

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA



FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRE ET BIOLOGIQUE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master

Option: Biosignalisations Cellulaires et Moléculaires/ Immunologie

THÈME

*Association des allèles HLA de classe II : DR et DQ, dans
la polyarthrite rhumatoïde*



Réalisé par : Lamia HAMANI

Soutenu publiquement le 01/07/2013 devant le jury composé de :

Présidente : Dr Z. DJAZOULI, maître de conférences B, FSAVB-USDB

Promoteur : Dr Y. MEDDOUR, maître assistant en immunologie, HCA

Co-promoteur : Mr A. GUEDIOURA, maître assistant A, FSAVB-USDB

Examinatrice : Mme R. EL FERTAS, maître assistante B, FSAVB-USDB

Examinatrice : Mme , EDDAÏKRA, maître assistante B, FSAVB-USDB

Promotion 2012/2013

Remerciements

Tout d'abord, je remercie ALLAH le tout puissant.

C'est avec mon enthousiasme le plus vif et le plus sincère que je voudrais rendre mérite à tous ceux qui m'ont soutenu et ont contribué à mener à bien mon projet de fin d'études.

Qu'ils veuillent bien trouver à travers ce manuscrit, l'expression de ma plus profonde et respectueuse reconnaissance.

Je tiens à remercier mon promoteur DR. MEDDOUR, le chef d'unité d'histocompatibilité et d'immunologie cellulaire au service d'immunologie de l'Hôpital Central de l'Armée (HCA), qui m'a permis de bénéficier de son encadrement. Sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire, ses précieux conseils et ses bonnes explications m'ont éclairé le chemin de la recherche et m'ont servi à l'accomplissement de ce travail.

Je voudrais également exprimer mes sincères remerciements à mon co-promoteur, Mr GUEDIOURA pour sa disponibilité, pour son aide compétente qu'il m'a généreusement apporté.

Je remercie Mme DJAZOULI de m'avoir témoigné de sa confiance en acceptant de présider la commission d'examen.

Mes remerciements vont également aux membres du jury Mme EL FERTAS et Mme CHAKHMA d'accepter d'examiner mon modeste travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Je remercie le personnel des services d'immunologie et de rhumatologie à l'HCA, qui m'ont impressionné par leur générosité, le plaisir visible qu'ils avaient à partager leurs connaissances et leur ouverture d'esprit.

J'exprimer mes vifs remerciements au Professeur CHAIB, chef de service d'immunologie à l'HCA, de m'avoir accueilli à bras ouverts au sein de son service.

Je tiens à remercier chaleureusement Dr. KRAÏBA, grâce à sa gentillesse et générosité, grâce à son aide et son orientation, j'ai pu effectuer ce travail.

Enfin, je remercie mes collègues, avec qui j'ai partagé le plaisir d'apprendre. Merci pour le sourire, l'aide et la gentillesse, Sabrina, Milissa, Mina, Bochra et tous les autres...

MERCI..

Résumé :

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune caractérisée par une inflammation chronique de plusieurs articulations, responsable de leur destruction. Ce rhumatisme fait intervenir plusieurs facteurs à la fois, notamment les gènes codant pour les antigènes leucocytaires humains (HLA).

Nous avons étudié par la technique du typage moléculaire (amplification en chaîne par polymérase), le polymorphisme des gènes HLA de classe II chez 26 patients algériens adultes atteints de la polyarthrite rhumatoïde. L'objectif de cette recherche est de déterminer les allèles associés à la maladie en analysant les fréquences des allèles DRB1 et DQB1, ainsi que leur éventuelle corrélation avec l'expression clinique, radiologique et biologique de la polyarthrite rhumatoïde.

L'ensemble des patients a bénéficié des bilans clinique rhumatologique, radiologique et d'un bilan biologique, qui a permis d'évaluer les différents paramètres hématologiques et immunologiques.

Nos résultats confirment ceux d'autres études faites sur différentes ethnies, à savoir que l'allèle HLADR4 est un important marqueur de susceptibilité génétique à la polyarthrite rhumatoïde, et est associé à sa sévère évolution.

Confirmer ces résultats sur une cohorte plus large afin de déterminer un facteur pronostique de nature génétique ayant l'avantage d'être déterminable au début de la maladie, serait idéal à pouvoir prévenir et traiter les patients à risque de développer une forme sévère et/ou érosive de PR.

Mots clés : polyarthrite rhumatoïde, HLA.

Abstract :

Rheumatoid arthritis is an auto-immune disease which is characterized by a chronic inflammation of several joints, also it's responsible of their destruction. This Rheumatoid involves several factors at the same time, including the encoding genes for the human leukocyte antigen (HLA).

We have studied the gene polymorphism of human MHC class II by molecular typing technique (polymerase chain reaction) in 26 adult Algerian patients who are attacked by Rheumatoid arthritis. The objective of this research is to determine the alleles which are associated with the disease, by analyzing the alleles frequencies (allele DRB1 and DQB1), also their possible correlation with the clinical, radiological and biological expression of the Rheumatoid arthritis.

All patients benefited from a clinical, radiological assessment of rheumatological disease, also a biological assessment which allowed to evaluate the several serological and immunological parameters.

Our results confirm those obtained by another studies on different ethnicities, that is the allele HLADR4 is an important marker of genetic susceptibility to the Rheumatoid arthritis, and it's associated with its severe course.

Confirm these results in a larger cohort to determine a genetic prognostic factor with the advantage of being determined at the onset of the disease, would be ideal to be able to prevent and treat patients at risk of developing a severe and / or erosive RA.

Keyword : rheumatoid arthritis, HLA.

ملخص :

التهاب المفاصل الروماتويدي هو أحد أمراض المناعة الذاتية و الذي يتميز بالتهاب الهزم من العديد من المفاصل كما أنه مسؤول عن تأكلها، هذا المرض قد ينتج عن اجتماع عدة عوامل في نفس الوقت، متضمن بذلك جينات الترميز لمستضد الكريات البيضاء البشرية (HLA). لقد درسنا تعدد الأشكال الجيني البشري للصفة الثاني من معقد التوافق النسيجي (II CMH) بتقنية الترميز الجزيئي أي تفاعل البلمرة المتسلسل، على 26 مريض جزائري بالغ مصاب بالتهاب المفاصل الروماتويدي.

الهدف من هذا البحث هو تحديد الأليلات المرتبطة بهذا المرض، عن طريق تحليل و تحديد الأليلات المتكررة (الأليلات DRB1 و DQB1)، و كذا علاقتها المحتملة مع الأعراض السريرية، الإشعاعية و البيولوجية لالتهاب المفاصل الروماتويدي . قد اسبقنا كل المرضى من كشف سريري، شعاعي و أيضاً من تحليل بيولوجي الذي سمح بتقييم مختلف العوامل المناعية و المصلية.

نتائجنا تؤكد اخرى سابقة تم الحصول عليها في دراسات على اعراق مختلفة و مفادها أن الأليل HLADR4 عامل جيني مهم لإلتهاب المفاصل الروماتويدي، و هو مرتبط أيضاً مع تطوره الحاد.

تأكيد ما توصلنا اليه من نتائج عن طريق توسيع نطاق البحث ، بهدف التوصل الى تحديد عامل جيني يساعد على التشخيص المبكر للمرض تفادياً للأعراض او التعقيدات التي تنجم عن عدم تلقي العلاج في مرحلة مبكرة قد يكون مثاليا للحد من معاناة المرضى .

الكلمات المفتاحية : إلتهاب المفاصل الروماتويدي , HLA .

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
I. Description de la polyarthrite rhumatoïde.....	2
A. Définition de la polyarthrite rhumatoïde.....	2
B. Épidémiologie de la polyarthrite rhumatoïde.....	2
C. Critères diagnostiques de la polyarthrite rhumatoïde.....	2
1. Critères diagnostiques cliniques.....	2
a. Phase de début.....	2
b. Phase d'état.....	3
2. Critères diagnostiques biologiques.....	5
a. Phase de début.....	5
b. Phase d'état.....	5
D. Classification de la polyarthrite rhumatoïde selon le phénotype clinico-biologique.....	6
II. Physiopathologie.....	9
A. Phase d'initiation.....	9
B. Phase de recrutement et inflammation.....	9
C. Rôle des cytokines.....	10
D. Rôle des lymphocytes B.....	10
E. Rôle des polynucléaires neutrophiles.....	11
F. Angiogenèse – formation de Pannus –	11
G. Phase de réparation.....	11
III. Gènes de prédisposition.....	13
A. Gènes du système HLA.....	13
B. Autres gènes que le HLA.....	14
IV. MATERIEL ET METHODES	15
A. Matériel.....	15
B. Méthodes.....	15
1. Techniques sérologiques.....	16
a. Dosage du facteur rhumatoïde	16
b. Dosage des anticorps anti-peptides citrullinés cycliques.....	17
2. Technique du typage moléculaire.....	19
a. Extraction d'ADN.....	19
b. La PCR-SSP.....	20

c. Révélation des produits d'amplification par électrophorèse sure gel d'Agarose.....	23
d. Outils et testes statiques.....	24
V. RESULTATS.....	26
A. Description de la cohorte	26
B. Résultats de l'étude sérologique.....	26
1. Valeurs diagnostiques du FR et anti-CCP2.....	26
2. Corrélation des résultats du dosage des FR et anti-CCP2 avec l'activité de la PR.....	27
3. Corrélation entre les résultats du dosage des FR et anti-CCP2 et la sévérité de la PR.....	28
a. Résultats du typage allélique.....	29
VI. DISCUSSION	33
A. Stratification selon les critères de l'ACR.....	33
1. Le facteur rhumatoïde.....	33
2. Les anti-CCP.....	33
3. Association FR/anti-CCP.....	33
B. Stratification selon le polymorphisme HLA	33
C. Corrélation entre le polymorphisme HLA DR/QD et les différents phynotypes clinico-biologique de la PR	35
VII. CONCLUSION.....	36
VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
IX. ANNEXES	

LES DES ABREVIATIONS

ACR : American College of Rheumatology
ADN : Acide Désoxyribonucléique
Anti-CCP : anti-cyclic citrullinated peptide
BET : Bromure d'éthidium
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DAS28 : Disease Activity Score 28
EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique
EULAR : Annual European Congress of Rheumatology
FR : Facteur Rhumatoïde
HCA : Hôpital Central de l'Armée
HLA : human leukocyte antigen
MAI : Maladie Auto-Immune
OR : Odds Ratio
Pc : Probabilité corrigée
PCR-SSP : Polymerase Chain Reaction-Specific Sequence Primers
PR : Polyarthrite Rhumatoïde
SE : Shared Epitope
TAE : Tris, Acétate, EDTA
TMB : Tétraméthylbenzidine
UV : Ultra-violet

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Atteinte articulaire de la main dans la PR débutante	3
Figure 2 : Atteinte articulaire de la main dans la PR en phase d'état	4
Figure 3 : Représentation schématique d'une articulation saine et rhumatoïde.....	9
Figure 4 : La néoangiogenèse au cours du développement de la PR.....	11
Figure 5 : Les différentes phases de la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde.....	12
Figure 6 : Modèle tridimensionnel des molécules HLA-DR, HLA-B et HLA-DP.....	13
Figure 7 : Le test de latex.....	16
Figure 8 : Le test de Waaler Rose.....	17
Figure 9 : Schéma de la réaction PCR.....	21
Figure 10 : Plaques d'amplification.....	22
Figure 11 : Thermocycleur	22
Figure 12 : Programme d'amplification	22
Figure 13 : Distribution des résultats des FR/anti-CCP2 selon la sévérité de la PR.....	28
Figure 14 : Distribution des résultats des FR/anti-CCP2 selon la forme radiologique de la PR.....	29
Figure 15 : Fréquences des allèles HLA DRB1 chez les patients PR et les témoins.....	30

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : critères de l'American College of Rheumatology 1987 pour la classification de la polyarthrite rhumatoïde.....	7
Tableau 2 : nouveaux critères ACR/EULAR de la polyarthrite (2010)	8
Tableau 3 : caractéristiques générales de la population malade et témoins.....	15
Tableau 4 : résultats des examens biologiques et caractéristiques diagnostiques des patients PR.....	26
Tableau 5 : répartition des patients PR en groupes sérologiques FR/anti-CCP2.....	27
Tableau 6 : répartition des résultats de FR/anti-CCP2 selon la sévérité de la PR.....	27
Tableau 7 : répartition des résultats de FR/anti-CCP2 selon la forme radiologique de la PR.....	28
Tableau 8 : résultats de l'analyse allélique des allèles HLA DRB1/DQB1 chez les patients et les témoins	30
Tableau 9 : résultats de l'analyse allélique des allèles HLA DRB1 chez les patients PR selon les critères de l'ACR.....	31
Tableau 10 : résultats de l'analyse allélique des allèles HLA DQB1 les patients PR selon les critères de l'ACR.....	32
Tableau 11 : résultats des différentes études d'association du polymorphisme d'HLA DRB1*04 avec la PR chez différentes ethnies.....	34
Tableau 12 : Evaluation de l'activité de la PR selon le DAS28.....	Annexe 1
Tableau 13 : Résultats du contrôle de la qualité et de la quantité de l'ADN.....	Annexe 2

Introduction générale:

Les maladies auto-immunes (MAI) résultent d'un dysfonctionnement du système immunitaire qui s'attaque aux constituants normaux de l'organisme ou « auto-antigènes » [Benveniste *et al.*, 2011]. Elles touchent de 5 à 10% de la population dans le monde et représentent aujourd'hui la troisième cause de morbidité après les affections cardio-vasculaires et les cancers [Schwalfenberg, 2012].

