



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
scientifique



Université de BLIDA1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

MEMOIRE DE MASTER EN BIOLOGIE

Option : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Chef d'option : Dr SAADI L

Sous le Thème :

**Apport de l'isotype IgA du facteur rhumatoïde et de l'anti-CCP dans le
diagnostic de la Polyarthrite Rhumatoïde**

Présenté par :

Djida Nawel

Soutenu le : 18/07/2019 Devant le jury composé de :

Mme Challal N.H

Mme Rahim I

Mr.Smara M

Mme Mokrane A

MCB USDB1

MCB USDB1

MCA HCA Ain Naadja

MCB USDB1

Présidente

Examinatrice

Promoteur

Co-promotrice

2018/2019

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier en premier lieu Allah le miséricordieux de nous avoir donné la santé et le courage afin d'accomplir ce travail et avoir permis d'atteindre la fin de notre formation

Au terme de ce mémoire, je souhaite exprimer ma gratitude à **Mme CHAIB** Chef de service du laboratoire d'Immunologie de l'HCA de m'avoir accueilli dans son institut et de m'avoir permis de travailler dans de bonnes conditions.

J'adresse mes sincères remerciements à mon promoteur **Dr.Smara** Maître-Assistant (HCA Ain Naadja) je le remercie pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu diriger ce travail. Votre compétence, votre dynamisme, votre rigueur et vos qualités humaines et professionnelles ont suscité en nous une grande admiration et un profond respect. Je voudrai être digne de la confiance que vous m'avez accordée et je prie, chère Maître, de trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et profonde gratitude.

Je remercie sincèrement ma co-promotrice : **Mme MOKRANE** Maître Conférence B

Mes vifs remerciements aux membres du jury **Mme Challal N.H** Maître Conférence B présidente **Mme. RAHIM.I.** Maître Conférences B (USDB1) examinatrice, pour leurs efforts afin de lire et examiner ce travail.

A tout le personnel du laboratoire d'immunologie de l'HCA pour leur gentillesse. Merci pour votre support et vos encouragements, en particulier : D.Radia, G.Ouarda, M.Souad

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près et de loin à son élaboration.

Dédicace

Je dédie ce travail

A mes très chers parents

*A mes sœurs et mes frères (Mohamed Djamel Ahmed f.zahra Melissa
Wisseem) et à mon frère adoré Adlen*

*A toute ma famille et mes chères amies (Nadia Nawèl radia Meriem et à
mes coup de cœur Asma et Ratiba)*

NAWEL

Résumé

La polyarthrite rhumatoïde est le rhumatisme inflammatoire chronique le plus fréquent. Elle est caractérisée par une inflammation symétrique des membranes synoviales des articulations pouvant entraîner leur destruction qui sont à l'origine d'une invalidité fonctionnelle.

Le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde est basé principalement sur la recherche des auto-anticorps : le facteur rhumatoïde IgM et les anti-CCP IgG/IgA. L'objectif de cette étude est de mesurer les isotypes IgM et IgA des FR et IgG/IgA des anti-CCP chez des patients atteints de la PR afin d'évaluer leur intérêt dans le sérodiagnostic de cette maladie.

La recherche des anticorps anti-peptide cyclique citruliné IgG/IgA et le facteur rhumatoïde IgM et IgA ont été réalisés via enzyme-linked immunosorbent assay chez 64 patients atteints de la PR. Les résultats de ces tests ont été étudiés par comparaison entre les différents paramètres.

Les résultats sérologiques : 27 patients (42,18%) sont des FR IgM positifs, 34 patients sont anti-CCP IgG positifs. 43 patients (67,18%) sont FR IgA positifs.

Le dépistage de multiples spécificités d'auto-anticorps tel que le facteur rhumatoïde IgA et les différents isotypes de l'anti-CCP augmente la puissance du diagnostic et peut fournir des informations supplémentaires sur le pronostic.

Mots clés : Polyarthrite rhumatoïde, Facteurs rhumatoïdes, anticorps anti peptide cyclique citruliné, enzyme-linked immunosorbent assay.

Abstract

Rheumatoid arthritis is the most common chronic inflammatory rheumatism. It is characterized by a symmetrical inflammation of the synovial membranes of the joints which can lead to their destruction which are at the origin of a functional disability.

The diagnosis of rheumatoid arthritis is mainly based on the search for the autoantibodies : rheumatoid factor IgM and anti-CCP IgG / IgA. The objective of this study is to measure the IgM and IgA isotypes of FR and IgG / IgA of anti-CCP in RA patients in order to assess their interest in the diagnosis of this disease.

The search for anti- cyclic citrullinated peptide antibodies IgG / IgA and the rheumatoid factor IgM and IgA was searched via enzyme-linked immunosorbent assay in 64 patients with RA. The results of these tests were studied by comparison between the different parameters.

Serological results: 27 patients (42.18%) are FR IgM positive, 34 patients are anti-CCP IgG positive. 43 patients (67.18%) are FR IgA positive.

Screening for multiple specificities of autoantibodies such as rheumatoid factor IgA and different anti-CCP isotypes increases the power of the diagnosis and may provide additional information on the prognosis.

Keywords: Rheumatoid arthritis, Rheumatoid factors, anti- cyclic citrullinated peptide antibody, enzyme-linked immunosorbent assay.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Atteinte articulaire dans la polyarthrite rhumatoïde.....	3
Figure 2 : La molécule HLA-DR4 et la position de la séquence EP (rouge).....	5
Figure 3 : Polyarthrite rhumatoïde débutante, avec gonflement fusiforme des articulations PIP.....	8
Figure 4 : Arthrite en phase d'état déviation ulnaire, subluxation du MCP et atrophie du muscle intera-osseux).....	9
Figure 5 :Schéma d'une articulation normal et une arthrite	11
Figure 6 : Activation des LT dans la polyarthrite rhumatoïde.....	12
Figure 7 : Rôles des cytokine dans la pathogénèse de la polyarthrite rhumatoïde.....	14
Figure 8 : Physiopathologie de la PR.....	15
Figure 9 : Mécanisme de destruction osseuse	16
Figure 10 : La voie pathogénique de développement de la PR.....	17
Figure 11 : Le rôle immunologique des facteurs rhumatoïdes dans la polyarthrite rhumatoïde.....	20
Figure 12 : Le rôle du facteur rhumatoïde dans la polyarthrite rhumatoïde.....	21
Figure 13 : Mécanisme de citrullination des protéines.....	23
Figure 14 : citrullination des protéines et sécrétion des ACPA.....	24
Figure 15 : Principe de la technique ELISA.....	26
Figure 16 : Analyse des billes dans le fluorimètre en flux.	29
Figure 17 : La répartition des patients PR selon le sexe	32
Figure 18 Histogramme représentatif des différentes tranches d'âge chez les malades PR.....	33
Figure 19 résultats sérologique chez les malades et les témoins.....	34
Figure 20 . Résultats de la sérologie l'anti-CCP IgG chez les mal.....	35
Figure 21 : Représentation de la corrélation FR IgM/anti-ccp IgG en nuage de point.....	37
Figure 22 : Représentation de la corrélation FR IgA/anti-ccp IgG en nuage de point.....	38

Figure 23 : Histogramme des résultats sérologique des facteurs rhumatoïdes IgM/IgA chez les malades.....39

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Résultats de facteur rhumatoïde isotype IgA chez les malades et les témoins.....34

Tableau 2 : Résultats de l'anti-CCP IgG par rapport les anti-CCP IgG/IgA chez malades.....35

Tableau 3 : Corrélation de FR IgM et l'Anti-CCP IgG.....36

Tableau 4 : Corrélation entre le FR IgA et l'Anti-CCP IgG.....37

Tableau 5 : Comparaison du facteur rhumatoïde IgM et IgA.....38

TABLEAU ANNEXE

Annexe 1 Les articulations.....1
Annexe 1 : Rôles des cytokines dans la PR.....2
Annexe 1 : Tableau 1 : Critères de classification de la polyarthrite rhumatoïde ACR-EULAR en 2010.....4
Annexes 2 : Les kits.....5
Annexe 3 : Les plaques à microtitration.....6
Annexe 4 : Analyseur Luminex XY 200.....8

Sommaire

Introduction	1
I. Synthèse bibliographique	
1. Définition de la polyarthrite rhumatoïde.....	3
2. Epidémiologie de la polyarthrite rhumatoïde.....	4
3. Etiologie de la polyarthrite rhumatoïde.....	4
3.1. Les facteurs génétiques.....	4
3.2. Les facteurs épigénétiques.....	6
3.3. Les facteurs environnementaux.....	6
3.4. Les facteurs immunologiques.....	7
3.5. Les facteurs psychologiques.....	7
4. Aspects cliniques de la polyarthrite rhumatoïde.....	7
4.1. Phase débutante.....	7
4.2. Phase d'état.....	8
5. Physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde.....	10
5.1. Phase d'initiation.....	10
5.2. Phase de recrutement cellulaire et d'inflammation.....	10
5.3. Prolifération synoviale et destruction articulaire.....	15
5.4. Phase de réparation.....	17
6. Diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde.....	17
6.1. Examens cliniques.....	18
6.2. Examens radiologiques.....	18
6.3. Examens biologiques.....	18
6.3.1. Les marqueurs inflammatoires.....	19
6.3.2. Examens sérologiques	19
a.Facteur rhumatoïde.....	19
b.Les anticorps anti-protéines citrullinées.....	22

II. Matériel et Méthodes.....	
1. Matériels non biologiques.....	25
2. Matériels biologiques.....	25
3. Méthodes.....	26
3.1. La recherche du facteur rhumatoïde class IgA et des anti-ccp3IgG et IgA via l'immunofluorescence indirecte ELISA.....	26
3.2. Le principe de recherche du facteur rhumatoïde IgA via la firme EUROIMMUN IgA rheumatoid factor ELISA.....	27
3.3. La recherche des facteurs rhumatoïdes IgM par immunofluorimétrie en flux (technologie luminex).....	28
III. Résultats et Discussion.....	
1. Caractéristique de la cohorte.....	31
2. Distribution des patients PR selon l'âge et le sexe.....	31
2.1. sex-ratio.....	31
2.2. distribution de la PR en fonction de l'âge.....	32
3. Etude des résultats la recherche des facteurs rhumatoïdes IgM/IgA et les ACPA IgG/IgA.....	33
3.1. résultats sérologique du facteur rheumatoid isotype IgA chez les malades par apport les témoins.....	34
3.2. comparaison des anti-CCP IgG/IgA par apport les témoins.....	35
3.3. Comparaison des anti-CCP IgG/IgA et anti-CCP IgG.....	36
3.4. Comparaison du FR IgM et de l'Anti-CCP IgG.....	36
3.5. Comparaison du FR IgA et de l'Anti-CCP IgG.....	37
3.6. Comparaison du Facteur Rhumatoïde.....	38
Conclusion et perspectives.....	41
Références bibliographiques.....	
Annexes.....	

