disease.

Keywords: Rheumatoid arthritis; auto-immune; HLA.