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune systémique. Cette affection qui touche jusqu'à 1% de la population mondiale est multifactorielle, d'étiologie inconnue et dont les mécanismes physiopathologiques ne sont pas totalement élucidés [Van der Helm-van Mil *et al.*, 2013]. Des facteurs génétiques, environnementaux et hormonaux ont été impliqués dans la prédisposition à la maladie [Karray *et al.*, 2011]. Parmi les facteurs génétiques, les gènes codant pour les antigènes leucocytaires humains (HLA) ont été incriminés dans un tiers à un demi des cas de PR [Atouf *et al.*, 2008].

L'association génétique entre des gènes localisés dans la région HLA et la susceptibilité à la PR a été suspectée dès 1976 par Stasny [Stasny, 1976]. Par la suite, l'existence d'une association entre les gènes de la région HLA-DR codant pour les antigènes DR4 et DR1 a été mise en évidence [Stasny, 1978 et 1976]. En 1987, alors que les techniques de biologie moléculaire ont permis de séquencer le locus HLADRB1, Gregersen avance l'hypothèse de l'épitope partagé ou « *shared epitope* » (SE), comme explication à l'association constatée entre la région de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et la susceptibilité à la PR [Gregersen, 1987]. Cet auteur explique que les allèles intervenant dans la susceptibilité à la PR coderaient pour une séquence d'acides aminés commune, située en position 70-74 de la 3^{ème} région hypervariable de la chaîne bêta des molécules HLA.

Plusieurs études ont exploré l'association du système HLA à la PR dans différentes ethnies. Néanmoins, peu sont effectuées au Maghreb : en Tunisie [Siala *et al.*, 2007], au Maroc [Atouf *et al.*, 2008] et plus particulièrement en Algérie [Acheli *et al.*, 2010 et 2008] où l'incidence de la PR n'a pas encore été clairement établie.

Cependant, cette maladie a de lourdes répercussions sur la vie du patient, notamment sur son activité socioprofessionnelle ainsi que sur sa situation économique. D'où l'importance du diagnostic précoce et du traitement immédiat.

Les recherches de ce présent mémoire ont pour objet d'étudier le polymorphisme des allèles HLA de classe II : HLA DRB1, DQB1, chez une population algérienne atteinte de PR. Le but étant de mettre en évidence les principaux allèles de susceptibilité génétique impliqués dans le déterminisme de la polyarthrite rhumatoïde dans notre population, ainsi que leur influence sur les différentes formes clinico-biologiques de la maladie.

I. Description de la polyarthrite rhumatoïde

A. Définition de la polyarthrite rhumatoïde :

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire chronique qui attaque principalement les articulations synoviales, entraînant des lésions articulaires, incapacité physique et de mortalité prématurée [Alamanos *et al.*, 2006]. Elle touche de manière bilatérale et symétrique les 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.

B. Épidémiologie de la polyarthrite rhumatoïde :

C'est le rhumatisme inflammatoire et auto-immun le plus fréquent. Sa prévalence est estimée entre 0.5 à 1% de la population mondiale [Aletaha *et al.*, 2010]. Elle varie en fonction de l'origine ethnique.

L'incidence de la PR varie selon les population. En Amérique du nord et au nord de l'Europe varie entre 20 à 50 cas par 100000 habitants. Au sud de l'Europe, une faible incidence est rapportée, variant de 9 à 24 cas pour 100000 habitants.

La prévalence et l'incidence de la PR dans les pays en voie de développement est inconnue. [Tobon GJ *et al.*, 2009]

C. Critères diagnostiques de la polyarthrite rhumatoïde :

1. Critères diagnostiques clinique :

a. Phase de début :

Le début est progressif, insidieux : c'est la période des hésitations diagnostiques. Il est cependant très important de porter le diagnostic dès cette période car le traitement précoce est seul à limiter les risques de détérioration articulaire définitive. C'est surtout la clinique et la biologie qui permettent l'orientation, la radiologie étant souvent sans particularité à ce stade. (Figure 1)

a.1. Signes articulaires aux mains :

L'atteinte des mains inaugure les signes articulaires :

- Douleur et enraidissement matinal des poignets et des doigts constituent les signes fonctionnels d'appel.
- Une tuméfaction (gonflement en fuseau des interphalangiennes) est notée dès l'inspection.
- Une douleur à la pression à la mobilisation des doigts qui est limitée. [Mayer, 2011]

ÉVOLUTION DE LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE DE LA MAIN

P.R. modérée

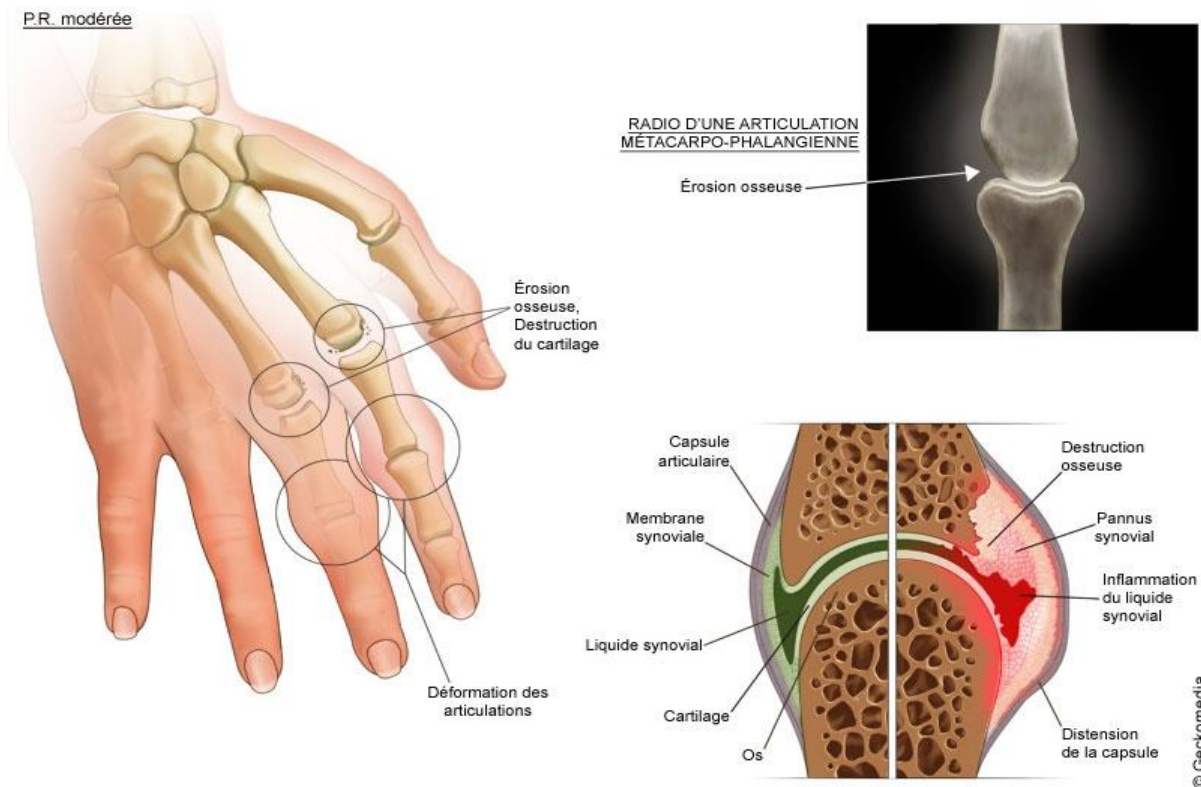


Figure 1 : atteinte articulaire de la main dans la PR débutante [Anatomy charts , 2013].

a.2. Autres atteintes articulaires :

L'atteinte des mains et des poignets s'associe souvent à des arthrites des avant-pieds.

b. Phase d'état :

C'est le stade où coexiste des signes inflammatoires et des déformations articulaires (observées dans plus de 70% des cas). C'est aussi le stade où peuvent apparaître les signes extra-articulaires. Les déformations articulaires sont caractéristiques durant cette phase [Mayer, 2011] . (Figure 2)

b.1. Signes articulaires aux mains :

Les signes articulaires prédominent encore aux mains :

- Les gonflements touchent poignets et doigts.

- Ils sont toujours grossièrement symétriques.
- Ils s'accompagnent d'un enraidissement douloureux maximal au réveil.
- Les destructions articulaires aboutissent à des déformations caractéristiques :
 - De profil, la main rhumatoïde prend un aspect en dos de chameau.
 - Les doigts sont déviés vers le bord cubital de la main, classique " coup de vent " initialement réductible.

ÉVOLUTION DE LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE DE LA MAIN

P.R. sévère

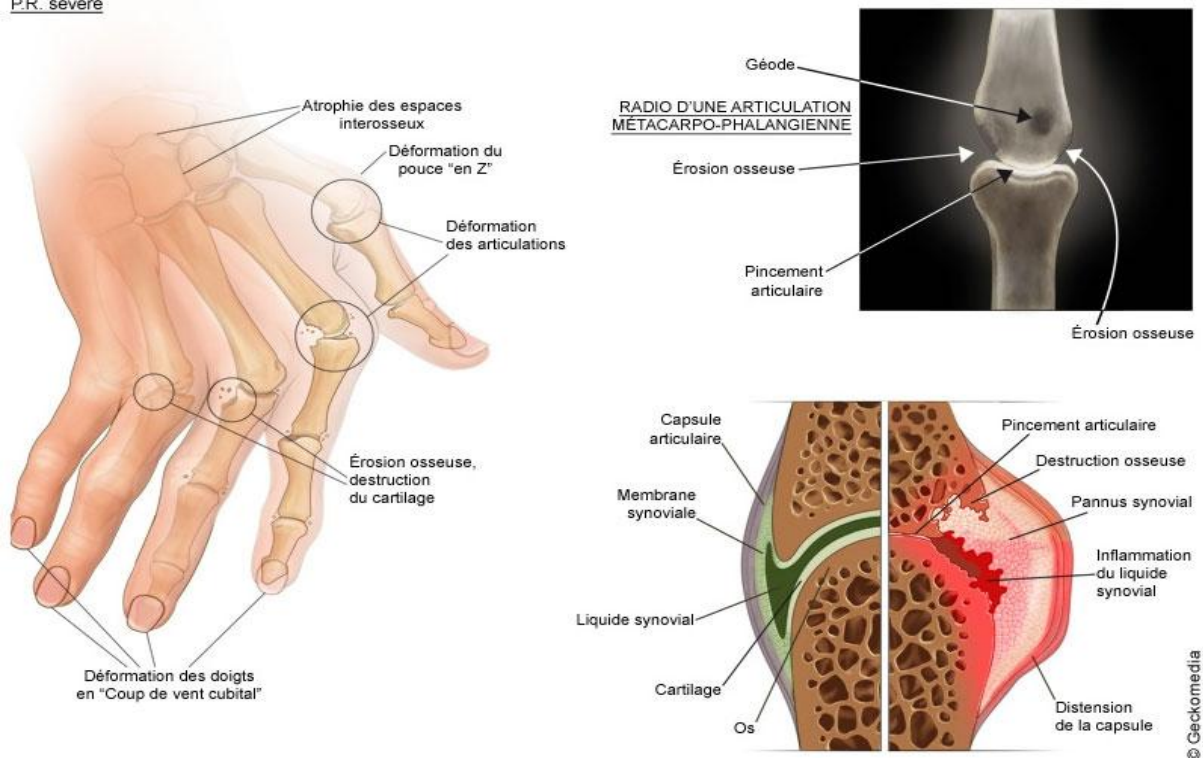


Figure 2 : atteinte articulaire de la main dans la PR en phase d'état [Anatomy charts, 2013]

b.2. Autres atteintes articulaires :

Pieds : les atteintes sont volontiers associées à celles de la main :
Elles touchent les métatarsophalangiennes qui sont tuméfiées, douloureuses.

Grosses articulations des membres : elles ne sont pas épargnées. Leur atteinte garde souvent un caractère de symétrie. Elle se traduit par un gonflement douloureux spontanément et à la mobilisation, aboutissant à une limitation de l'amplitude articulaire. Ainsi sont habituellement touchés: les genoux, les coudes, les épaules. La hanche est rarement atteinte.

Petites articulations : leur atteinte est beaucoup plus rare.

Rachis cervical : l'atteinte de la charnière cervico-occipitale représente la principale localisation rachidienne de la PR. Elle est fréquemment le siège de douleurs inflammatoires. [Mayer, 2011].

b.3. Atteintes extra-articulaires :

Les manifestations extra-articulaires de la polyarthrite rhumatoïde traduisent le caractère systémique de la maladie rhumatoïde. Elles rassemblent entre autre :

- Nodules rhumatoïdes
- Adénopathies
- Vascularite rhumatoïde
- Syndrome sec
- Atteinte rénale
- Atteinte pulmonaire
- Atteinte oculaire
- Atteinte cardiaque

2. Critères diagnostiques biologique :

a. Phase de début :

Syndrome inflammatoire :

Certains signes témoignent du caractère inflammatoire de l'atteinte articulaire :

- La vitesse de sédimentation (VS) est augmentée.
- L'hémogramme est peu modifié : discrète anémie (11 à 12 g d'hémoglobine/dl).
- Présence de protéine C réactive.

Facteur rhumatoïde (FR) :

Le FR est un anticorps anti-gammaglobulinique qui appartient le plus souvent à la classe des IgM, dirigé contre les immunoglobulines G humaines ou animales. Les méthodes sérologiques classiques de détection des FR (latex et WAALER Rose) ne mettent pratiquement en évidence que les FR de type IgM qui sont seuls agglutinants. La détection du FR se fait actuellement plutôt par ELISA et par néphélométrie laser. Le FR est un marqueur utile au diagnostic, mais sa présence n'est retrouvée que dans 80% des cas de PR diagnostiquées (à la phase d'état) [Nielen, 2004] .