Les maladies rhumatismales auto-immunes forment un groupe hétérogène de troubles caractérisés par un dérèglement du système immunitaire, entraînant une lésion tissulaire. Ces conditions présentent des défis en termes de diagnostic et de gestion.

Une meilleure compréhension de la pathogénèse, de nouveaux marqueurs de diagnostic et de la disponibilité de traitements biologiques ciblés. A toutefois amélioré les perspectives pour les patients **(Giles et Salama , 2018)**.

Parmi les maladies rhumatismales auto-immunes les plus fréquentes, on retrouve la polyarthrite rhumatoïde (PR) qui est un rhumatisme inflammatoire chronique. Elle est caractérisée par une inflammation qui touche la membrane synoviale conduisant progressivement à une déformation articulaire, puis une destruction du cartilage et de l'os au niveau des articulations. Cette maladie peut s'accompagner des manifestations extra-articulaires en entraînant des troubles pulmonaires ou cardiovasculaires ayant parfois des répercussions sur le pronostic vital du patient **(Musset et al., 2013)**.

La PR est une maladie extrêmement hétérogène dont sa pathogénèse comprend plusieurs scénarios, principalement l'interaction entre les facteurs génétique et environnemental, et une dérégulation du système immunitaire. ces facteurs seront le mécanisme déclencheur des déficients évènement (hyperplasie et la destruction osseuse) qui se déroulent au niveau de la membrane synovial conduisant à un gonflement et déformation des articulations et à une inflammation systémique **(Picerno et al., 2015 ; Derksen et al., 2017)**.

Lorsque les symptômes durent moins de 6 mois, la PR est considéré comme débutante. et dont la durée symptomatique est présente depuis plus de six mois elle est définie comme une polyarthrite rhumatoïde établie. Ayant une activité faible, modérée ou bien élevée, la prise en charge et le suivi thérapeutique doivent être précoce, personnalisée et efficace **(Krtati , 2019)**.

La PR est classé parmi les maladies auto-immunes, en raison de nombreux signes d'auto-réactivité, cela est expliqué par la présence d'auto-anticorps tels que les anticorps anti-peptides cyclique citrullinés (Anti-CCP) et les facteurs rhumatoïdes (FR).

La progression de l'activité de la maladie et l'analyse des facteurs de diagnostic et de pronostic se dévoilent des composants très importants dans le choix de la stratégie thérapeutique personnalisée à adapter, pour empêcher la dégradation articulaire et le handicap fonctionnel ultérieur.

Dans ce présent travail, nous sommes intéressées dans la recherche des facteurs rhumatoïdes appartenant à la classe IgA et anticorps anti-CCP chez les patients atteints de la PR afin d'évaluer leur intérêt dans le diagnostic de la PR. L'étude est basée sur la technique ELISA. La question qui se pose alors, est de savoir si au vu des données de la littérature et de la pratique, les FR d'isotypes IgA et les anti-CCP ont-ils véritablement un intérêt dans le

diagnostic séro-immunologique d'une polyarthrite rhumatoïde, c'est dans ce contexte que ce travail a été proposé à Hôpital de Ain Naâdja d'Alger.

Notre travail comporte trois chapitres. Le premier chapitre présent des rappels bibliographiques sur la polyarthrite rhumatoïde, le matériel et les techniques utilisés ont été décrite dans le deuxième chapitre. Les résultats obtenus sont rapportés et discutés dans le troisième chapitre.

A la fin, une conclusion et des perspectives sont présentées.

1. Définition de la polyarthrite rhumatoïde (PR)

+

La PR est un trouble inflammatoire chronique d'articulations d'étiologie multifactorielle, dans lesquelles le tissu cible principal est la membrane synoviale des articulations (**Figure 1**) (**Harris, 1990**).

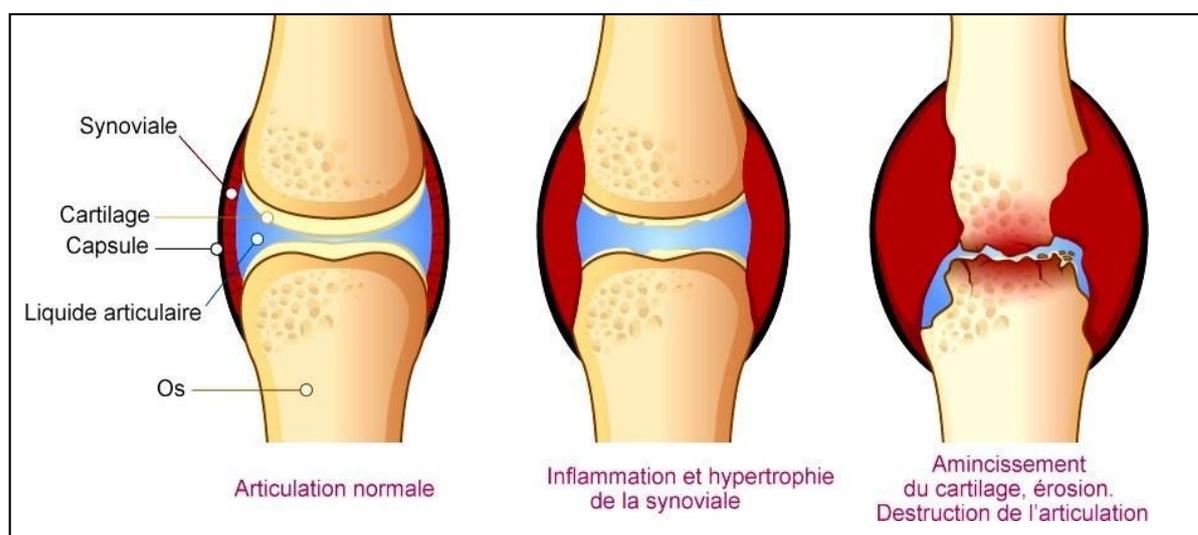


Figure 1 :Atteinte articulaire dans la polyarthrite rhumatoïde (**Aleth et al, 2019**)

Etant donné que la PR est une maladie auto-immune, l'organisme ne reconnaît plus la membrane synoviale de l'articulation (**annexe 1**) comme étant du soi et réagit contre lui. Le processus immunoinflammatoire systémique, conduit par les cytokines et d'autres médiateurs inflammatoires favorisent l'activation et la prolifération des tissus au niveau des articulations, et provoquant ainsi son épaissement que l'on appelle pannus synovial. Cette synovite peut entraîner des destructions articulaires voire osseuse. (**Kazuhiko , 2015**).

La PR peut engendrer des manifestations extra-articulaires, telles que les nodules rhumatoïdes, les complications systémiques impliquant des troubles pulmonaires ou cardiovasculaires, et la comorbidité systémique. Il s'agit d'une maladie multifactorielle dont les causes exactes ne sont pas encore connues, dont sa pathogénèse implique plusieurs scénarios, principalement l'interaction entre les facteurs génétiques et environnementaux. La perte de la tolérance immunitaire, soit chez les individus génétiquement prédisposés, ou bien due à l'activation répétée et aberrante de la réponse immunitaire innée et adaptative ainsi la présentation abusée des auto-antigènes.

2. Epidémiologie de la polyarthrite rhumatoïde

L'incidence de la PR (le taux de nouveaux cas survenant dans une période donnée) est de 0,1–0,2 pour 1000 chez les hommes et 0,2–0,4 pour 1000 chez les femmes.

En Algérie, la prévalence de la PR était significativement plus élevée chez les femmes que chez les hommes (0,25% vs 0,02%). La prévalence ajustée sur l'âge et le sexe pour l'ensemble de la population algérienne a été estimée à 0,15% (**Slimani et Ladjouze-Rezig, 2014**).

Cette variance à travers les frontières géographiques reflète probablement des facteurs environnementaux et des déterminants sociodémographiques distincts, ainsi qu'un éventail de mélanges génétiques.

3. Etiologie de la polyarthrite rhumatoïde

Mécanisme de déclenchement du processus pathologique reste inconnu. Toutefois, l'initiation est multifactorielle et commence des années avant l'établissement, une combinaison des facteurs génétiques (HLA DRB1 épitope partagé, PADI, PTPN22...) et environnementales (tabagisme, infection, ...) contribue à l'activation d'une réponse immunitaire innée et acquise incontrôlée qui se traduit par une réaction inflammatoire exagérée, en particulier au niveau de la membrane synoviale qui est l'origine de la pathogénèse et les signes cliniques de la PR.

- **Les facteurs génétiques**

Plusieurs facteurs jouent un rôle important dans le développement de la PR, dont le risque est déterminé par la susceptibilité génétique associée à des facteurs environnementaux. D'une manière particulière la période « préclinique de la PR » qui est caractérisée par la présence des auto-anticorps et l'absence des manifestations cliniques pendant une durée, jusqu'à l'établissement de l'inflammation articulaire (**Deane et El-Gabalawy, 2014**). Plusieurs études ont fortement suggéré que la génétique est impliquée dans la susceptibilité, le développement et la sévérité de la polyarthrite rhumatoïde, en particulier l'augmentation de la prévalence de la PR au sein d'une famille dont le risque est de ~40-50% PR séropositive, et les études effectuées sur des jumeaux ont révélé un risque de 50-60% (**Frisell et al., 2016**).

□ □ Le système HLA

À la fin des années 1970 et au début des années 1980, plusieurs études ont déterminé une forte association entre les deux gènes HLA-DR qui sont le principal facteur génétique de susceptibilité.

Présent sur le chromosome 6, et la plupart des allèles HLA DRB1 prédisposant à la PR (allèles HLA DRB1 * 01, * 04 et * 10) partagent une séquence spécifique d'acides aminés (position 71 à 74) dans la chaîne B1 liaison aux peptides (**Figure 2**). Le gène HLA-

DRB1 reste le plus connu et représenterait 30 % du risque génétique à développer une PR (Viatte et Barton, 2017).

Cette similarité de séquence a donné naissance à l'hypothèse « shared epitop ou SE » qui se présente entre la région de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et la susceptibilité à la PR (Huizinga *et al.*, 2005).

Les mécanismes moléculaires expliquant la sensibilité à la PR induite par HLA-DRB1 ne sont pas clairs, mais comprennent des modifications de la liaison à l'antigène, entraînant la liaison d'autoantigènes ou d'antigènes environnementaux, l'épitope partagé pourrait reconnaître un peptide du soi et favoriser dans le thymus la persistance d'un clone de lymphocytes T auto-réactifs par sélection clonale positive (Taylor et Narayan, 2018).