Anticorps anti-cyclic citrullinated peptide (Anti-CCP) :

Les anti-CCP ou ACPA (Anticorps antiprotéines citrullinées) sont présents chez 90 % des polyarthrites avec FR et 15 % des polyarthrites sans FR. On les détecte par ELISA à partir de peptides riches en citrulline (acide aminé résultant de la déimination de l'arginine). Les anti-CCP sont très spécifiques de la PR et restent les marqueurs sérologiques les plus utilisés pour diagnostiquer la maladie. [Cader, 2010] .

b. Phase d'état :

Signes inflammatoires :

Selon l'évolutivité de l'atteinte rhumatismale, les signes biologiques d'inflammation sont plus ou moins accentués: VS, hypergammaglobulinémie, présence de protéine C réactive. [Mayer, 2011] .

Facteurs rhumatoïdes et anticorps anti-peptides citrullinés :

Les recherches de FR par les réactions d'agglutination du latex ou d'hémagglutination de Waaler-Rose sont habituellement positives. Ces réactions ne sont pas spécifiques de la maladie rhumatoïde et un résultat positif doit être interprété en fonction du contexte clinique. Les anticorps anti-CCP sont spécifiques de la PR (98% de spécificité) et présents chez 85% des PR avérées. L'association des deux auto-anticorps est quasi pathognomonique de la maladie.

Autres anticorps :

D'autres anticorps sont plus rarement rencontrés: anticorps antinucléaires surtout (à taux faible).[Mayer, 2011]

D. Classification de la polyarthrite rhumatoïde selon le phénotype clinicobiologique :

L'Association des Rhumatologues Américains (ACR) a proposé en 1987 une série de critères pour la classification de la polyarthrite rhumatoïde (**tableau 1**).

Tableau 1 : Critères de l'ACR 1987 pour la classification de la polyarthrite rhumatoïde*
[American College of Rheumatology, 1987].

*Au moins 4 des 7 critères sont exigés.

Les critères 1 à 4 doivent être présents depuis au moins 6 semaines.

1. Raideur articulaire matinale	Raideur matinale articulaire ou périarticulaire, durant au moins une heure.
2. Arthrite d'au moins 3 groupes articulaires	Gonflement des tissus mous ou épanchement d'au moins 3 groupes articulaires touchés simultanément, observés par un médecin. Les 14 groupes possibles sont, à droite ou à gauche, les IPP (interphalangiennes proximales), les MCP (métacarpo-phalangiennes), les poignets, les coudes, les genoux, les chevilles et les MTP (métatarso-phalangiennes).
3. Arthrite des articulations des mains	Gonflement d'au moins un groupe articulaire parmi poignets, IPP ou MCP.
4. Arthrite symétrique	Atteinte simultanée des mêmes groupes articulaires (voir définition en 2) des deux côtés du corps (l'atteinte bilatérale des IPP, des MCP, ou des MTP est acceptable sans symétrie absolue).
5. Nodules rhumatoïdes	Nodules sous-cutanés, sur les proéminences osseuses, les surfaces d'extension, ou dans les régions para-articulaires, observés par un médecin.
6. Facteur rhumatoïde sérique	Mise en évidence de quantités anormales de facteur rhumatoïde sérique par une méthode dont les résultats sont positifs chez moins de 5 % des sujets témoins normaux.
7. Modifications radiologiques	Modifications radiologiques typiques de PR sur les radiographies de face des mains et des poignets, avec obligatoirement des érosions ou une décalcification osseuse évidente localisée des articulations atteintes ou de façon plus nette dans les régions adjacentes à ces articulations (des modifications d'allure seulement arthrosique ne conviennent pas).

Plus récemment des critères ACR/EULAR ont été proposés pour la classification et le diagnostic de polyarthrite nécessitant un traitement de fond par le méthotrexate, ce qui peut être assimilé aux polyarthrites rhumatoïdes. Ces critères s'appliquent aux formes sans érosion osseuse aux radiographies (**tableau II**).

Tableau 2 : Nouveaux critères ACR/EULAR de la polyarthrite rhumatoïde (2010)
[American College of Rheumatology, 2010].

Atteinte articulaire (0-5)	
1 grosse articulation	0
2–10 grosses articulations	1
1–3 petites articulations (grosses articulations non comptées)	2
4–10 petites articulations (grosses articulations non comptées)	3
> 10 articulations (au moins 1 petite articulation)	4
Sérologie (0-3)	
FR négatif et anti-CCP négatif	0
FR faiblement positif (1 à 3 × normale) ou anti-CCP faiblement positif (1 à 3 × normale)	2
FR fortement positif (> 3 × normale) ou anti-CCP fortement positif (> 3 × normale)	3
Durée des symptômes (0-1)	
< 6 semaines	0
≥ 6 semaines	1
Biologie inflammatoire (0-1)	
CRP normale et VS normale	0
CRP anormale ou VS anormale	1

Un score supérieur à 6 permet de classer le patient comme PR.

II. Physiopathologie :

La synovite inflammatoire est la lésion élémentaire responsable de la destruction articulaire. Elle est liée à des anomalies de l'immunité à médiation cellulaire, avec activation des lymphocytes T. Plusieurs phases caractérisent l'évolution de la synovite rhumatoïde : initiation, recrutement cellulaire et inflammation, prolifération synoviale, destruction de l'articulation et réparation Olsson LM, [Nerstedt A, *et al.*, 2012]. Elles peuvent être individualisées de manière schématique, mais sont en réalité très intriquées. [Berglin E, Kokkonen H *et al.*, 2010]

A. Phase d'initiation :

Le mécanisme de déclenchement du processus pathologique reste inconnu. Le premier événement 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'IL-1, le TNF α et l'IL-6 [Lebba, Di Sora *et al.*, 2011]. Les peptides antigéniques qui déclencheraient spécifiquement la polyarthrite rhumatoïde demeurent inconnus. On tend actuellement à incriminer des autoantigènes situés dans l'articulation (collagène de type II, protéoglycanes, protéines de la matrice) ainsi que des peptides d'origine exogène, issus de bactéries ou de virus [Jawaheer, 2002].

B. Phase de recrutement et inflammation :

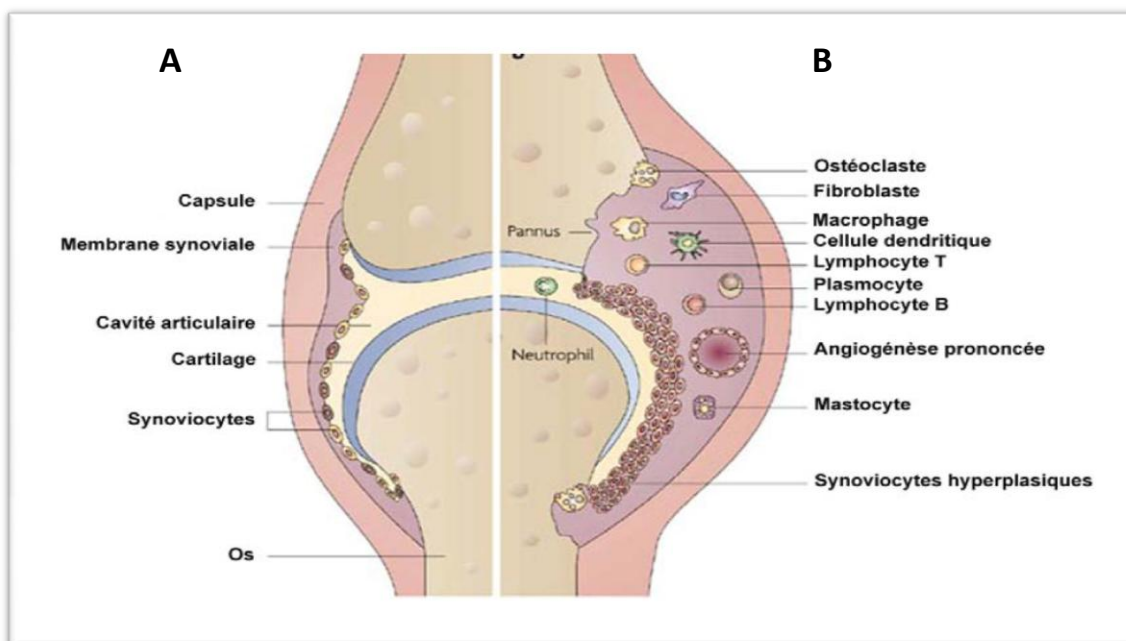


Figure 3 : Représentation schématique d'une articulation saine (a) et rhumatoïde (b) [Strand, 2007].

Le processus inflammatoire est initié par les macrophages. Ceux-ci contribuent ensuite au recrutement non spécifique des lymphocytes T et polynucléaires sanguins, grâce au chimiotactisme des cytokines et à l'augmentation, par le TNF α , de l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales [Cheng C, Sytwu H *et al.*, 2011] . Les macrophages interagissent in situ avec les lymphocytes T en leur présentant des peptides antigéniques associés aux molécules du CMH. Cette activation est ensuite amplifiée par les lymphocytes T CD4+, responsables d'activations cellulaires en cascade, de la production accrue de cytokines et de molécules effectrices, amplifiant l'inflammation locale et provoquant des destructions tissulaires [Shotorbani, 2011] .

C. Rôle des cytokines :

Les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle pathogénique clé sur les processus d'inflammation, de prolifération synoviale et de destruction du cartilage. Il existe dans l'articulation rhumatoïde un déséquilibre entre les cytokines à action pro-inflammatoire, comme le TNF α , l'IL-1 et l'IL-6, présentes en excès, et les cytokines à action anti-inflammatoire, représentées par l'IL-10, l'IL-4, l'IL-13, les récepteurs solubles du TNF α et l'antagoniste du récepteur de l'interleukine 1 (IL-1RA), qui sont présents en quantité insuffisante et ne peuvent bloquer l'action des premières. Des cytokines favorisant l'angiogenèse et la prolifération cellulaire sont également présentes dans la membrane synoviale : TGF β (Transforming Growth Factor β), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) et FGF-1 et 2 (Fibroblast Growth Factors 1 and 2). Cette angiogénèse est indispensable au recrutement des lymphocytes, macrophages et polynucléaires neutrophiles sanguins [Quirke AM, Fisher BA, *et al.*, 2011] . Ces cytokines et leurs récepteurs sont des cibles thérapeutiques particulièrement importantes [Snir O, Rieck M *et al.*, 2011].

D. Rôle des lymphocytes B :

Des lymphocytes B sont activés localement par les lymphocytes T CD4+. Ils se multiplient et se différencient en plasmocytes qui produisent des immunoglobulines polyclonales et du facteur rhumatoïde (FR). Ceux-ci participent au mécanisme lésionnel de la polyarthrite rhumatoïde. Ils interviennent dans les lésions de vascularites par l'intermédiaire de dépôts de complexes immuns FR-IgG sur les parois vasculaires. Les FR à la surface des lymphocytes B présentent de façon efficace des peptides antigéniques aux lymphocytes T [Chaiamnuay S et Bridges SL Jr., 2005] .

E. Rôle des polynucléaires neutrophiles (PNN) :

L'augmentation anormale du nombre des PNN dans le liquide synovial des sujets atteints de polyarthrite rhumatoïde, serait due à un exsudat, lui-même favorisé par la production locale de facteurs chimiotactiques, produits de l'activation du complément et de l'activation cellulaire locale. En réponse à l'ingestion de complexes immuns et à l'activation locale par les cytokines et chimiokines, les PNN infiltrés dans la synoviale produisent des médiateurs de l'inflammation [Beavis PA, Gregory B, Green P *et al.*, 2011] .

E. Angiogenèse – formation de Pannus – :

Les lésions observées initialement sont dues à une atteinte microvasculaire et à un infiltrat périvasculaire par des cellules myéloïdes, puis des lymphocytes. L'atteinte vasculaire, segmentaire ou focale, inclut des microthromboses et une néovascularisation. On note également une hyperplasie des cellules synoviales [Chen DY, Chen YM *et al.*, 2011]. Le tissu synovial inflammatoire et prolifératif, ou « pannus », tend à recouvrir le cartilage articulaire et serait le siège de la production d'enzymes, responsables de la destruction du cartilage et de l'os [Saber T, Veale DJ *et al.*, 2011] . (Figure 4)

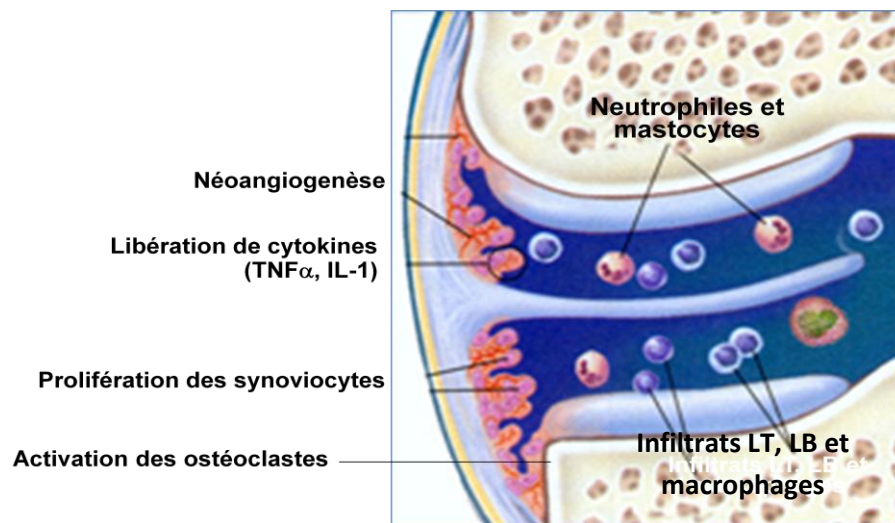


Figure 4 : La néoangiogenèse au cours du développement de la PR [Di W, Chang Y, Wu YJ, *et al.*, 2011]

G. Phase de réparation :

La phase de réparation, responsable de la fibrose articulaire, a lieu parallèlement à la phase de destruction, mais ne compense pas le processus de destruction. Elle fait participer des facteurs de croissance et le TGF β [Yeo L, Toellner KM *et al.*, 2011] .

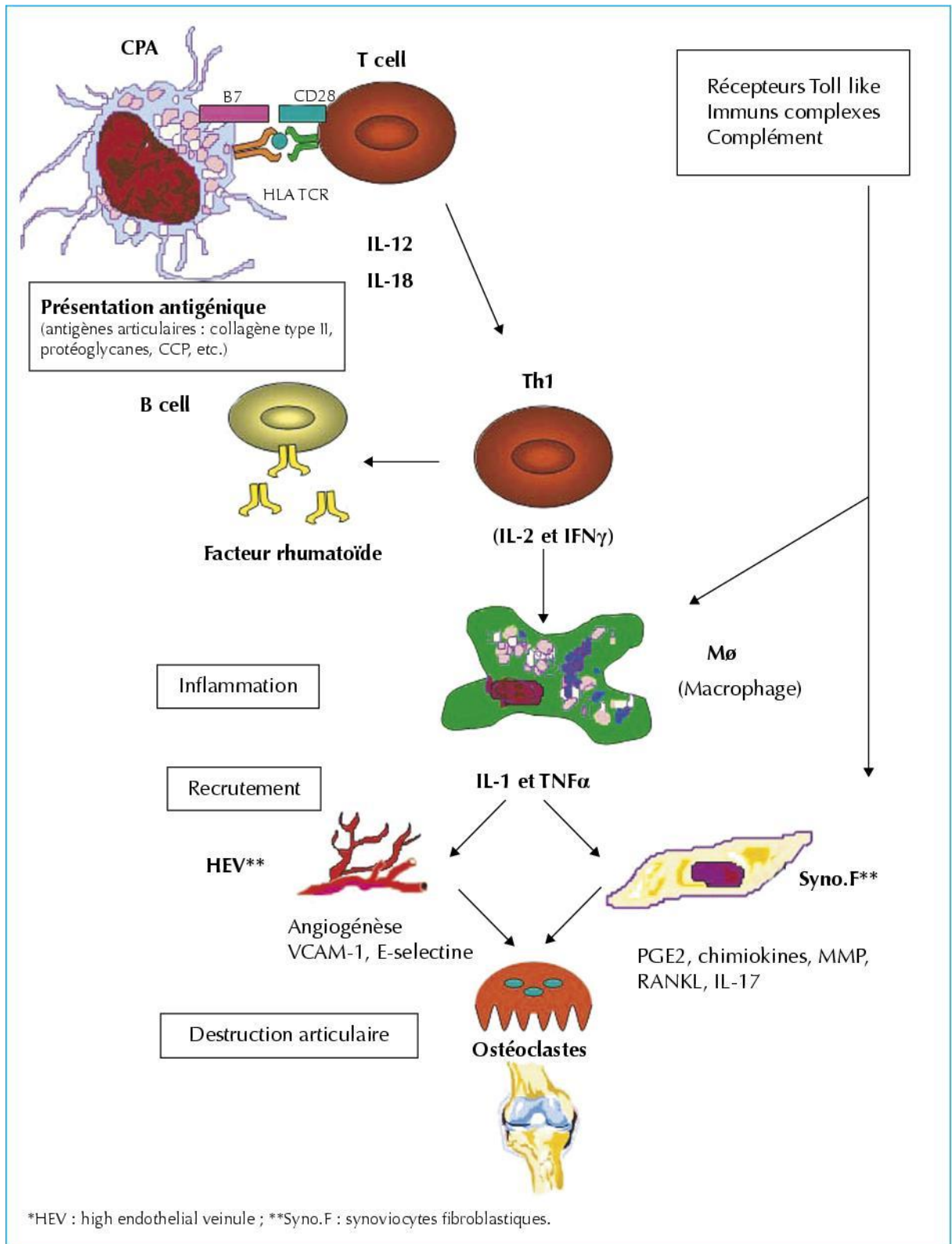


Figure 5 : Les différentes phases de la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde [Benhamou M, Fautrel B *et al.*, 2009]

III. Gènes de prédispositions :

A. Gène du système HLA :

Le CMH humain comprend plusieurs systèmes génétiques dont le système HLA (Human Leukocyte genes A). Historiquement, la découverte de ce système a permis de comprendre les mécanismes de rejet d'une greffe d'organe survenant de façon quasi inévitable entre deux individus non apparentés.

Le système HLA est formé d'une série de gènes étroitement liés qui codent pour des protéines membranaires (molécules HLA) qui fixent et présentent les peptides antigéniques aux récepteurs des lymphocytes T (TCR). Ainsi le système HLA a un rôle fondamental dans la réponse immunitaire physiologique. (Figure)

La région HLA est située sur le bras court de la sixième paire chromosomique, sur la bande 6p 21-3. Elle s'étend sur une distance d'environ 4000 kilobases, ce qui correspond à 1/1000 du génome humain. Elle comporte de nombreux gènes, partagés en trois classes : système HLA de classe I, de classe II et de classe III.

- le système HLA de classe I comprend principalement les gènes HLA-A, -B et -C auxquels s'ajoutent de nombreux autres gènes dont la fonction est ou n'est pas encore connue.
- le système HLA de classe II est constitué d'un ensemble de familles de gènes dont les principales sont HLA-DR, HLA-DQ et HLA-DP. Pour chacune des familles, il existe des gènes fonctionnels et des gènes non fonctionnels.

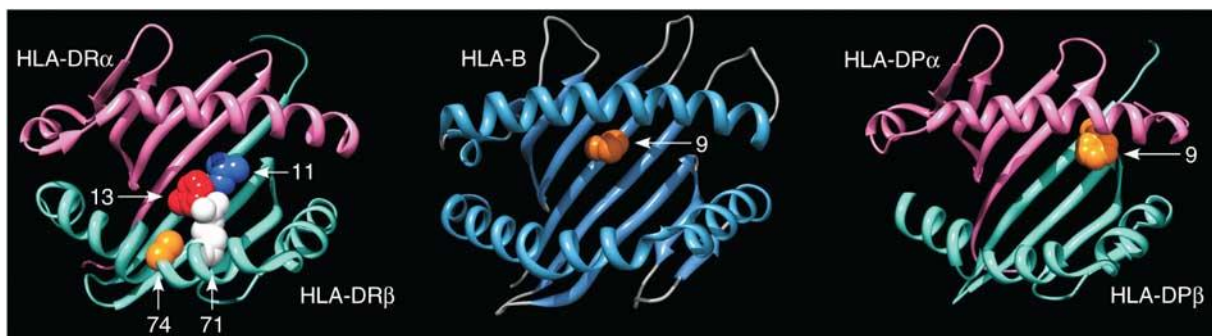


Figure 6 : Modèle tridimensionnel des molécules HLA-DR, HLA-B et HLA-DP.

L'association la plus forte est observée avec les gènes codant pour les molécules HLA II. 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 troisième région hypervariable du premier domaine de la chaîne bêta HLA-DR

[MacKay, Eyre *et al.*, 2002]. Cette séquence, qui concerne les acides aminés en position 70 à 74, correspond au site impliqué dans la reconnaissance antigénique et serait impliquée dans la pathologie selon plusieurs mécanismes :

- L'épitope partagé pourrait reconnaître un peptide de soi et favoriser dans le thymus la persistance d'un clone de LT autoréactifs par sélection clonale positive. [Combe B., Benessiano *et al.*, 2007].
- 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 [Hill, Southwood, *et al.* 2003].
- L'épitope partagé interagirait avec un peptide antigénique exogène mais ayant une structure voisine à un peptide du soi. [Combe, Benessiano *et al.*, 2007.]

Si HLA-DRB1 représente le composant génétique principal de la PR, le locus HLA ne contribue que pour environ 30% au risque familial global [Jawaheer, 2002 ; Zanelli, 2001]. En outre, près de 40 % de la population générale porte un des allèles HLA-DR de prédisposition à la PR, contre plus de 70 % des malades. Les allèles de susceptibilité HLA-DRB1 ne sont donc ni indispensables, ni suffisants au développement de la PR chez un individu donné. L'ensemble de ces constatations suggère l'implication d'autres facteurs génétiques non- HLA dans la prédisposition de la PR.

B. Autres gènes que le HLA :

Autres gènes sont actuellement en cours de localisation sur le génome et divers gènes candidats font l'objet d'études sur des populations de PR et leurs parents. Le deuxième gène de susceptibilité confirmé, après le gène HLA DRB1, est : PTPN22 (protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 22). Ce gène code pour une phosphatase impliquée dans la transduction du signal des récepteurs des lymphocytes T (TCR) et B (BCR) [Mayer, 2011] .

Bien d'autres gènes de susceptibilité à la PR, codant pour des protéines ayant un rôle dans le processus auto-immunitaire tels que TRAF1, STAT4, CD40, qui ont été associés non seulement à la PR, mais également à d'autres maladies auto-immunes.

IV. Matériel et méthodes :

L'étude a été réalisée au niveau du service d'immunologie de l'Hôpital Central de l'Armée (HCA Aïn Naâdja) en collaboration avec le service de rhumatologie du même hôpital.

La population étudiée comprend 26 sujets atteints de PR (maladie avérée), sélectionnés selon les critères internationaux de l'ACR/EULAR de 2010, recrutés au niveau du service de rhumatologie de l'HCA durant la période allant de janvier à mai 2013. Les caractéristiques générales de la population malade sont résumées dans le tableau III.

Vingt-cinq sujets sains, indemnes de toute pathologie rhumatismale, inflammatoire ou autre et sans antécédents familiaux, sont pris comme témoins.

A. Matériel :

Les prélèvements sanguins ont été effectués entre 8h et 10h du matin au service de rhumatologie. Le sang veineux est ponctionné au niveau du pli du coude dans des tubes :

- Secs pour les dosages sérologiques (FR, Anti-CCP2), immédiatement centrifugés à 3000 tours/min pendant 10 minutes. Le sérum, séparé des éléments figurés du sang (hématies, globules blancs, plaquettes) est prélevé dans des tubes Eppendorff puis conservé à -20°C .
- Anticoagulants (EDTA) pour le typage HLA, conservés à -20°C .

Tableau 3 : Caractéristiques générales de la population malade et témoins

	Malades	Témoins
Moyenne d'âge \pm (Ecart-type)	54.19 \pm (10.50)	29.63 \pm (10.35)
Sexe ratio	1 H : 4 F	1 H : 1 F
Hommes (%)	05 (19.23%)	12 (48%)
Femmes (%)	21 (80.77%)	13 (52%)

B. Méthodes :

1. Techniques sérologiques :

a. Dosage du facteur rhumatoïde :

La recherche du FR chez les patients a été faite par le test au Latex qui, en cas de positivité, est confirmé par une réaction de Waaler Rose (WR). En effet, le Latex a une sensibilité plus élevée que le WR, alors que ce dernier présente plus de spécificité. Ces deux tests ne permettent la recherche que du FR d'isotype IgM.

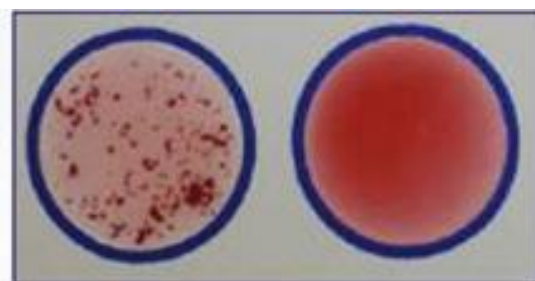
➤ Le test au Latex :

a) Principe :

C'est une réaction d'agglutination passive qui se fait sur un support solide. Le sérum du malade est mis en réaction avec 50 µl de réactif composé de particules de latex recouvertes d'IgG humaines, en présence d'un témoin positif et d'un témoin négatif. On commence à observer l'agglutination à partir de 2 minutes d'incubation. Une réaction positive se traduit par la formation d'agglutinat visible à l'œil nu, et une réaction négative donne un tapis homogène (**Figure 6**).

b) Interprétation :

Ce test est semi-quantitatif, permettant de rechercher la présence ou l'absence de FR (FR d'isotype IgM fortement ou faiblement positif). Le titre exprimé en UI/ml peut être estimé en faisant une série de dilutions, et est obtenu en multipliant l'inverse de la dernière dilution donnant une réaction faiblement positive, par le seuil de sensibilité indiqué sur l'étiquette du coffret.



+

-

Figure 7 : le test de Latex

➤ **Le test de Waaler Rose :**

a) Principe :

C'est une réaction d'agglutination passive, dont le principe est identique à celui du test au latex, sauf que les particules de latex sont remplacées par des globules rouges de mouton sensibilisés avec des IgG de lapin. Le même protocole que celui du latex est suivi pour ce test. Une réaction positive fait apparaître un bouton de sédimentation formé au milieu d'un tapis homogène (**Figure 7**).

b) Interprétation : la même que celle du test au latex.

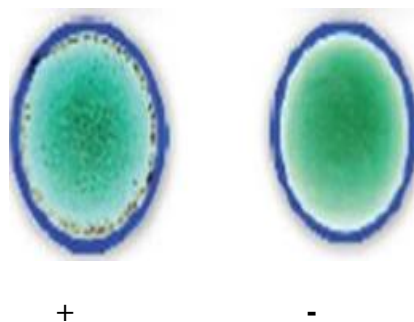


Figure 8 : le test de Waaler Rose

b. Dosage des anticorps anti-peptides citrullinés cycliques de 2^{ème} génération (anti-CCP2) :

a) Principe :

- Les anti-CCP présents dans les échantillons incubés dans les microplaques coatées avec l'antigène spécifique « peptide cyclique citrulliné synthétique », s'unissent à ce dernier immobilisé de la surface du micro-puits. La fraction non fixée est éliminée par lavage des microplaques.
- Après, une deuxième incubation est effectuée avec un conjugué « anti IgG humaines (lapin) couplé à la peroxydase » qui réagit avec les complexes Ag-Ac formés lors de la première incubation. Le conjugué non fixé est éliminé par lavage.
- L'addition du substrat TMB (tétraméthylbenzidine) /H₂O₂(peroxyde d'hydrogène) génère une réaction enzymatique colorimétrique (bleu) qui est arrêtée par de l'acide dilué (la couleur vire au jaune).