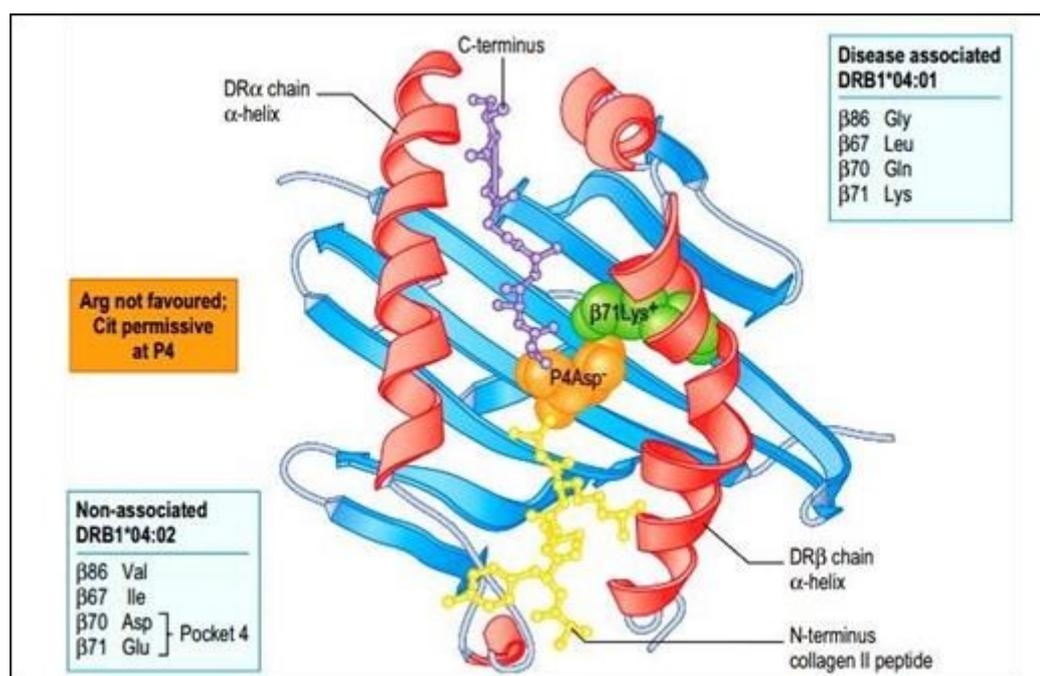


Figure 2 : La molécule HLA-DR4 et la position de la séquence EP (rouge) . La structure cristalline de HLA-DRB1 * 04: 01 / DRA1 * 01: 01 est complexée avec un peptide dérivé du collagène II humain (bleu) (Courtesy *et al.*, 1997).

□ □ Autres facteurs génétiques

En plus de la région HLA, et en parallèles avec l'apparition des techniques de biologie moléculaire, d'autres facteurs génétiques ont été déterminés et qui présente une association de 5% avec PR (Eyre *et al.*, 2012)

Le gène PTPN22

Le gène PTPN22 est le facteur de risque non-HLA le plus important pour la polyarthrite rhumatoïde. Dont les personnes atteintes sont plus susceptibles de développer une PR avec séropositivité pour les anticorps anti-protéines citrullinées ou le facteur rhumatoïde, et ont cette maladie à un âge plus précoce. PTPN22 code pour une protéine tyrosine

+

phosphatase qui inhibe la voie de signalisation dans les cellules T et favorise la production de l'interféron type I par les cellules myéloïdes via les PRRs (**Stephanie et Nunzio , 2015**).

Le gène PADI4

Le gène codant pour les peptidyl arginine déiminases (PADs), enzymes responsables de la citrullination des résidus arginine, qui sont à l'origine de l'apparition d'auto-anticorps spécifique de la PR (**Dand et François , 2005**) et impliqués dans l'initiation du phénomène d'auto-immunité, par conséquent d'autres associations existe avec les gènes des voies inflammatoires (exemple : CCR6, STAT4, IL-6, NF- kB...etc) (**Deane et al., 2017**). Cependant, une corrélation forte a été retrouvée dans la population Japonaise mais pas dans la population caucasienne.

- **Les facteurs épigénétiques**

Les facteurs épigénétiques peuvent servir d'intermédiaire entre les facteurs génétiques et environnementaux dans la PR. L'altération des différentes modifications épigénétiques (Méthylation d'ADN, modification des histones et l'expression des miARN) intervient dans l'inflammation des articulations, ainsi la modification des histones confère l'effet déclencheur du tabagisme, l'effet du traitement et le niveau d'expression des gènes cibles (**Klein K et Gay, 2015 ; Doody et al., 2017**).

- **Les facteurs environnementaux**

Plusieurs facteurs de risque d'environnement, le mode de vie, et les comportements ont été étudié pour leur association avec le développement de la PR. Toutefois, le tabagisme est le facteur le plus puissant et le plus identifié. Ainsi que d'autres facteur : le sexe féminin et implication des hormones, l'âge, pollution de l'air, exposition à la poussière de silice, et les infections virales et bactériens le stress... (**Woude et Helm-van Mil, 2018**).

- **Les facteurs immunologiques**

Il s'agit d'un dérèglement du système immunitaire et l'apparition d'auto-anticorps plusieurs années avant les premiers signes cliniques c'est la phase préclinique. Ces auto-anticorps (anti-CCP et FR) sont dirigés contre des anti-antigènes citrullinés. Ils sont un facteur essentiel de pathogénie de la maladie, la production des différentes cytokines et chemokines induit une activation/différenciation immunitaire adaptative et une perte de tolérance dans l'arthrite préclinique, et une transition vers la chronicité ou le maintien de la maladie et les différentes manifestations cliniques (**Deane et al., 2010 ; McInnes et al., 2017**).

- **Les facteurs psychologiques**

Ce facteur est présent principalement dans un second temps après l'établissement de la PR, ou il influence la qualité de vie du patient, l'aggravation des symptômes articulaires, la douleur, la fatigue (Katz, 2017), la détresse psychologique, y compris la dépression et l'anxiété, est fréquente chez les patients qui a un impact négatif important sur la réponse au traitement et sur la capacité des patients à faire face à une maladie chronique (Santiago *et al.*, 2015).

4. Aspects cliniques de la polyarthrite rhumatoïde

4.1. Phase débutante

En règle générale, les patients atteints de PR présentent une douleur et un gonflement polyarticulaires symétriques et articulaires, plus prononcés dans les articulations méta-carpophalangienne (MCP) et inter-phalangienne proximale (PIP) des mains. Autres sites fréquemment touchés au début de la maladie comprennent les poignets, les pouces et les articulations méta-tarsophalangiennes (MTP) des orteils (Figure 3).



Figure 3 : Polyarthrite rhumatoïde débutante, avec gonflement fusiforme des articulations PIP (De la bibliothèque d'images ACR, American College of Rheumatology, 2010)

L'arthrite des grosses et moyennes articulations peut se manifester tôt dans les coudes, les épaules, les chevilles et les genoux et est associée à une maladie plus grave (Linn-Rasker *et al.*, 2006).

Les symptômes de l'arthrite s'aggravent généralement le matin et les patients signalent plus de 30 minutes de douleur, de raideurs matinales, et d'autres symptômes tels que la fatigue, des myalgies, une perte de poids, une fièvre et, dans certains cas une dépression.

La clinique de la phase initiale est propre à chaque individu et peut ainsi débiter différemment :

(classé selon leur fréquences) (Wilfried , 2014) :

- Oligoarthritis distale (70%)
- Polyarthrite aiguë fébrile (20%)
- Atteinte prédominante de la ceinture scapulaire et du bassin (5%)
- Rhumatisme intermittent (rare)
- Monoarthrite (rare)
- Signes extra-articulaires (rares)

4.2. Phase d'état :

Cette phase est marquée par des atteintes articulaires et extra-articulaires. Les articulations touchées sont le siège d'une inflammation permanente. Cela se traduit par une tuméfaction articulaire, avec hydarthrose et parfois un épaissement considérable de la synoviale, et secondairement des lésions ligamentaires et ostéo-cartilagineuses et des déformations irréversibles (**Figure 4**).



Figure 4 : Arthrite en phase d'état déviation ulnaire, subluxation du MCP et atrophie du muscle intera-osseux (**De la bibliothèque d'images ACR, American College of Rheumatology, 2010**)

Au niveau des mains et des pieds

Dans 90 % des cas de PR, les articulations des mains et des pieds sont touchées et sont le siège des premières déformations. Ces altérations sont très variées et dans la plupart des cas, très handicapantes.

Au niveau des poignets

Les poignets sont fréquemment atteints dans la PR et ce jusqu'à 90 % des cas. On dénombre deux types d'altérations articulaires, généralement liées entre elles, et également associées aux déviations articulaires des doigts vues précédemment.

Au niveau des genoux

Plus de 50% des patients ont une atteinte des genoux se définissant par des épanchements articulaires, de possibles risques de désaxation et de dislocation de la rotule.

Les atteintes tendineuses

Les ténosynovites sont très caractéristiques de la pathologie. En phase d'état et contrairement à la phase débutante de la PR, elles sont relativement fréquentes. Leur apparition et leur répétition résultent de la ressemblance des tissus entre la membrane de la synovie et les gaines des tendons (**Wilfried , 2014**).

5. Physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde chronique, est le résultat d'un dysfonctionnement moléculaire et macromoléculaire et d'une dérégulation de l'entretien du processus immuno-pathologique, menant à l'hyperplasie des cellules synoviales vers la destruction du cartilage et de l'os, ce qui présente un problème thérapeutique majeur.

Plusieurs phases caractérisent l'évolution de la synovite rhumatoïde. Elles peuvent être individualisées de manière schématique, mais sont en réalité très intriquées :

Phase d'initiation

Recrutement cellulaire et inflammation

Prolifération synoviale et destruction de l'articulation □ phase de réparation.

5.1 Phase d'initiation

Muqueuses (l'épithélium des voies respiratoires, le tube digestive...) et dans le synovium, on tend actuellement à incriminer des auto-antigènes 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. Cela induit l'activation des macrophages, monocytes, les cellules dendritiques et les mastocytes « on parle d'une réponse immunitaire innée » (**Makrygiannakis et al., 2008; Swamy , 2017**). Ce qui cause la localisation au niveau des articulations reste inconnu, cependant il a été suggérée que des facteurs neurologique, biochimique, microvasculaire, ou d'autres propriétés lier au tissu peuvent être inclut dans le développement de la synovite (**Pitzalis et Garrood , 2006**). La cascade d'initiation va être accompagnée par une accumulation locale des monocytes et des macrophages, ainsi que les FLS, qui produisent des cytokines pro-inflammatoire (IL-1, TNF α et IL6...).

5.2. Phase de recrutement cellulaire et d'inflammation

Les cellules présentatrices d'antigènes : les cellules dendritique, les macrophages, les lymphocytes B : sont responsables de la présentation des antigènes aux lymphocytes T via

+

des molécules HLA de classe II (DR4 ou DR1 par exemple), qui sont indispensables au déclenchement d'une réponse immunitaire et à l'activation des lymphocytes T, ainsi que les molécules de Costimulation CD28.

Ces derniers contrôlent la production d'autres cytokines telles que les facteurs de croissance et les chimiokines, mais aussi les molécules d'adhésion qui interviennent dans la réaction inflammatoire en favorisant l'angiogenèse et le recrutement des cellules dans la

synoviale, Cette migration et l'attraction des lymphocytes dans l'articulation se fait grâce aux cellules endothéliales et aux molécules d'adhésion comme ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1), VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) ou encore ELAM (Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule) (**Figure 5**)

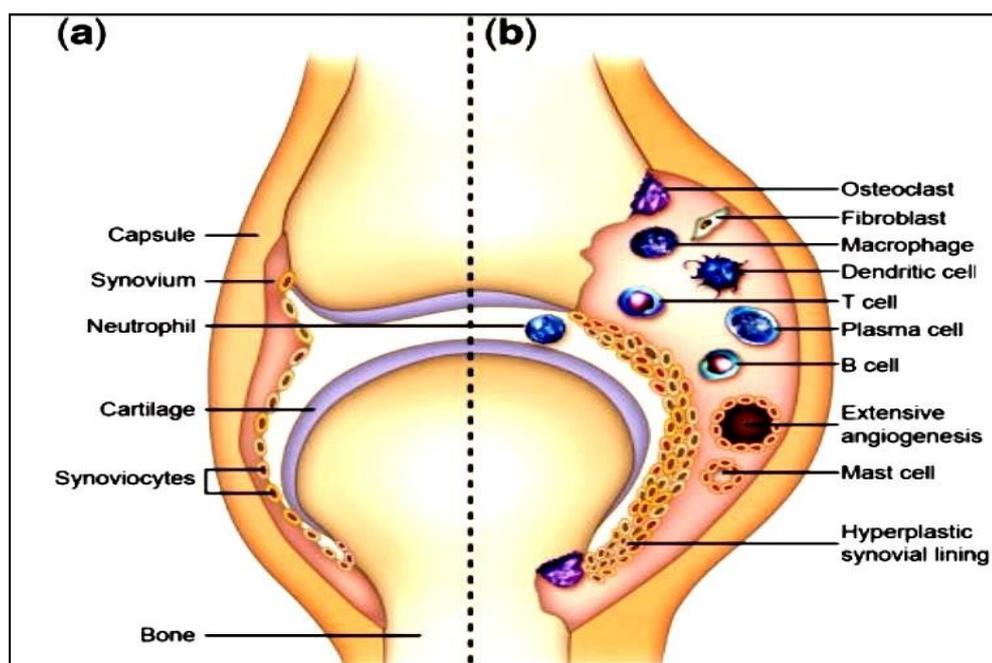


Figure 5 : Schéma d'une articulation normale et d'une arthrite.

➤ Les lymphocytes B

L'interaction des lymphocytes B avec les cellules présentatrices d'antigènes se fait via le récepteur BCR (+CD79a et CD79b avec leur motif ITAM) et les molécules de Co-récepteurs CD19/CD21, ces complexes vont permettre la transduction et l'amplification du signal d'activation, à travers la cascade de phosphorylation puis l'activation de la MAP kinase et aboutissant à l'activation de facteurs de transcription tels que NFκB pour initier la prolifération et la différenciation des cellules B circulantes ou localisées au niveau du tissu. Les lymphocytes B peuvent intervenir dans la pathologie de la PR à différents niveaux et via plusieurs mécanismes, l'activation des lymphocytes T et la synthèse de cytokines, et finalement se différencier en cellules productrices d'anticorps « plasmocyte », ayant le rôle de produire le facteur rhumatoïde IgM (IgA ou bien IgG) et des anticorps IgG (ou bien IgA) anti peptides cyclique citrullinés (anti-CCP) chez 60% à 80% des patients, ou leurs concentration est très élevée au niveau du liquide synovial (**Bugatti et al., 2014**).

➤ Les lymphocytes T

La physiopathologie de la PR est dominée par l'activation des lymphocytes auto-réactifs T au niveau du synovium des articulations touchées par la PR, dans lequel se trouve un grand nombre de lymphocytes T activés : Les lymphocytes T synovial expriment CD69, un marqueur d'activation précoce en corrélation avec l'activité de la maladie, et produisent le ligand CD40, responsable de la prolifération de la cellule B, production d'immunoglobuline (Ig), activation des monocyte et différenciation des CD. Les cellules T CD4⁺ des patients expriment CD45RO, qui caractérise les cellules T mémoire, tandis que le nombre de cellules T naïves synoviales est faible (**Hochberg *et al.*, 2009**).

Les cellules T CD4⁺ naïves ne sont ni du type Th1 ni du type Th2. Lorsqu'ils sont activées par un double signal (récepteur T de l'antigène (TCR)-CD3) des lymphocytes avec le complexe (CMHII-antigène) et (CD80/86, CD40) exprimées sur les cellules dendritiques et leurs ligands respectifs sur les lymphocytes (CD28, CD40), les cellules T CD4 sécrètent de faibles quantités d'IL2, d'IL-4 et d'IFN- γ . Cet état de différenciation s'appelle Th0 (**Nakamura *et al.*, 1997**). Les cellules Th 0 se polarisent vers les cellules la sous-population Th1, qui sécrète l'IL-2 et l'IFN- γ , intervient dans l'immunité à médiation cellulaire (avec activation des lymphocytes cytotoxiques), ou bien la sous-population Th 2 sécrète l'IL-4, et 10, intervient dans l'immunité à médiation humorale, par activation des lymphocytes B ainsi que la sous population Th 17, produisant l'IL-17, est une voie inhibée par l'IL-2, l'IFN γ et les IL4, 5, 10 et activée par la présence de TGF β , d'IL-6 et d'IL-23 (**Figure 6**) (**Abbas *et al.*, 1996**).

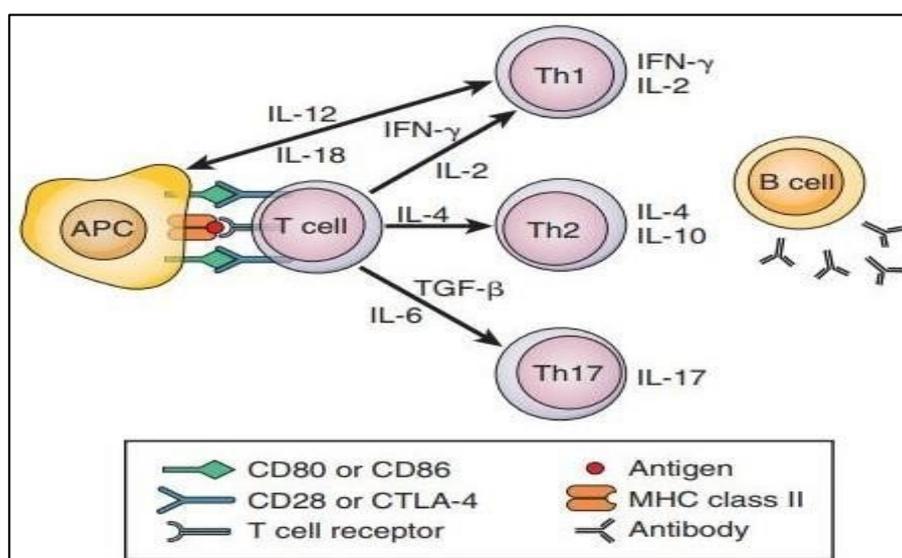


Figure 6 : Activation des LT dans la polyarthrite rhumatoïde (**Hochberg *et al.*, 2009**)

Plusieurs facteurs influencent la différenciation des cellules Th0 le long de la voie Th 1 ou Th2, y compris le milieu des cytokines dans lequel l'activation des cellules T a lieu, la concentration en antigène, les molécules co-stimulatrices, le type de CPA. En outre, l'évaluation des niveaux de cytokines dans le sang périphérique chez les patients atteints de PR

+

a donné des résultats variables, tels que des taux élevés d'IFN γ ou d'IL-4 chez des patients. Une explication pourrait être que la réponse immunitaire se convertit d'une cytokine Th1 en une cytokine Th2. tendance à différents moments de l'évolution de la maladie notamment la phase débutante et établie (**Schulze-Koops *et al.*, 1995; Hochberg *et al.*, 2009**).

- **Rôle des LTCD8+**

Les LT CD8+ sont une source de lymphotoxine α et β (LT α et LT β), deux cytokines qui appartiennent à la superfamille du TNF, et qui joue un rôle important dans la formation des structures lymphoïdes ressemblant aux follicules des organes lymphoïdes secondaires appelés centres germinatifs ectopiques (CGE) (**Weyand et Goronzy, 2006**).

- **Treg et Th17**

Lymphocytes T régulateurs (Treg CD4+ et CD25+) du sang périphérique et du liquide synovial des patients atteints de PR, bien que ils sont capable de supprimer la prolifération des lymphocytes T et entraînent l'apoptose des lymphocytes B et inhibent leur coopération avec les lymphocytes T, ils présentaient une capacité diminuée et une action défailante de supprimer la production de cytokines pro-inflammatoires ou l'arrête des B auto-réactifs (**Hochberg *et al.*, 2009**).

Les lymphocytes TH17 secrète IL-17 qui induit la sécrétion des médiateurs proinflammatoire, ces dernières vont réagir sure un ensemble de cellules ou il stimule la sécrétion de IL-6 et des prostaglandines E au niveau du tissu synovial, et il agit en synergie avec d'autres cytokine telle que : IL-1, TNF- α , IFN- γ , et CD40L (**Afzali *et al.*, 2007**).

- **Rôles des cytokines**

Les cytokines jouent un rôle crucial dans plusieurs processus biologiques tels que : la prolifération, différenciation des différentes cellules de l'immunité innée et aqoise. Pareille dans la pathogénèse de la PR, les cytokines sont les acteurs principaux de l'inflammation et de la destruction articulaire avec une prédominance des cytokines pro-inflammatoire (**Figure 7**).