- L'intensité de la coloration obtenue avec le chromogène qui est mesurée en unités d'absorbance à 450 nm, est en fonction du taux du conjugué fixé aux complexes Ag-Ac et ceci est proportionnel à la concentration initiale des Ac contenus dans les échantillons des patients.

b) Protocole :

1. Laisser tous les réactifs et micropuits chauffer jusqu'à la température ambiante.
2. Ouvrir l'emballage de la microplaque et sortir la quantité requise de puits.
3. **Essai quantitatif** : pipeter 100 μ L de chaque étalons (S1-S6)*, de contrôle positif, de contrôle négatif et d'échantillon dilué dans différents puits.
Essai qualitatif : pipeter 100 μ L d'étalon S3, de contrôle positif, de contrôle négatif et d'échantillon dilué dans différents puits. Pipeter 100 μ L de diluant d'échantillons à un puits du blanc.
4. Mettre les puits dans une chambre humide et incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
5. Aspirer le contenu et laver les puits 3 fois avec 300 μ L de tampon de lavage pendant au moins 10 secondes.
6. Pipeter 100 μ L de conjugué (D) dans tous les puits.
7. Mettre les puits dans une chambre humide et incuber pendant 15 minutes à température ambiante.
8. Laver les puits comme lors de l'étape 5.
9. Pipeter 100 μ L de substrat (E) dans tous les puits.
10. Mettre les puits dans une chambre humide et incuber pendant 15 minutes à température ambiante.
11. Pipeter 100 μ L de solution d'arrêt (F) dans tous les puits et incuber pendant 5 minutes à température ambiante.
12. Lire l'absorbance du contenu de chaque puits à 450 nm en utilisant l'étalon S1 ou le puits de blanc pour le réglage à zéro. La couleur est stable pendant au moins 30 minutes.

* **S1-S6. Etalons** : 1,5 mL chacun. Prêt à l'emploi. Sérum humain avec des anticorps anti-protéines citrullinée, azide de sodium 15 mmol/L. Les concentrations des anticorps sont 0, 10, 20, 50, 150, et 500 U/ml.

2. Technique de typage moléculaire :

Technique d'étude des polymorphismes alléliques des gènes HLA II

a. Extraction d'ADN (acide désoxyribonucléique) par kit QuickGene :

a) Principe :

Les principales étapes de l'extraction de l'ADN sont les suivantes :

- Lyse des cellules et libération de l'ADN.
- Elimination des protéines et des peptides.
- Précipitation de l'ADN et sa purification.
- Solubilisation de l'ADN purifié.

b) Protocole :

- Le sang est prélevé sur anticoagulant. S'il est congelé, laisser décongeler 20 à 30 minute à température ambiante.
- Ajouter 200µl de sang total, dans un Eppendorf contenant 30µl de protéinase K
- Rajouter 250µl de solution de lyse LBD (Lysis Dilution Buffer)
- Mélanger au vortex pendant 15s et mettre au flash spin down
- Incuber le mélange au bain-Marie à 56°C pendant 2mn
- Rajouter 250 µl d'éthanol > 99%
- Mélanger au vortex pendant 15s puis placer au flash spin down
- Transférer le lysat obtenu dans une colonne CAS (Cartridges) posée sur un tube à déchets WTS (Wats tube)
- Centrifuger à 8000 tpm/1mn à température ambiante.
- Jeter le tube à déchets et placer la colonne CAS sur un autre neuf
- Rajouter 750 µl de solution de lavage WDB (Wash Dilution Buffer) dans la colonne
- Centrifuger à 8000 tpm/1mn.
- Remplacer le WTS par un autre neuf
- Effectuer un deuxième lavage en rajoutant 750 µl de WDB
- Centrifuger à 800 tpm/1mn à température ambiante.

- Remplacer le WTS par un Eppendorff stérile
- Rajouter 200 µl de solution d'éluion
- Centrifuger à 800 tpm/1mn à température ambiante
- L'Eppendorff contient de l'ADN extrait, (jeter la colonne)

b. Contrôle de la quantité et de la qualité d'ADN :

Effectué par photométrie (spectrophotométrie). Une unité de densité optique à 260 nm (DO lue sur le spectrophotomètre) correspond à :

- une solution d'ADN double brin à 50 µg/ml
- une solution d'ARN ou d'ADN simple brin à 25 µg/ml

(Les bases puriques et pyrimidiques absorbant fortement dans l'ultraviolet à 260 nm.)

Ce contrôle permet toutefois de rechercher une éventuelle contamination protéique. Car les protéines absorbent non seulement à 280 nm mais aussi à 260 nm. Pour cette raison nous avons effectué une seconde mesure de DO à 280 nm. Un ADN pur doit avoir un rapport DO 260 / DO 280 compris entre 1,8 et 2. (Annexe 4)

c. La PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer) par kit INNO-TRAIN/HLA-Ready Gene DRDQ Low :

a) Principe :

La PCR est une technique moléculaire d'amplification ciblée *in vitro*. Elle permet l'amplification d'un fragment d'ADN originellement présent en un exemplaire unique en des millions de copies.

Chaque réaction d'amplification comporte trois étapes se succédant précisément et nécessitant chacune une température différente.

- Étape d'amplification : correspond au passage de l'ADN double brin à l'ADN simple brin par chauffage + 94°C pendant 30 secondes à 1 minute.
- Étape d'hybridation : elle s'effectue à une température variant de +45 °C à +70°C pendant 30 secondes.
- Étape d'élongation : correspond à l'extension des amorces par incubation avec l'ADN-polymérase et les quatre désoxyribonucléotides-triphosphates, à +72°C.

Ces trois étapes actuellement automatisées grâce à un thermocycleur, sont répétées 15 à 60 fois selon le protocole utilisé avec un optimum aux environs de 30 cycles.

La PCR-SSP est basée sur l'utilisation d'amorces spécifiques d'un allèle (sequence specific primers) ou d'un groupe d'allèles. Dans ce cas l'amplification par PCR ne se fait que sur l'allèle ou groupe d'allèle recherché. Cette technique présente l'avantage d'être rapide et de permettre la détection allélique directe (HLA DR, DQ).

L'amplification de fragments d'ADN *in vitro* : la PCR

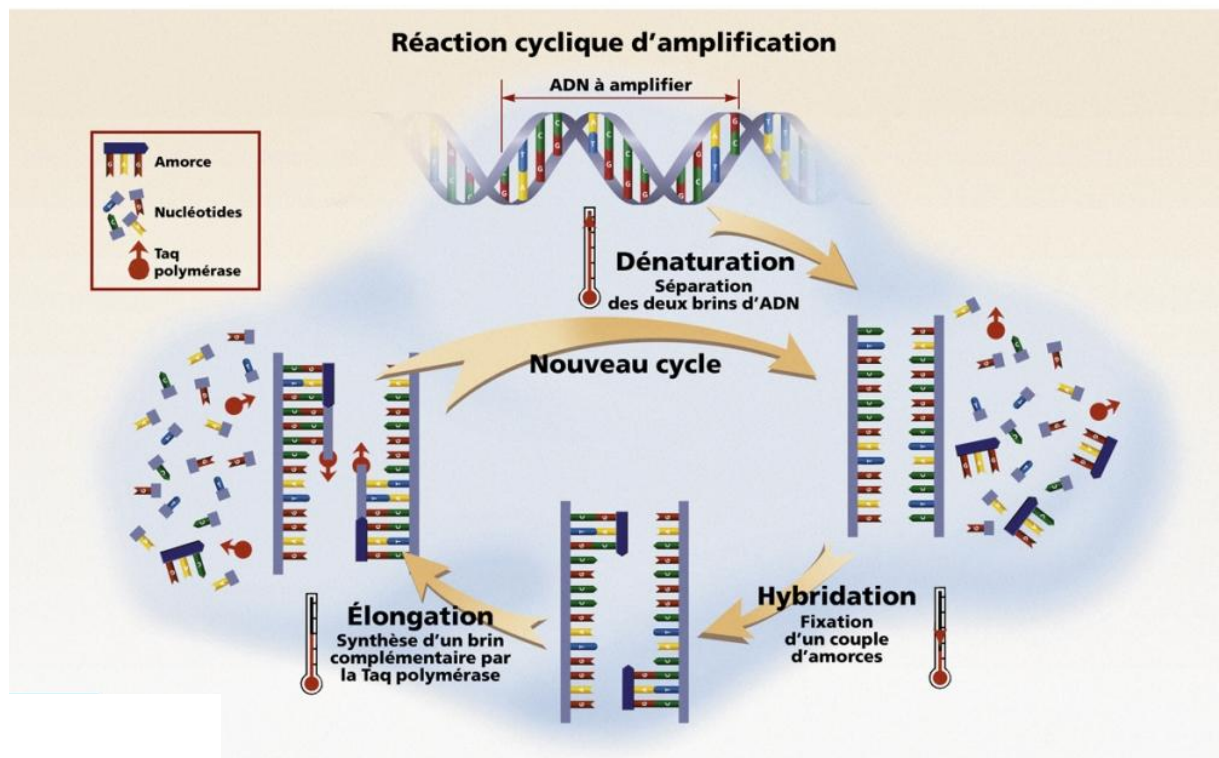


Figure 9 : Schéma de la réaction PCR

b) Protocole :

La pré-amplification :

- Ajouter 200 µl d'eau distillée dans Eppendorff stérile
- Rajouter 100 µl de tampon de PCR (conservé à -20°C)
- Mélanger au Vortex pendant 15s
- Déposé 10 µl du mélange dans le premier puits de contrôle négatif
- Vortexer l'ADN génomique pendant 15s et en rajouter 50µl au mélange
- Rajouter 4 µl de taq-polymérase

- Vortexer le tout pendant 20s
- Déposer 10µl du mélange finale dans tous les puits de la plaque, hormis le contrôle négatif
- Bien fermer les puits par des couvercles afin d'empêcher l'évaporation du contenu



Figure 10 : Plaques d'amplification

L'amplification :

- Placer les plaques préparées dans le thermocycleur (Applied Biosystems 9700) préalablement préchauffé
- Un programme spécifique d'amplification est lancé : INNOTRAIN-Ready



Figure 11 : Thermocycleur

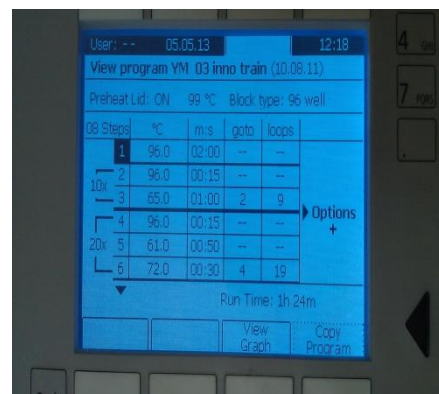


Figure 12 : Programme d'amplification

d. Révélation des produits d'amplification par électrophorèse sur gel d'Agarose :

a) Principe :

Lorsque la quantité de produits d'amplification est suffisante, ceux-ci sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. Cette électrophorèse permet de faire migrer les acides nucléiques au travers du gel additionné de BEt (Bromure d'éthyduim : produit intercalant qui se glisse entre les bases des acides nucléiques faisant apparaître à la molécule d'ADN une fluorescence orange sous illumination par les UV courts (environ 30 nm). La vitesse de migration étant dépendante de la masse de la molécule, donc du nombre de bases de l'ADN testé.

b) Protocole :

Préparation du tampon TAE (Tris, Acétate, EDTA) :

- > Ajouter 242 gr de tris base à 51.1 ml d'acide acétique
- > Rajouter 100 ml d'EDTA
- > Rajouter 1000 ml d'eau distillée
- > Les pastilles de KOH ou NaOH permettent d'avoir un pH basique (pH = 8.5)
- > Diluer la solution obtenue (concentrée 50X) à une concentration 1X

Préparation du gel d'Agarose (à 2%) :

> Mélanger 6g d'agarose (GENAGAROSE) avec 300 ml de tampon TAE dans un bécher

> Mettre le bécher au micro-onde jusqu'à dissolution totale d'agarose

> Entre temps, préparer le porte gel :

- Bien sceller les extrémités avec du scotch à autoclave standard (pas de Scotch ou similaire), en l'appuyant fermement pour former un joint étanche au fluide

- Mettre à niveau le porte gel sur la plaque sous la hotte à flux laminaire (FLUFRANCE)

> Retirer le bécher du micro-onde, une fois prêt, et le mettre sous la hotte

> Ajouter 25 µl de BET et verser délicatement dans le porte gel

> Placer soigneusement les applicateurs et laisser solidifier pendant 15mn

Migration :

- > Submerger la cuve à électrophorèse avec de TAE 1X et y mettre le gel
- > Retirer doucement les applicateurs
- > Déposer à l'aide d'une micropipette à 8 canaux, le contenu des plaques d'amplification (amplicons) dans les puits du gel d'agarose à 2%
- > Les fragments d'ADN amplifié migrent pendant 20mn à 160V
- > Les bandes d'électrophorèse sont visualisées sous rayons UV par un dispositif capteur de photos : (GEL DOC XR BIORAD), couplé au logiciel Quantity One.

3. Outils et tests statistique :

Les fréquences alléliques des gènes HLA DRB1/DQB1 sont déterminées par comptage des sujets en tenant compte des homozygotes qui sont dénombrés deux fois.