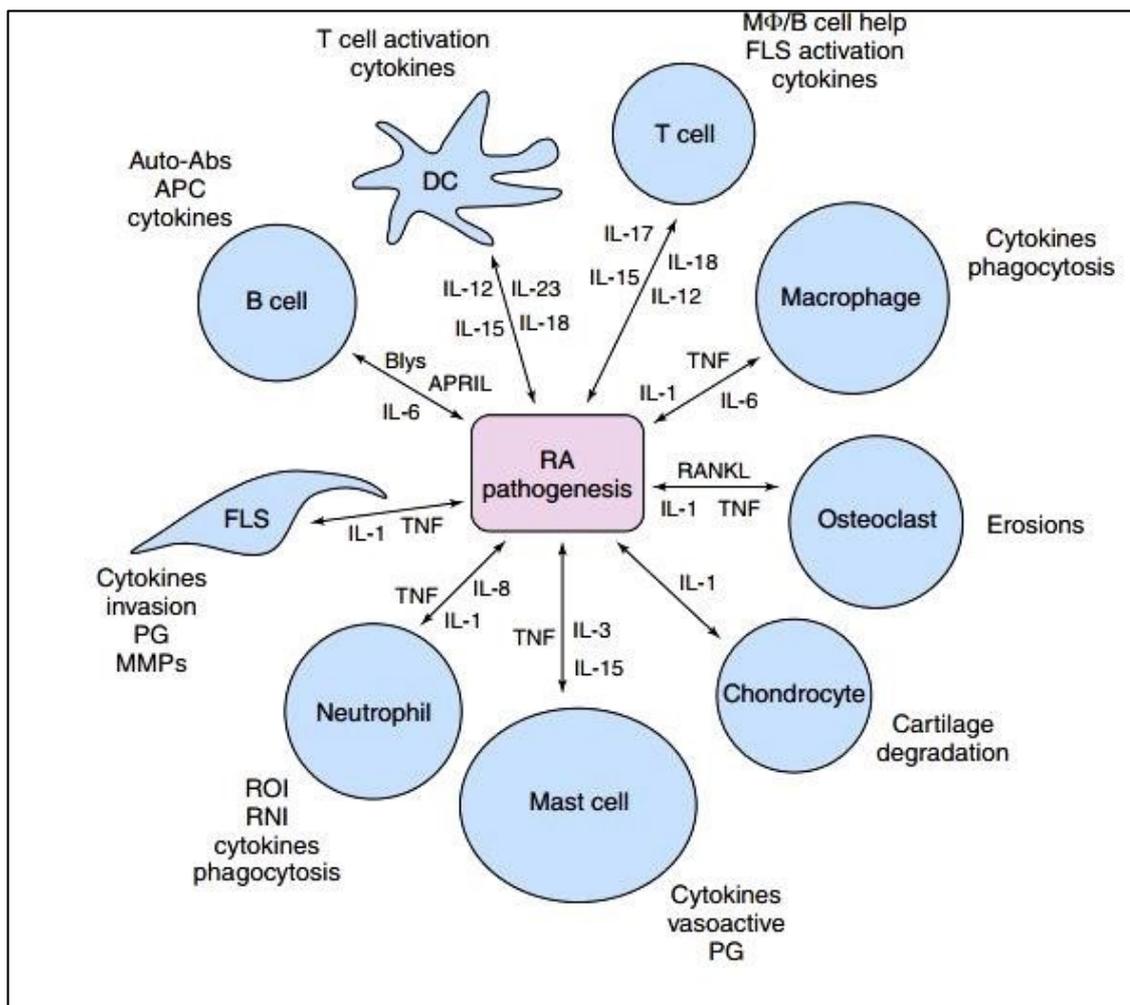


Figure 7 : Rôles des cytokines dans la pathogénèse de la polyarthrite rhumatoïde (Hochberg *et al.*, 2009)

Cette vague initiale d'inflammation a deux conséquences majeures. Premièrement, les cytokines inflammatoires vont favoriser l'activation de l'endothélium vasculaire suivie d'une infiltration et migration des leucocytes via les chimiokines, des changements qui surviennent très tôt dans la maladie (**Figure 8**), (**annexe 1**)

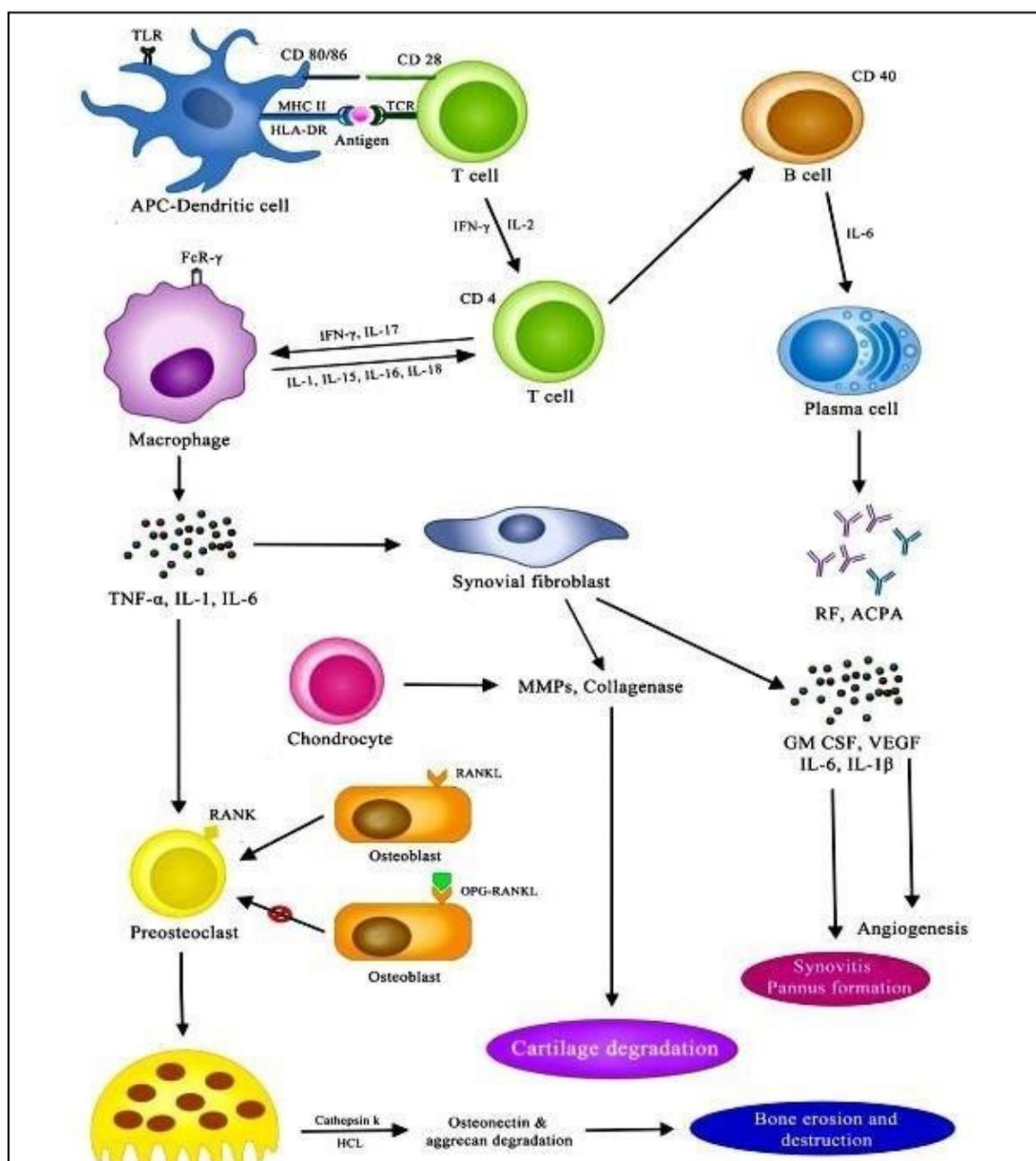


Figure 8 : Physiopathologie de la PR (Dinesh *et al.*, 2016)

5.3. Prolifération synovial et destruction articulaire

Sous l'influence de cytokines et de chimiokines générées localement, les veinules postcapillaires synoviales subissent des modifications morphologiques telles qu'elles ressemblent à des veinules endothéliales pareilles à celle observées dans les organes lymphoïdes secondaires.

L'augmentation de la vascularisation « angiogenèse » est caractérisée par une congestion vasculaire et une thrombose avec oblitération de petits vaisseaux en association avec des infiltrats inflammatoires péri-vasculaires. Ainsi que hyperplasie de la couche

synoviale « pannus », Le pannus synovial correspond à l'attachement des synoviocytes sur le cartilage grâce à diverses molécules d'adhésion 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.

Les ostéoclastes mature se fixent à la matrice osseuse et sécrète de l'acide chlorhydrique et une enzyme protéolytique, la cathepsine K, qui dégrade l'ostéonectine et l'aggrécane, ce qui entraîne une destruction chronique des articulations (**Figure 9**) (**Boyce et Xing , 2007**).

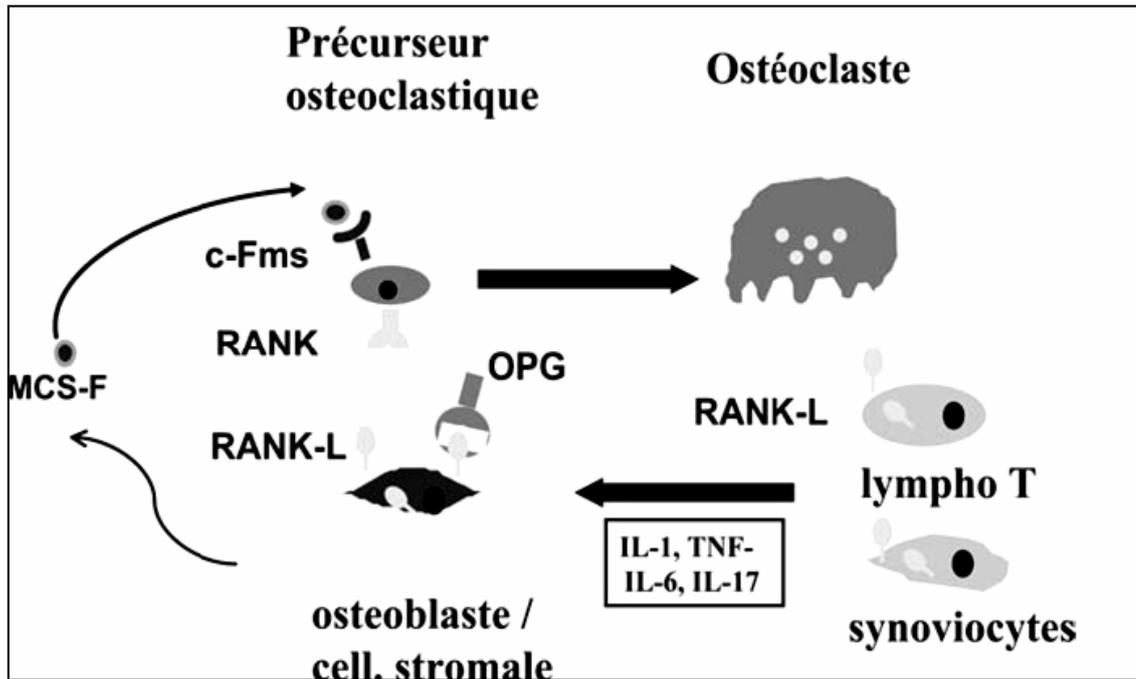


Figure 9 : Mécanisme de destruction osseuse (**Nathalie et al., 2003**)

Les cytokines pro-inflammatoires produites par les macrophages activés sont : TNF α , l'IL-1 et l'IL-6, qui stimulent également le fibroblaste synovial pour sécréter une enzyme métalloprotéinase (MMP) qui dégrade le cartilage (**Figure 10**).

Ces enzymes sont des biomarqueurs spécifiques de la destruction du cartilage dans la PR (**Fotopoulos et al., 2012**).

En plus, les ACPA peuvent également promouvoir directement l'ostéoclastogenèse, en fournissant un lien mécanique entre les auto-anticorps et la destruction articulaire, qui dépend également de l'état de glycosylation des IgG (**Harre et al., 2012**).

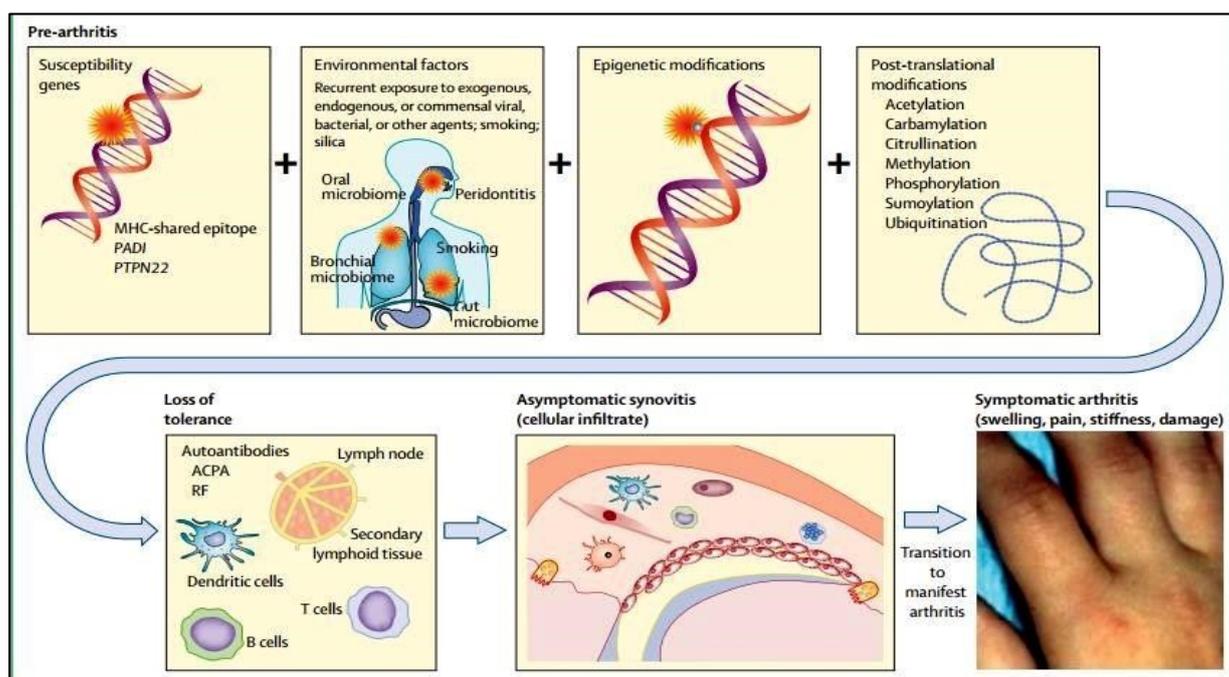


Figure 11 : La voie pathogénique de développement de la PR (Josef *et al.*, 2016)

5.4. Phase de réparation

Le processus inflammatoire, et ses effets sur la maturation et la fonction des ostéoblastes, a été directement impliqué car la formation osseuse sur les surfaces adjacentes à la moelle osseuse, par opposition à la synoviale enflammée, est relativement bien préservée.

La voie de signalisation Wnt est impliquée directement dans la réparation via l'ostéoblastogenèse, et indirectement via l'augmentation de la production d'OPG (ostéoprotégérine), un inhibiteur de RANKL (Schett *et al.*, 2005).

Cette phase fait intervenir des facteurs de croissance et le TGF β , elle se déroule en parallèle avec le processus de destruction mais malheureusement elle ne peut pas palier complètement les dommages.

6. Diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde

Le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde doit être aussi précoce que possible car c'est au stade du début de la maladie que les traitements ont le plus de chance d'être efficaces. Cette « fenêtre d'opportunité thérapeutique » est d'autant plus capitale qu'à ce stade de la maladie, il n'existe aucune déformation ou lésion radiologique. Son diagnostic repose sur trois objectifs majeurs :

- Identifier un rhumatisme inflammatoire débutant susceptible de correspondre à une PR.
- Evincer un autre rhumatisme inflammatoire défini
- Rechercher la présence d'éléments évoquant l'évolution vers une PR destructive.

En 2010, le Collège américain de rhumatologie (ACR) et la Ligue Européenne contre le rhumatisme (EULAR) ont présenté les critères les plus actuels pour le diagnostic de la PR (**Aletaha *et al.*, 2010**) (**Tableau 1, annexe 1**). Ces lignes directrices visent à identifier la PR parmi les patients présentant récemment une synovite dans au moins une articulation, contrairement au critère décrits en 1987 ayant une capacité d'identifier une PR établie (**Arnett *et al.*, 1998**).

Lorsque le score ACR/EULAR est $\geq 6/10$, en présence d'un tableau clinique incluant au moins une synovite et en l'absence d'élément orientant vers le diagnostic d'un autre rhumatisme inflammatoire, le diagnostic de polyarthrite rhumatoïde peut être posé par le rhumatologue. Il existe une association de plusieurs critères cliniques, biologiques et radiologiques (**Dinesh *et al.*, 2016**).

6.1 Examen clinique

Une atteinte articulaire importante peut entraîner des épanchements articulaires détectables, en particulier au niveau du genou. Un outil clinique couramment utilisé est le test de compression, une manœuvre dans laquelle les doigts des mains ou des pieds sont pressés à travers les articulations du MCP ou du MTP pour évaluer la douleur (**van den Bosch *et al.*, 2015**).

6.2 Examens radiologiques

EULAR (Ligue européenne contre le rhumatisme) a recommandé les modalités d'imagerie pour la polyarthrite rhumatoïde, dont la radiographie conventionnelle, l'échographie, l'IRM, le scanner, les rayons X et la scintigraphie (**Colebatch *et al.*, 2013**).

6.3 Examens biologiques

Le bilan biologique s'attachera à rechercher un syndrome inflammatoire avec le dosage de la protéine C réactive CRP et la vitesse de sédimentation VS, et surtout des facteurs plus spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde : facteur rhumatoïde (FR) IgM, Ac anti-peptides citrullinés ACPA.

6.3.1 Les marqueurs inflammatoires

Le dosage de la protéine réactive C (CRP) de la Vitesse de Sédimentation (VS) et la formule de numération sanguine (FNS) ont pour but de confirmer la présence d'un syndrome inflammatoire sans préciser l'étiologie de celui-ci, surtout au début de son évolution, en raison du caractère inconstant des signes biologiques, et du retard d'apparition des érosions articulaires radiologiques.

La VS sera augmentée et supérieure à 20mm à la 1ère heure, et la CRP dépassera les 10 mg/L. D'un point de vue FNS, le bilan peut révéler une thrombocytose inflammatoire, une anémie, une leuco-granulopénie (**Littlejohn et Monrad, 2018**).

D'autres examens (hémoculture, sérologie,..) pourront être demandés simultanément, afin d'écartier toute suspicion d'une autre pathologie.

6.3.2 Examens sérologiques

La polyarthrite rhumatoïde est associée à différents auto-anticorps, dont le facteur rhumatoïde (RF), le peptide anti-peptide citrulliné anticyclique (ACPA), l'anticorps anti-kératine (AKA), facteur anti-périnucléaire (APF) et le anticorps anti- filaggrine (AFA). Cependant, RF et ACPA sont des marqueurs couramment utilisés pour le diagnostic de la PR.

a. Le facteur rhumatoïde

Le FR est un anticorps anti-gammaglobuline qui appartient le plus souvent à la classe des IgM.

L'anticorps peut être aussi de type IgA, IgG, IgD. Quelle que soit la classe immunoglobuline de ces facteurs, leur point commun est d'être toujours dirigé contre le fragment Fc des immunoglobulines G humaines ou animales. Les méthodes sérologiques classiques de détection des FR ne mettent pratiquement en évidence que les FR de type IgM qui est seuls agglutinants (**Figure 12**) (**Combe, 2006**).