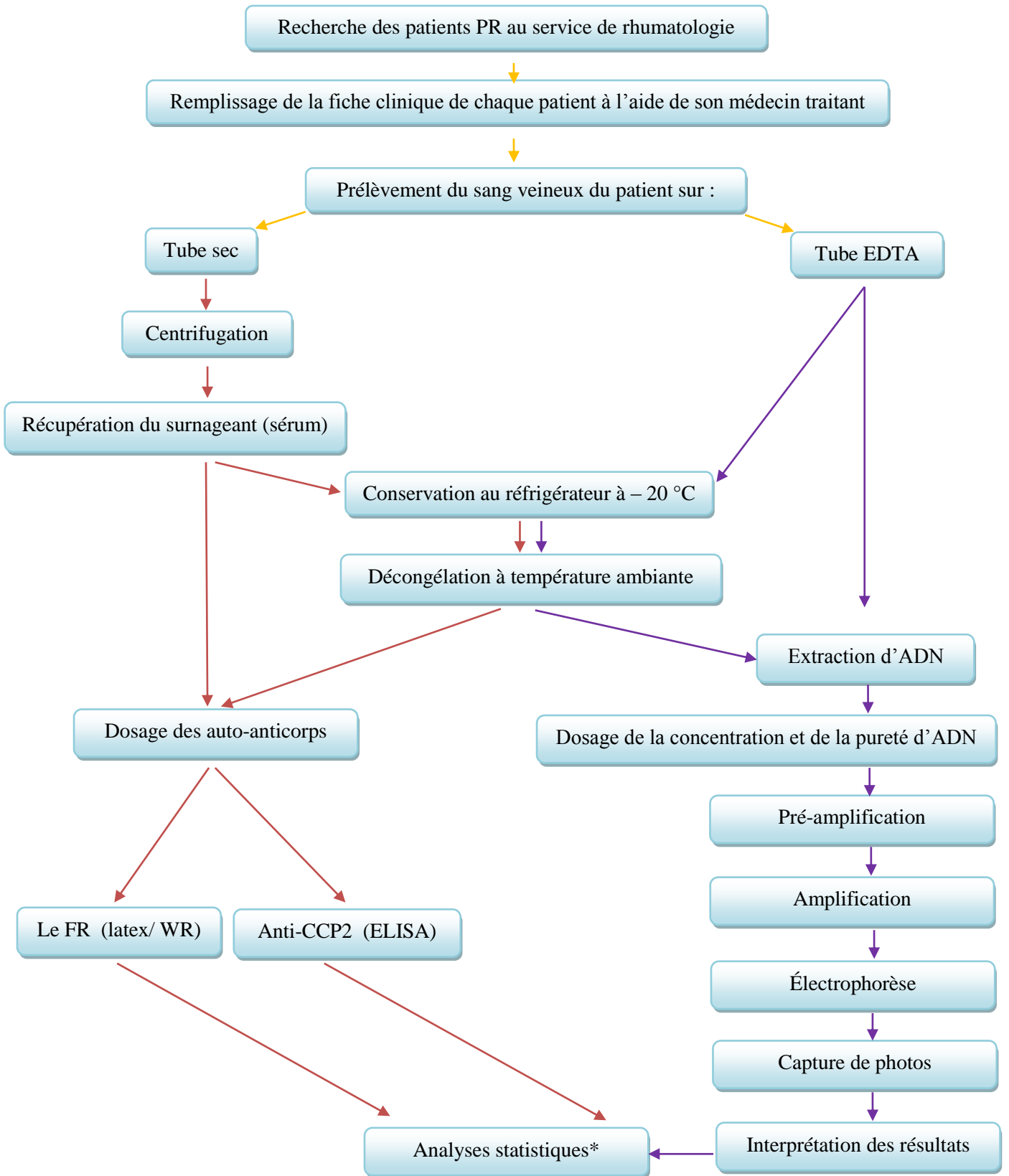
La comparaison entre les fréquences alléliques des gènes étudiés est faite par un test χ^2 obtenu par le logiciel COMPARE2.

- En premier lieu, entre les sujets atteints de PR et les sujets sains,
- et, en deuxième lieu, en fonction des différentes présentations clinico-biologiques.

Les résultats sont considérés comme statistiquement significatifs pour les valeurs de $P_c < 0.05$ (P corrigé, P corrigé de YATES pour les échantillons réduits, obtenu par COMPARE2).

Les Odds ratio (OR), qui permettent d'apprécier l'intensité de l'association entre un marqueur et une maladie, sont calculés par le logiciel COMARE2.

C. Processus général de la démarche expérimentale :



*Les analyses statistiques comprennent même les résultats des examens clinique et radiologique enregistrés sur les fiches cliniques des patients.

V. Résultats :

A. Description de la cohorte :

Cette étude a porté sur 26 patients algériens atteints de PR suivis dans le service de rhumatologie de l'HCA et diagnostiqués sur la base des critères de l'ACR. La présence du FR définissant la séropositivité, a été observée chez 22 patients (84.62%). Le reste, soit 04 malades (15.38%), présentent une PR séronégative (FR-). Quant à la présence des anti-CCP2, elle a été détectée chez 19 patients (73.08%). Ce marqueur était négatif chez 07 patients (26.92%).

Vingt-trois de nos patients (88.46%) présentent une PR érosive. La forme modérée de PR était plus fréquente chez notre population malade, contrairement à la forme sévère (69.23% vs 30.77% respectivement). (**Tableau 4**)

Tableau 4 : Résultats des examens biologiques et caractéristiques diagnostiques des patients PR.

Variable	Patients PR (n=26)	%
FR +	22	84.62
FR -	04	15.38
Anti-CCP2 +	19	73.08
Anti-CCP -	07	26.92
PR érosive	23	88.46
PR non érosive	03	11.54
PR très active	08	30.77
PR modérément active	18	69.23

B. Résultats de l'étude sérologique :

1. Valeurs diagnostiques du FR et des anti-CCP2 :

Dans la population malade, les résultats de 17 patients (65.38%) sont revenus positifs en FR et en anti-CCP2, 05 (19.24%) positifs en FR et négatifs en anti-CCP2, deux (7.69%) négatifs en FR et positifs en anti-CCP2 et, enfin, deux (7.69%) négatifs en FR et en anti-CCP2. (**Tableau 5**)

Tableau 5 : Répartition des patients PR en groupes sérologiques FR/anti-CCP2.

	FR + (n=22)		FR- (n=4)	
	N	%	N	%
Anti-CCP +	17	65.38	02	7.69
Anti-CCP -	05	19.24	02	7.69

2. Corrélation des résultats du dosage des FR et anti-CCP2 avec l'activité de la PR :

Les résultats de notre étude montrent la présence d'une corrélation entre la positivité en FR et la sévérité de la maladie. Tous nos patients présentant une PR très active (08, soit un pourcentage de 32.47%) sont séropositifs. La majorité des patients (18, soit 69.32%) ont une PR modérée dont 10 (38.46%) présentent une association du FR et des anti-CCP2, tandis que 4 autres (15.38%) sont FR+ anti-CCP2-. Les quatre derniers sont séronégatifs, deux d'entre eux (7.69%) sont anti-CCP2+ et deux (7.69%) sont anti-CCP2-. (**Tableau 6**)

Tableau 6 : répartition des résultats de FR/antiCCP2 selon la sévérité de la PR

	PR très active (n= 08)		PR modérément active (n= 18)	
	N	%	N	%
FR + Anti-CCP +	07	26.92	10	38.46
FR + Anti-CCP -	01	05.55	04	15.38
FR - Anti-CCP +	00	0 %	02	7.69
FR - Anti-CCP -	00	0 %	02	7.69

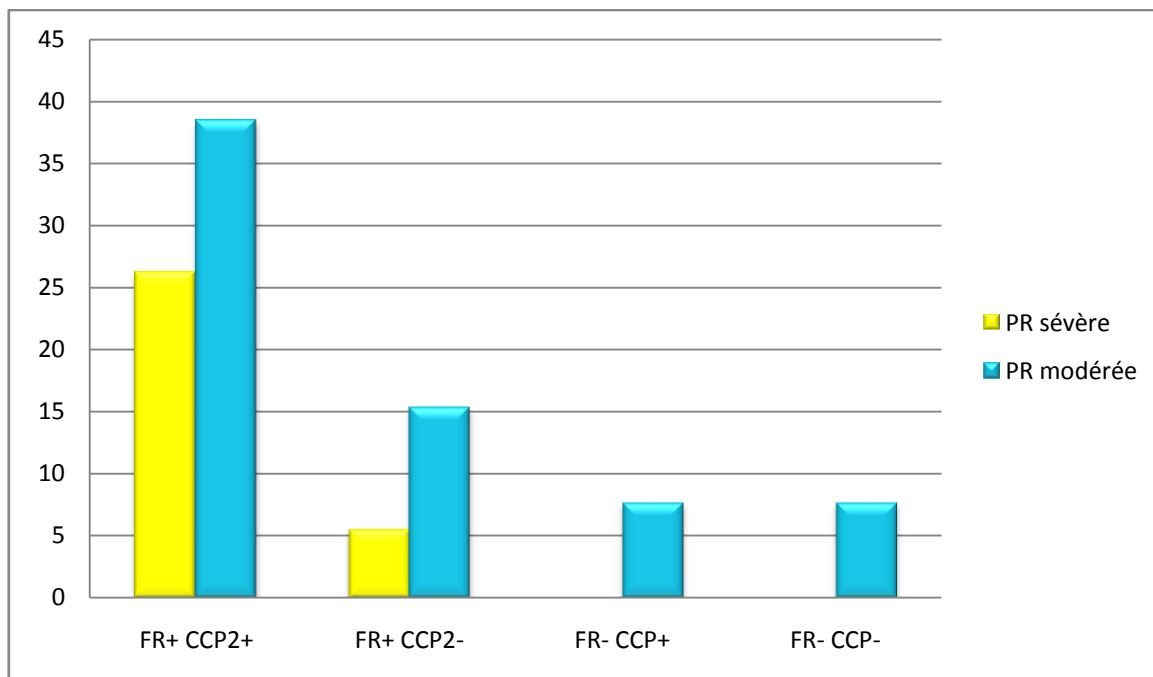


Figure 13 : Distribution des résultats des FR/anti-CCP2 selon la sévérité de la PR.

3. Corrélation entre les résultats du dosage des FR / anti-CCP2 et la sévérité de la PR :

La recherche des marqueurs sériques dans les deux formes de PR, érosive et non érosive, révèle une forte corrélation entre la présence des FR avec les anti-CCP2 et l'érosion articulaire. Néanmoins l'absence des anti-CCP2 a été associée aux PR non érosive.

Une grande tranche de patients souffrant d'une PR érosive (73.91%) sont FR+ Anti-CCP+. Tandis que tous les sujets ayant une PR non érosive sont Anti-CCP-.

Tableau 7 : Répartition des résultats de FR/antiCCP2 selon la forme radiologique de la PR

	PR érosive (n= 23)		PR non érosive (n= 03)	
	N	%	N	%
FR + Anti-CCP +	17	73.91%	00	0%
FR + Anti-CCP -	03	13.04%	02	66.66%
FR - Anti-CCP +	02	08.70%	00	0%
FR - Anti-CCP -	01	04.35%	01	33.33%

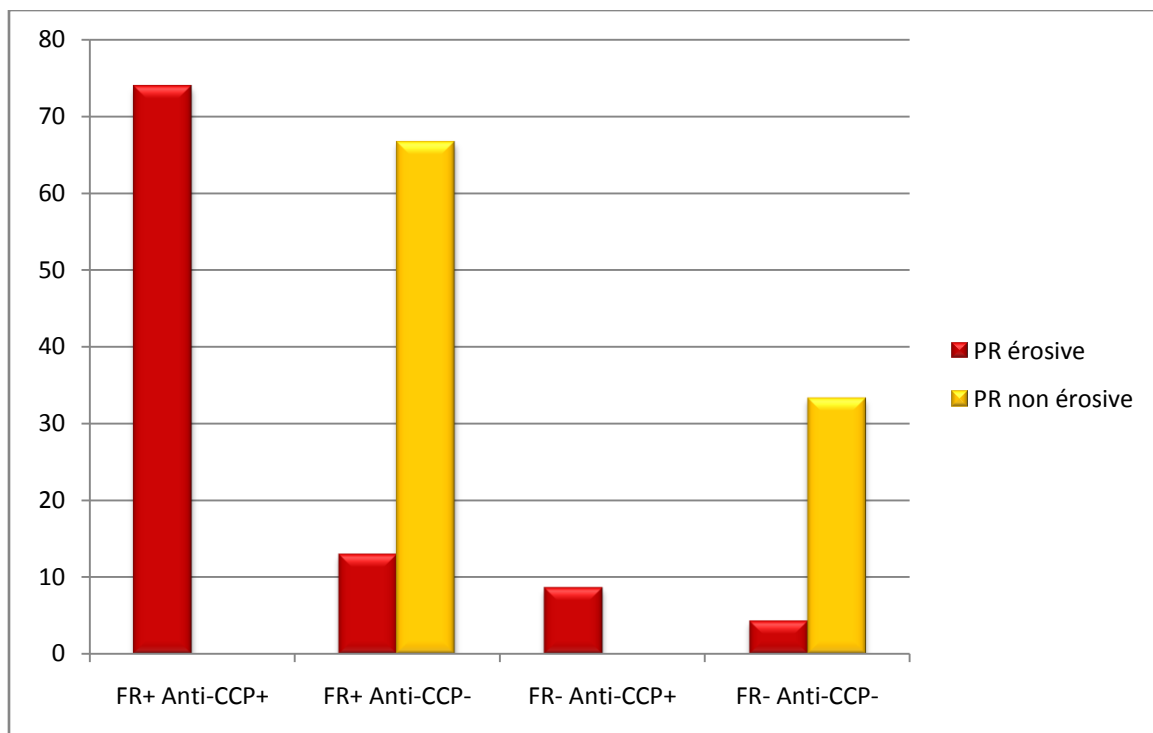


Figure 14 : Distribution des résultats des FR/anti-CCP2 selon la forme radiologique de la PR.