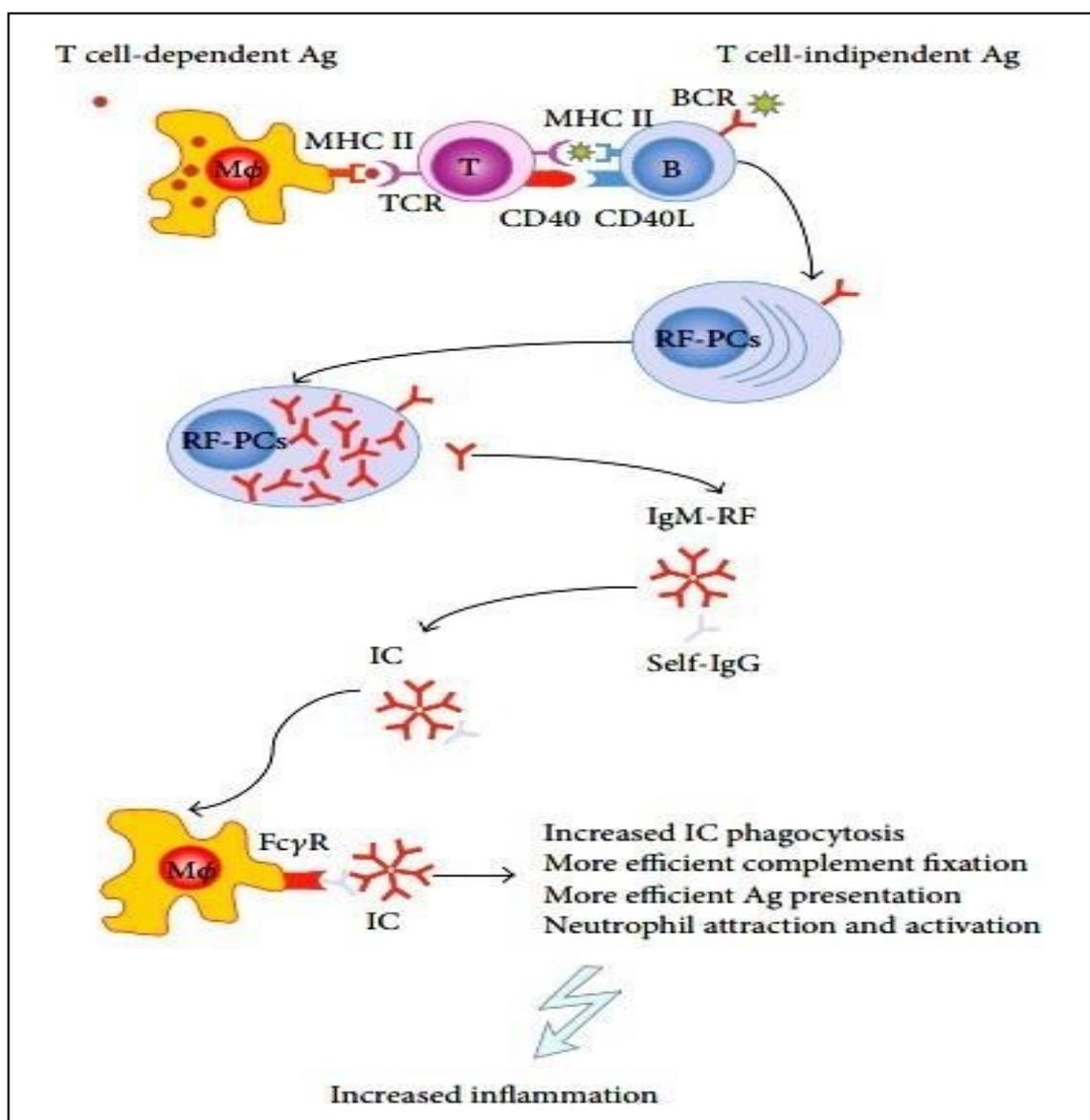


Figure 12: Le rôle immunologique des facteurs rhumatoïdes dans la polyarthrite rhumatoïde (Francesca *et al.*, 2013)

a.1 Rôle immunologique de facteur rhumatoïde

Un certain nombre d'hypothèses ont été postulées dans l'ordre d'expliquer le rôle clé possible des RF dans la PR, y compris leur capacité à augmenter l'élimination des complexes immuns par les macrophages, il est produit localement dans l'articulation dans les agrégats lymphoïdes par les plasmocytes, et associé à des érosions articulaires, et il forme des complexes immuns pathogènes dans le sang et les tissus.

Physiologiquement, ils sont soupçonnés de jouer des rôles dans la régulation de la réponse immunitaire et dans l'élimination des complexes immuns et potentialise l'immunité antivirale (Zvaifler, 1973; Haberman *et al.*, 2003).

+

a.2 Le rôle des FR dans le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde

Les isotypes FR sont utiles dans la prise en charge des patients atteints de PR depuis le diagnostic jusqu'au choix de la stratégie thérapeutique. Le test FR chez les patients atteints de PR a une sensibilité de 60% à 90% et une spécificité de 85% (Swedler *et al.*, 1997).

Une PR présentant des FR est dite “séropositives” par opposition aux PR “séronégatives” dans lesquelles ils sont absents. La présence de FR n’est ni indispensable ni suffisante pour affirmer le diagnostic. Le FR peut être présent chez certains sujets qui ne développeront jamais de PR comme chez des personnes saines.

a.3 Le rôle des FR dans le pronostic de la polyarthrite rhumatoïde

La détection des RF d'IgM est également utile en tant qu'indice pronostique, et certaines études ont montré qu'un traitement immunosuppresseur peut réduire les niveaux de RF sérique, dont des titres très élevés sont des marqueurs de mauvais pronostic surtout au début de la maladie. Cependant, l'utilité clinique des RF dans la surveillance de l'activité de la maladie et la réponse au traitement est limitée (Figure 13) (Francesca *et al.*, 2013).

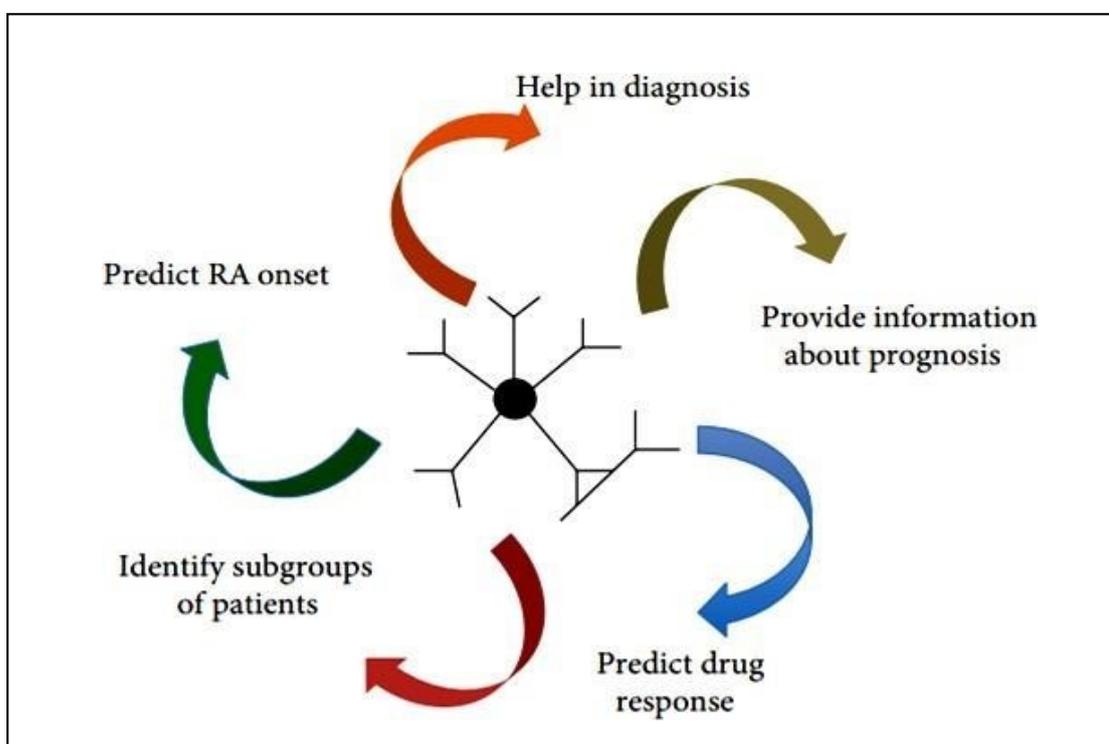


Figure 13 : Le rôle du facteur rhumatoïde dans la polyarthrite rhumatoïde (Francesca *et al.*, 2013)

a.4 Détection des facteurs rhumatoïdes

Les méthodes sérologiques classiques de détection des FR ne mettent pratiquement en évidence que les FR de type IgM qui est seuls agglutinants. La technique de Waalar-Rose est une méthode d'hémagglutination passive utilisant des hématies du mouton recouvertes d'Ig de lapin antihématie du mouton, elle nécessite la réalisation d'un témoin avec des hématies non sensibilisé pour éviter les faux positives dus au hétéroanticorps et le test au latex en tube utilise des particules de polystyrène recouvertes d'Ig humaines. **(legoux ,2013)**.

Néphélémétrie, une autre technique par le quelle est mesuré l'intensité de la lumière dispersé par le complexe formé de particules de polystyrène sensibilisé et de facteurs rhumatoïdes. Elle est automatisable, reproductible, linéaire et sensible.

Technique ELISA (enzyme-linked immuno-sorbent assay ou dosage immuno-enzymatique sur support solide), très sensible pour déterminer les différents isotopes IgM, IgA et IgG. Notre choix s'est porté sur cette technique ELISA pour sa grande sensibilité et spécificité.

b. anticorps anti-protéines et peptides citrulinés (ACPA)

Pour augmente la spécificité des critères de classification de la PR, le dosage anti-protéine citrulinée / peptide (ACPA) a été ajoutés.

Le test anti-CCP présente une spécificité extrêmement élevée pour la PR (97%) et une sensibilité d'environ 67% dans les méta-analyses groupées. Ainsi lorsqu'il est associé avec FR il donne une valeur supplémentaire par rapport au test FR seul. Chez les patients ayant une PR débutante la combinaison des deux tests a une très haute spécificité et valeur prédictive positive.

b.1 citrullination des protéines

L'ACPA sont dirigées contre des protéines qui ont subi des modifications par la conversion de l'acide aminé arginine en citrulline, Ce processus de déimination est catalyser par l'enzyme PAD **(Figure 14)**.

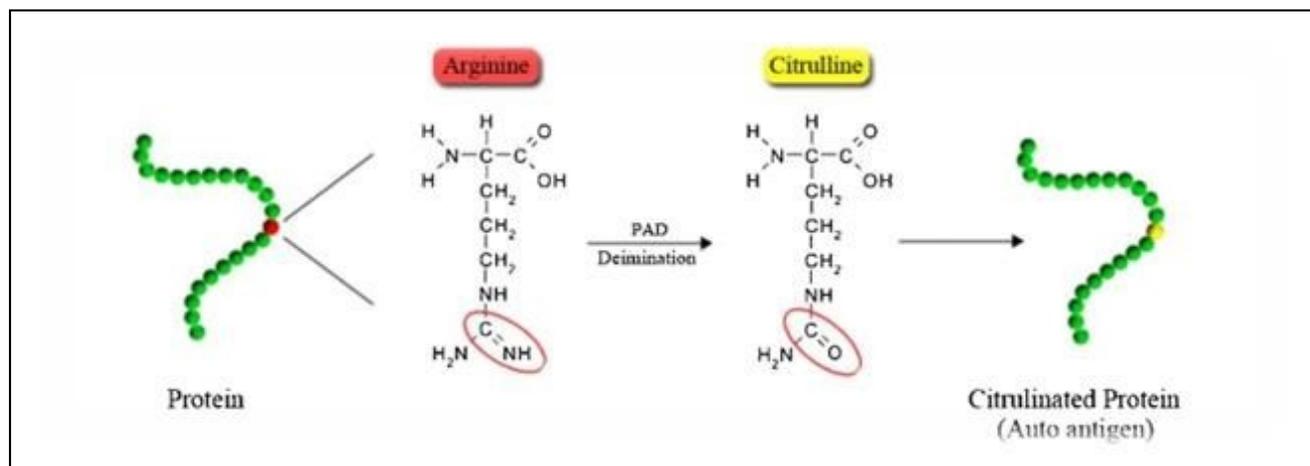


Figure 14 : Mécanisme de citrullination des protéines (Dinesh *et al.*, 2016)

b.2 Le rôle des anti-ccp dans la pathogénèse de la polyarthrite rhumatoïde

Les anticorps anti-protéines citrullinées sont produits localement par les lymphocytes B synoviales et peuvent donc, conjointement avec le facteur rhumatoïde, contribuer aux processus inflammatoires et destructeurs de l'articulation ainsi à l'apparition des symptômes cliniques, leur présence montre une forte association avec la prédisposition immunogénétique, c'est-à-dire avec les allèles HLA DR portant l'épitope partagé.