C. Résultats du typage allélique :

1. Analyse des fréquences alléliques des gènes HLA II (DRB1/DQB1) :

L'exploration des allèles HLA DRB1/ DQB1 a montré une augmentation significative de la fréquence de l'allèle HLA DRB1*04 qui est plus répondu chez les patients PR par rapport aux témoins avec une fréquence de 30,77% ($p= 0.039$). Néanmoins, le calcul des fréquences alléliques n'a pas révélé de différence statistiquement significative entre les malades et les témoins sains par rapport aux autres allèles que DR4. Cependant, une légère augmentation a été observée avec les allèles DRB1*01, DRB1*03, DQB1*02 et DQB1*05. (**Tab. 8**)

Tableau 8 : Résultats de l'analyse allélique des allèles HLA DRB1/DQB1 chez les patients et les témoins

Allèle HLA	Patients PR (2n=52)	Fréquence allélique %	Témoins (2n=50)	Fréquence allélique %	χ^2	Pc (Yates)	OR
HLA DR							
DRB1* 01	07	13.46	01	02	2.836	0.182	3.73
DRB1* 03	12	23.08	04	08	4.381	0.069	3.45
DRB1* 04	16	30.77	06	12	5.308	0.039	3.26
DRB1* 07	04	07.69	03	06	0.114	1.000	1.31
DRB1* 08	00	00	06	12	6.630	0.031	0.00
DRB1* 09	00	00	02	04	2.122	0.458	0.00
DRB1* 10	03	05.77	01	02	0.961	0.638	3.00
DRB1* 11 (05)	02	03.85	04	08	0.794	0.638	0.46
DRB1* 12 (05)	00	00	03	06	3.215	0.228	0.00
DRB1* 13 (06)	02	03.84	04	08	0.794	0.638	0.46
DRB1* 14 (06)	01	01.92	06	12	4.050	0.105	0.14
DRB1* 15 (02)	05	09.62	07	14	0.472	0.704	0.65
DRB1* 16 (02)	00	00	03	06	3.215	0.228	0.00
HLA DQ							
DQB1* 02	14	26.92	06	12	3.601	0.099	2.70
DQB1* 03	15	28.85	20	40	1.407	0.328	0.61
DQB1* 04	02	03.84	05	10	1.510	0.402	0.36
DQB1* 05 (01)	16	30.77	10	20	1.557	0.308	1.78
DQB1* 06 (01)	05	09.62	09	18	1.513	0.346	0.48

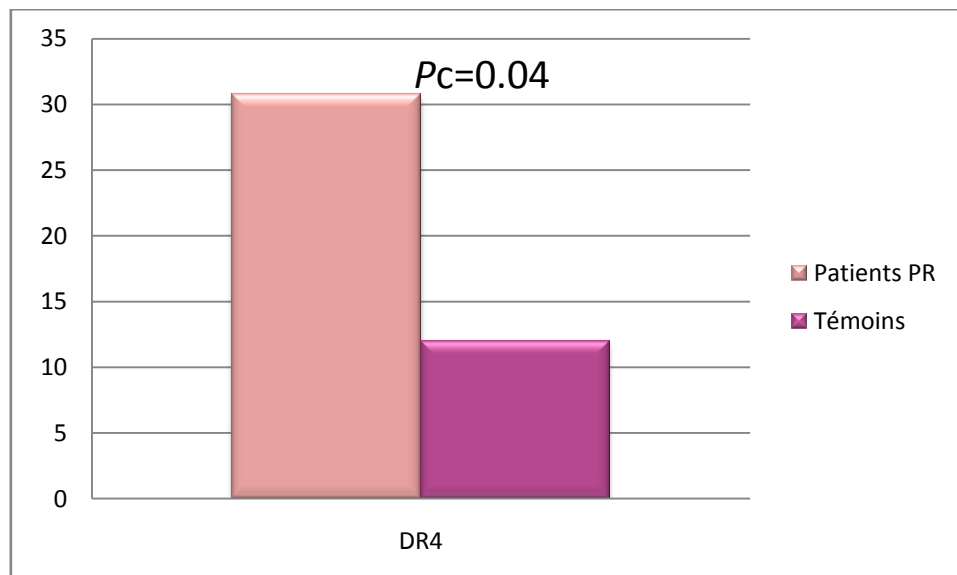


Figure 15 : Fréquences des allèles HLA DRB1 chez les patients PR et les témoins.

2. Corrélation entre le polymorphisme HLA DR/DQ et les différents phénotypes clinico-biologique de la PR :

La comparaison entre la distribution des allèles HLA DR/DQ chez les patients PR FR+ et les patients PR FR- n'a montré aucune différence significative.

Par ailleurs, des fréquences plus élevées des allèles HLA DRB1*01 et DRB1*04 sont retrouvées chez les patients anti-CCP2+ en comparant avec ceux qui ne présentent pas ce marqueur. (Tableau 9)

L'allèle HLA DRB1*04 est présent d'une fréquence beaucoup plus élevée chez les patients souffrant d'une PR très active que chez les PR modérées ($P_c = 0.020$, $OR = 5.33$). (Tableau 9)

L'analyse des allèles HLA DR/DQ par rapport à la radiologie de la PR, ne montre aucune différence significative entre les PR érosive et non érosive. (Tableau 9 et 10)

Tableau 9 : Résultats de l'analyse allélique des allèles HLA DRB1 chez les patients PR selon les critères de l'ACR

Allèles HLA DRB1	FR + (%) (2n=44)	FR - (%) (2n=08)	χ^2	P_c	OR
DR1	07 (15.90)	00 (00)	1.471	0.516	∞
DR3	09 (20.45)	03 (37.50)	1.108	0.551	0.43
DR4	13 (29.54)	03 (37.50)	0.201	0.974	0.70
Autres	15 (34.09)	02 (25)	0.254	0.925	1.55
	Anti-CCP2 + (%) (2n=38)	Anti-CCP2 - (%) (n=14)	χ^2	P_c	OR
DR1	06 (15.76)	01 (07.14)	0.657	0.725	2.44
DR3	07 (18.42)	05 (35.71)	1.724	0.346	0.41
DR4	13 (46.23)	03 (21.43)	0.785	0.584	1.91
Autres	12 (31.52)	05 (35.71)	0.080	1.000	0.83
	PR très active (%) (2n=16)	PR modérément active (%) (2n=36)	χ^2	P_c	OR
DR1	02 (12.50)	05 (13.89)	0.018	1.000	0.89
DR3	00 (00)	12 (33.33)	6.933	0.023	0.00
DR4	09 (56.25)	07 (19.44)	7.044	0.020	5.33
Autres	05 (31.25)	12 (33.33)	0.022	1.000	0.91
	PR érosive (%) (2n=46)	PR non érosive (%) (2n=06)	χ^2	P_c	OR
DR1	07 (15.22)	00 (00)	1.055	0.696	∞
DR3	10 (21.74)	02 (33.33)	0.402	0.905	0.56
DR4	14 (30.43)	02 (33.33)	0.021	1.000	0.88
Autres	15 (32.60)	02 (33.33)	0.001	1.000	0.97

Tableau 10 : Résultats de l'analyse allélique des allèles HLA DQB1 chez les patients PR selon les critères de l'ACR

Allèles HLA DQB1	FR + (%) (2n=44)	FR- (%) (2n=08)	χ^2	Pc	OR
DQ2	12 (27.27)	02 (25)	0.018	1.000	1.13
DQ3	11 (25)	4 (50)	2.061	0.312	0.33
Autres	21 (47.73)	02 (25)	1.417	0.422	2.74
	Anti-CCP2 + (%) (2n=38)	Anti-CCP2 (%) (2n=14)	χ^2	Pc	OR
DQ2	11 (28.95)	03 (21.43)	0.294	0.849	1.49
DQ3	11 (28.95)	04 (28.57)	0.001	1.000	1.02
Autres	16 (42.10)	07 (50)	0.259	0.846	0.73
	PR très active (%) (2n=16)	PR modérément active (%) (2n=36)	χ^2	Pc	OR
DQ2	02 (12.50)	12 (33.33)	2.444	0.221	0.29
DQ3	06 (37.50)	09 (25)	0.843	0.557	1.80
Autres	08 (50)	15 (41.66)	0.560	0.657	1.57
	PR érosive (%) (2n=46)	PR non érosive (%) (2n=06)	χ^2	Pc	OR
DQ2	12 (26.08)	02 (33.33)	0.142	1.000	0.71
DQ3	12 (26.08)	03 (50)	1.479	0.461	0.35
Autres	22 (47.84)	01 (16.67)	2.089	0.313	4.58

VI. Discussion :

A. Stratification selon les critères de l'ACR :

1. Le Facteur Rhumatoïde :

Les FR constituent des marqueurs de morbidité liée à la PR [Chaiamnuay et Bridges Jr., 2005]. En effet, la présence du FR a été corrélée avec une évolution sévère de la PR qui se manifeste par une destruction ostéo-articulaire et/ou un handicap fonctionnel, et ce, dans plusieurs études [Agrawal *et al.*, 2007; Combe *et al.*, 2007; Vittecoq *et al.*, 2003; Jansen *et al.*, 2001]. Dans notre étude, la présence du FR a été corrélée avec une évolution sévère de la PR. Tous nos patients qui souffrent d'une PR sévère sont séropositifs.

2. Les anti-CCP2 :

Les Ac anti-CCP2 étaient positifs chez 23 de nos patients PR (88.46 %). La radiologie a révélé la présence d'une érosion osseuse chez 19 d'entre eux (82.61%). Ces auto-anticorps présentent également un intérêt pronostique important car ils permettent de prédire l'évolution de la PR vers une forme persistante et érosive. La présence des Ac anti-CCP2 est corrélée à un niveau d'érosion significativement plus élevé par rapport aux FR dans plusieurs études [Forslind *et al.*, 2004; Kastbom *et al.*, 2004].

3. Association FR/ anti-CCP :

Par ailleurs, l'association des deux marqueurs, FR et anti-CCP2, a été révélée chez 17 patients de notre cohorte (65.38%). Sept sur huit patients dont la maladie est très active (87.50%) sont FR+ anti-CCP+. De plus, cette association est présente chez 19 sur 23 patients dont la maladie a une forme érosive (82.60%). Nos résultats concordent avec d'autres [Vencovsky *et al.*, 2003] pour confirmer que l'association de la positivité des FR et des anti-CCP offre une valeur pronostique encore plus forte à prédire une PR progressive et érosive [Vencovsky *et al.*, 2003 ; Jansen *et al.*, 2002].

B. Stratification selon le polymorphisme HLA :

Nous avons exploré le polymorphisme des allèles HLA de classe II (DR/DQ) chez 26 patients atteints d'une PR avérée et 25 témoins sains. Ce qui nous a permis d'étudier l'association de chaque polymorphisme avec la survenue de la PR chez la population algérienne.

La comparaison des résultats du typage allélique de chaque allèle entre nos patients et les témoins, montre une présence significativement plus importante de l'allèle HLA DRB1*04 chez les patients ($P_c = 0.039$; $OR = 3.26$). Ceci reflète l'implication de cet allèle dans la survenue de la PR. (**Tableau 8**)

Ces résultats corroborent avec de nombreuses études faites sur des différentes ethnies (**Tableau 11**), ayant décrit également l'incrimination de l'allèle HLA DRB1*04 dans PR.

Tableau 11 : Résultats des différentes études d'association du polymorphisme d'HLA DRB1*04 avec la PR chez différentes ethnies

Population	Résultats de l'étude				
	Patients	Témoins	DR4+		
			Patients PR N (%)	Témoins N (%)	P_c
Notre population	26	25	16 (30.7)	06 (12)	0.039
Tunisienne	90	100	46 (51.1)	27 (27)	0.001
Marocaine	49	183	24 (24.5)	63 (17.2)	0.06
Suisse	272	201	132 (48.5)	44 (21.9)	< 0.001
Japonaise	88	106	62 (70.5)	49 (46.1)	0.001
Espagnole	68	929	22 (32.5)	160 (17.3)	0.003
Britannique	68	226	43 (63.5)	17 (7.7)	<0.001

Les autres allèles de susceptibilité (DRB1*01, DRB1*10 et DRB1*14) connus dans certains travaux réalisés au Japon [Kenichi, Yuta *et al.*, 2013], en USA [Joseph Holoshitz, 2010] et en Espagne [A. Balsa *et al.*, 2010] n'étaient pas associés avec la PR dans notre cohorte.

Cette observation est en faveur de plusieurs études faites entre autre sur des populations arabes : marocaine [Atouf, *et al.*, 2008] , koweïtienne [Alsaeid, *et al.*, 2006], pakistanaise [Hameed, *et al.*, 1997]. Les résultats de l'analyse des allèles HLA DRB1/DQB1 n'ont montré aucune différence significative des fréquences des autres allèles que le HLA DR4. (**Tableau 8**)

C. Corrélation entre le polymorphisme HLA DR/DQ et les différents phénotypes clinico-biologique de la PR :

La séropositivité a été corrélée avec un polymorphisme HLA DRB1*04 dans de nombreuses études [Atouf *et al*, 2008].

La présence d'anticorps anti-CCP a été fortement liée à la présence des allèles HLA associés à la PR [Nishimura *et al.*, 2007; Van der Helm-van Mil *et al.*, 2007 et 2006] , mais aussi à la présence, voire au développement futur, d'érosions osseuses définissant la maladie. Ce test anti-CCP2 présente une sensibilité accrue pouvant atteindre 82% pour la PR avec une spécificité de (95-99%) [Walther van Venrooij et Zendman, 2008].

Dans notre étude, l'analyse des allèles HLA DRB1 et DQB1 n'a pas montré une association significative entre le polymorphisme des gènes HLA et les auto-anticorps liés à la PR. Néanmoins, nous avons noté une forte corrélation entre la présence de l'allèle HLA DRBA1*04 et la sévérité de la maladie ($P < 0.02$; OR= 5.33).

Conclusion :

Un véritable enjeu de santé publique, la PR est le rhumatisme inflammatoire chronique le plus important par sa fréquence et sa gravité. Actuellement, nous avons une physiopathologie de mieux en mieux comprise dans son déroulement mais sans avoir jusqu'alors identifié le ou les facteurs déclenchants. La polyarthrite rhumatoïde résulte principalement d'interactions entre des sujets génétiquement prédisposés (gène HLA,...) et des facteurs environnementaux.

Dans notre étude, nous avons exploré le polymorphisme allélique des gènes HLA de classe II (DR, DQ) chez des patients algériens atteints d'une PR. Nos résultats montrent une corrélation entre la présence du FR et la sévérité de la PR, ainsi qu'entre la présence des anticorps anti-CCP2 et l'érosion osseuse. La positivité de ces deux auto-anticorps (FR et anti-CCP) est associée à une PR d'activité progressive et d'une forme érosive. De plus, nous avons confirmé l'association de l'allèle HLA DRB1*04 dans la prédisposition et la sévérité de la maladie.

D'autres études, portant sur un plus grand échantillon, sont nécessaires pour confirmer ou infirmer l'implication de cet allèle dans la survenue de la PR dans notre population et la présence ou non d'autres gènes de prédisposition.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

Acheli D., Salleh S., Aiche M. , Ait-Belkacem H. , Kermezli A. , Metatla S., Amri S., Abbadi M. , Djoudi Alamanos H. (2010) : Les allèles HLA-DRB1 codant l'épitope-partagé (Shared-epitope : SE) et la susceptibilité à la polyarthrite rhumatoïde chez des patients Algériens. Société Française de Rhumatologie ; Ma 83.

Agarwal V, Singh R, Wiclaf, Chauhan S. (2008) : A clinical, electrophysiological and pathological study of neuropathy in rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol; 27:841–844.

Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawski-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovský J, Wolfe F, Hawker G.(2010) : Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis Rheum.; 62 : 2569-81.

Alsaeid K, Alawadhi A, Al-saeed O. (2006) : Human leucocyte antigen DRB1*04 is associated with rheumatoid arthritis in Kuwaiti patients. Joint Bone Spine ; 73:62–5.

Anatomy charts - Anatomy-Physiology - Medical specialties – Pathologies. Callimeda 2013. <http://www.natomimages.com/en/10-10>.

Atouf O., Benbouazzab K., Bricka C., Bzamib F., Bennania N., Amineb B., Hassounib N., Essakallia M. (2008) : Polymorphisme HLA et polyarthrite rhumatoïde précoce dans la population marocaine. Revue du Rhumatisme ; 75 : 824–830.

Balsa A, Cabezón A., Orozco G., Cobo T, Miranda-Carus E, López-Nevot M, Luis Vicario J, Martín-Mola E, Martín J and Pascual-Salcedo D. (2010) : Influence of HLA DRB1 alleles in the susceptibility of rheumatoid arthritis and the regulation of antibodies against citrullinated proteins and rheumatoid factor. Arthritis Research & Therapy ; 10 : 1186-2975.

Beavis PA, Gregory B, Green P . (2011) : Resistance to regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis can be bypassed by ectopic foxp3 expression in pathogenic synovial T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;108:16717-22.

Berglin E, Kokkonen H, Einarsdottir E, Agren A, Rantapaa Dahlqvist S. (2010) : Influence of female hormonal factors, in relation to autoantibodies and genetic markers, on the development of rheumatoid arthritis in northern Sweden: a case-control study. *Scand J Rheumatol* ; 39:454-60.

Chaiamnuay S, Bridges SL Jr. (2005) : The role of B cells and autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology* ;12 : 203-16.

Chen DY, Chen YM, Chen HH, Hsieh CW, Lin CC, Lan JL. (2011) : Increasing levels of circulating Th17 cells and interleukin-17 in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to anti-TNF- α therapy. *Arthritis Res Ther* ; 13: 126.

Cheng CP, Sytwu HK, Chang DM. (2011) Decoy receptor 3 attenuates collagen-induced arthritis by modulating T cell activation and B cell expansion. *J Rheumatol* ; 38 : 2522-35.

Collège français des enseignants universitaires de médecine physique et de réadaptation (COFEMER) : La polyarthrite rhumatoïde « Immunopathologie - réaction inflammatoire ». 23 Janvier 2013.

Combea B., Benessiano J., Berenbaum F., Cantagrel A., Daurès JP., Dougados M., Fardellone P., Fautrel B., Flipshutz RM., Goupille P., Guillemin F., Le Loet X., Logeart I., Mariette X., Meyer O., Ravaud P., Rincévala N., Saraux A, Schaeffer T., Sibilia J.(2007) : La cohorte Espoir : un suivi de dix ans des arthrites débutantes en France. *Revue du Rhumatisme* ; 74 : 838–844.

Di W, Chang Y, Wu YJ, Wei W. (2011) Research progress on B cell surface molecules targeted therapy in rheumatoid arthritis. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* ; 42 : 175-80.

Fakhfakh Karray E., Bendhifallah I., BenAbdelghani K., Hamzaoui K. and Zakraoui L. (2011) : Tumor necrosis factor gene polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis in regional Tunisian population. *Journal of Infectious Diseases and Immunity* ; 3 : 30–35.

Forslind, K., Ahlmen, M., Eberhardt, K. (2004) : Prediction of radiological outcome in early rheumatoid arthritis in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP). *Ann Rheum Dis* ; 63 : 1090-1095.

Gregersen K, Silver J, Winchester RJ. (1987) : The shared epitope hypothesis an approach to understanding the molecular genetic of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* ; 30:1205–13.

Hameed K, Bowman S, Kondeastis E. (1997) : The association of HLA-DRB genes and the shared epitope with rheumatoid arthritis in Pakistan. *Br J Rheumatol* ; 36:1184–8.

Hill, J. A., Southwood, S., Sette, A., Jevnikar, A. M., Bell, D. A., et al. (2003) : 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* ; 171 : 538-541.

Holoshitz J., De Almeida D. (2010) : A role for calreticulin in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *New York Academy of Sciences* ; 1749-6632.

Jansen AL. (2002) : Rheumatoid factor and antibodies to cyclic citrullinated peptide differentiate rheumatoid arthritis from undifferentiated polyarthritis in patients with early arthritis. *J Rheumatol* ; 29 : 2074–6.

Jansen LM, van der Horst-Bruinsma IE, van Schaardenburg D, Bezemer PD, Dijkmans BAC. (2001) : Predictors of radiographic joint damage in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* ; 60: 924-927.

Jawaheer D, Li W, Graham RR, Chen W, Damle A, Xiao X. (2002) : Dissecting the genetic complexity of the association between human leukocyte antigens and rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*; 71:585–94.

Karray E, Ben Dhifallah I, Ben Abdelghani K, Ben Ghorbel I, Khanfir M, Habib Houman, Hamzaoui K, Zakraoui L. (2011) : Étude d'association des polymorphismes FokI et BsmI du gène récepteur de la vitamine D avec la susceptibilité à la polyarthrite rhumatoïde et à la maladie de Behçet dans la population tunisienne. *Revue du rhumatisme* ; 10 : 1016.

Kastbom, A., Strandberg, G., Lindroos, A., and Skogh, T. (2004) : Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). *Ann Rheum Dis* ;63: 1085.

Lebba F, Di Sora F, Tarasi A, Leti W, Montella F. (2011) ; Rheumatoid arthritis: a typical multifactorial genetic disease: review of the literature. *Recenti Prog Med* 102:175-82.

Meyer, Service de rhumatologie, CHU Bichat. Cours DCEM3. Polyarthrite rhumatoïde. 20/03/2011. <http://www.rhumatologiebichat.com/Cours/20D3/20PR/202011.pdf>.

Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, Habibuw MR, Vandenbroucke JP, Dijkmans BA. (2004) : Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* ; 50 : 380-6.

Olsson LM, Nerstedt A, Lindqvist AK . (2012) : Copy number variation of the gene NCF1 is associated with rheumatoid arthritis. *Antioxid Redox Signal* ; 16:71-8.

Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, Saigo K, Morinobu A. (2007) : Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* ; 11:797-808.

Polyarthrite rhumatoïde : Etiologie, diagnostic, évaluation principes de traitement et surveillance. Cours DCEM- Polyarthrite rhumatoïde. 20 Mars 2013.

Quirke AM, Fisher BA, Kinloch AJ, Venables PJ. (2011) : Citrullination of autoantigens: upstream of TNF α in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. FEBS Lett;585:3681-8.

Raissouni N Gossec L Ayrat X Dougados M. (2005) : Quelles nouveautés dans le diagnostic et le traitement d'une polyarthrite rhumatoïde récente. Rev Rhum ; 72 : 195-200.

Saber T, Veale DJ, Balogh E. (2011) : Toll-like receptor 2 induced angiogenesis and invasion is mediated through the Tie2 signalling pathway in rheumatoid arthritis. PLoS One ; 6 : 23540.

Schwalfenberg Gerry K., (2012) : Solar Radiation and Vitamin D : Mitigating Environmental Factors in Autoimmune Disease. Department of Family Medicine, University of Alberta, ; 301 : 9509-156.

Shimane K., Kochi Y., Suzuki A., Okada Y. (2013) : An association analysis of HLA-DRB1 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in a Japanese population: effects of *09:01 allele on disease phenotypes. RHEUMATOLOGY ; 53 : 1093-427.

Shotorbani SS, Su ZL, Xu HX. (2011) : Toll-like receptors are potential therapeutic targets in rheumatoid arthritis. World J Biol Chem; 2:167-72.

Siala M. , Fourati H. , Mahfoudh N. , Gdoura R. , Younes M. , Kamoun A. , Gaddour L. , Cheour E. , Meddeb N. , Baklouti S. , Bergaoui N. , Sellami S. , Makni H. , Hammami A.. (2007) : Prévalence des antigènes HLA classe I et II et profil évolutif des patients atteints d'arthrites réactionnelles et d'oligoarthrites indifférenciées en Tunisie. Revue du rhumatisme ; 74 : 1164-1165.

Snir O, Rieck M, Gebe JA. (2011) : Identification and functional characterization of T cells reactive to citrullinated vimentin in HLA-DRB1*0401-positive humanized mice and rheumatoid arthritis patients. Arthritis Rheum ; 63: 2873-83.

Strand V., Kimberly, R. (2007) : Biologic therapies in rheumatology : lessons learned, future directions. NATURE REVIEWS/DRUG DISCOVERY ; 10 : 1038-2196.

.Standfield L, Norris S, Harvey C, Elliot L, Riordan J, Hall S, Day R, Nash P, Thirunavukkarasu K, Robertson J, Palmer T.(2010): Relationship between rheumatoid arthritis disease severity, health-related utility, and resource use in Australian patients: A cross-sectional, multicenter study. 32 : 1329-42.

Stastny P. (1978) : Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. N Engl J Med ; 298 : 869–71.

Stastny P. (1976) : Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. The American Society for Clinical Investigation ; 57:1148–1157.

Tobon Gj, Youinou P. (2009) : The environment, geo-epidemiology, and auto-immune disease. Rheumatoid arthritis. Autoimmune Rev ; 9 : 288-92.

Van der Helm-van Mil A., Linn-Rasker F., Gaalen A., Kloppenburg M., de Vries R., le Cessie S., Breedveld F., Toes R., and Huizinga T. (2006) : Smoking is a risk factor for anti-CCP antibodies only in rheumatoid arthritis patients who carry HLA-DRB1 shared epitope alleles. Ann Rheum ; 65 : 366–371.

Van der Helm-van Mil A., Verpoort K., le Cessie S, Huizinga T., de Vries R., Toes R. (2007) : The HLA-DRB1 shared epitope alleles differ in the interaction with smoking and predisposition to antibodies to cyclic citrullinated peptide. Arthritis Rheum ; 56 :425-32.

Van der Helm-van Mil AH, Huisinga T, Scheurder G. (2005) : An independant role of protective HLA class II allele in rheumatoid arthritis severity and susceptibility. Arthritis Rheum ; 52 : 2637–44.

Van der Helm-van Mil AH , Knevel R., Cavet G. , Huisinga T and Douglas J. (2013) : An evaluation of molecular and clinical remission in rheumatoid arthritis by assessing radiographic progression. Oxford Journals ; 10 : 1093-378.

Vencovsky J., Machacek S., Sedova L., Kafkova J., Gatterova J., Pesakova V., Rusickova S. (2003) : Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis ; 62 : 427-30.

Vittecoq, O., Jouen-Beades, F., Tron, F., Daragon, A., Le Loet, X., Krzanowska, K., Pouplin, S, Gayet, A, Menard, J F. (2003) : Rheumatoid factor is the strongest predictor of radiological progression of rheumatoid arthritis in a three-year prospective study in community-recruited patients. Published in *Rheumatology (Oxford, England)* ; 42 : 1462-0324.

Walther J. van Venrooij and Albert J. W. Zendman. (2008) : Anti-CCP2 Antibodies: An Overview and Perspective of the Diagnostic Abilities of this Serological Marker for Early Rheumatoid Arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol* ; 34 : 36–39.

Yeo L, Toellner KM, Salmon M. (2011) : Cytokine mRNA profiling identifies B cells as a major source of RANKL in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* ;70:2022-8.

Zanelli E, Jones G, Pascual M, Eerligh P, Van der Slik AR, Zwinderman AH. (2001) : The telomeric part of the HLA region predisposes to rheumatoid arthritis independently of the class II loci. *Hum Immunol* ; 62:75–84.