Ces auto-anticorps peuvent être détectés avec des titres croissants à l'approche du début de la maladie, les ACPA exercent leurs fonctions biologiques en se liant aux récepteurs Fc, notamment exprimés par les cellules immunitaires de la lignée myéloïde, et en activant le système du complément par les voies classique et alternative. (Figure 15) (Hochberg *et al.*, 2009)

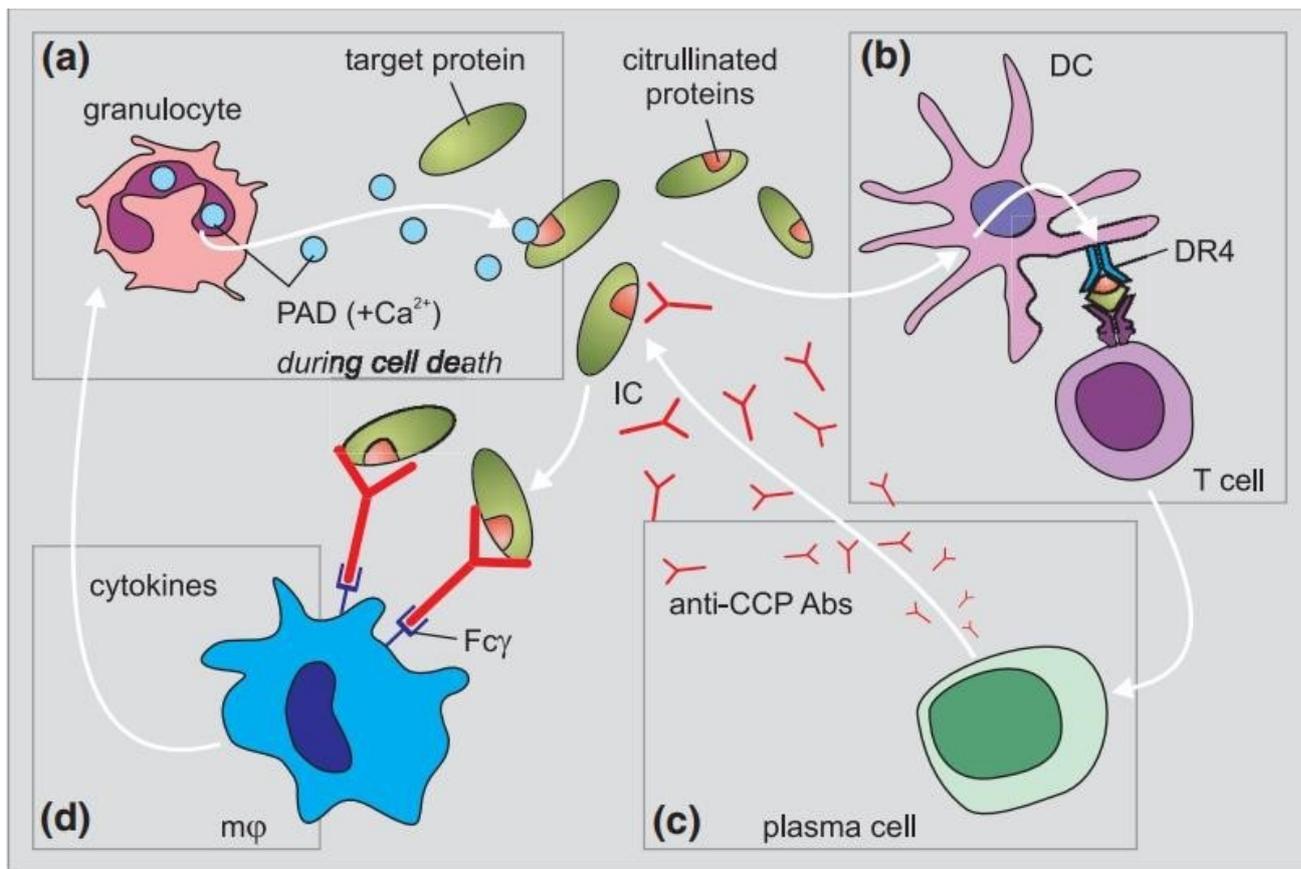


Figure 15. Citrullination des protéines et sécrétion des ACPA (Erik et al., 2003)

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire d'Immunologie de l'hôpital central de l'armée (HCA) de « Ain Naadja ». Il s'agit d'une étude de type cas /témoin, ayant pour objectifs :

- Réaliser une étude épidémiologique selon la tranche d'âge et le sexe.
- Réaliser une étude sérologique pour connaître l'intérêt de la recherche de facteur rhumatoïde (FR) IgA et des anticorps anti protéines citrulinés (anti-CCP) dans le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde en utilisant une technique ELISA quantitative et immunofluorimétrie en flux.

1. Matériel non biologique

Dans notre étude des kits ont été utilisés pour l'analyse sérologique du facteur rhumatoïde et des anti-CCP de 3eme génération ayant une grande spécificité pour le diagnostic. Deux kits (**FIDISTM Rheuma-RF IgM (Theradiag) (France)**, **EUROIMMUN IgA rheumatoid factor ELISA(Germany)**) pour les classes IgM et IgA, respectivement. Et deux kits (**QUANTA Lite® CCP3.1 IgG/IgA ELISA et QUANTA Lite® CCP3.1 IgG ELISA (Inova diagnostics) (USA)**) pour les classes IgG/IgA et IgG respectivement. (**Les kits, annexe 2**) Ainsi que l'ensemble d'appareillages (centrifugeuse, réfrigérateur, lecteur ELISA, les gants, tubes sec stériles, portoirs...)

2. Matériel biologique

- Notre étude a été réalisée sur 64 patients atteints de la PR, dont l'âge varie entre 15-71 ans. durant la période allant de deux Février 2019 au vingt-sept Mai 2019, à ce nombre se rajoute 30 témoins sains,
- Les prélèvements sanguins arrivent au niveau du laboratoire d'immunologie dans des tubes sec stérile ou gélosé (sans anticoagulant), et chaque tube est accompagné d'une fiche de renseignement contenant les coordonnées du patient et l'ensemble du bilan biologique a exécuté.
- Le sang est centrifugé à 3000 t/ min pendant 5 min. Ainsi, les sérums obtenus ne doivent présenter ni troubles, ni hémolyse.
- Les sérums seront conservés à 4°C, et les analysés se font dans les 24h qui suivent le prélèvement, ou bien congelés à 20°C si les analyses sont différentes.

3. Méthodes

3.1 La recherche des Anti-CCP IgG/IgA et IgG via ELISA :

Pour la firme (QUANTA Lite® CCP3.1 IgG/IgA ELISA et QUANTA Lite® CCP3.1 IgG ELISA), le principe d'analyse sérologique des Anti-CCP est similaire, par contre ce qui change c'est les antigènes fixé sur les micropuits.

- **Principe**

L'antigène est un peptide cyclique synthétique ayant de grandes sensibilités et spécificité dans la détection d'anticorps chez les patients de PR. Cet antigène est fixé à la surface des plaques de micro-titrations (**Figure 16**).

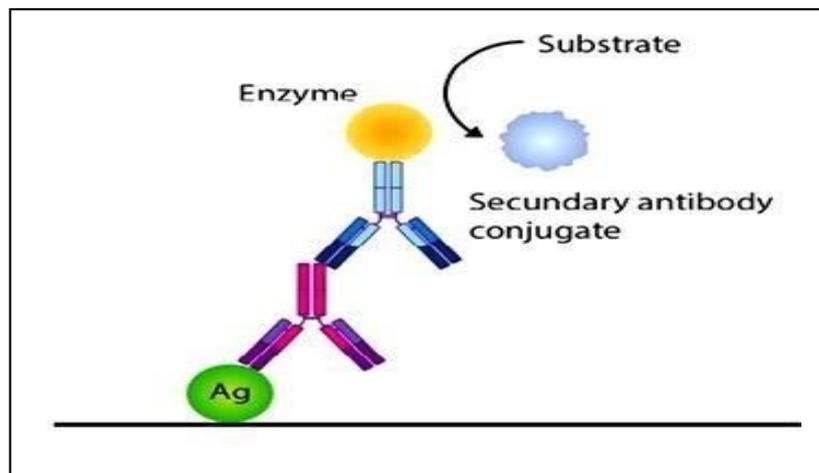


Figure 16 : Principe de la technique ELISA

Des contrôles prédilués et des échantillons de patients dilués sont ajoutés dans des puits distincts afin de permettre à tous les anticorps IgG ou IgA présents de se lier à l'antigène immobilisé. Les molécules non liées aux antigènes sont éliminées par lavage. Un conjugué enzymatique anti-IgA ou anti-IgG humaine est alors ajouté dans chaque puits pour révéler les auto-anticorps du patient. Après une étape d'incubation, le conjugué non fixé est éliminé par lavage.

L'activité enzymatique résiduelle est quantifiée grâce à l'addition d'un substrat chromogène TMB. En présence de peroxydase, une coloration bleue est obtenue. Celle-ci vire au jaune après l'ajout d'une solution d'arrêt (acide sulfurique). Le produit final est coloré en jaune et la densité optique est lue à 450nm (QUANTA Lite 2019) (**annexe 3**)

Protocole

+

- Tous les réactifs et les échantillons doivent être amenés à température ambiante (20-26°C) et vortex avant les utiliser.
- Seuls les sérums des patients sont dilués au 1/101 dans le diluant d'échantillon : 10ul dans 1000ml et soigneusement vortex pendant 10s.
- Distribuer 100ul les calibrateurs A B C D E, le contrôle négatif et le contrôle faiblement positif et laisser incubé pendant 30min à température ambiante.
- Vider la plaque et effectué trois lavages des puits avec 300ul de tampon de lavage dilué.
- Dans des conditions aseptiques, 100ul de conjugué (anticorps de chèvre anti-IgG/IgA humaine) sont rajoutés dans chaque puits, suivie par une incubation à température ambiante pendant 3min est réalisée. Et puis un deuxième lavage est effectué.
- Distribuer 100ul de chromogènes TMB dans chaque puit et laisser incubé à l'obscurité 30min. Enfin, 100ul de solution d'arrêt sont rajoutés dans chaque puit dans le même ordre que le dépôt de substrat. Ceci induit un changement de couleur de bleu au jaune
- La densité optique (DO) de chaque puit doit être lue à 450nm via un lecteur de plaque dans les 30min qui suit l'arrêt de la réaction.

3.2 recherche du facteur rhumatoïde IgA via ELISA :

Des bandes de microplaque recouvertes d'antigènes Fc purifiés à partir d'IgG isolé du sérum humain par délipidation. Dans la première étape de la réaction, le sérum dilué des patients sont incubés dans les puits. Si l'échantillon est positif, des anticorps IgA dans l'échantillon de sérum dilué se fixent aux antigènes couplés à la phase solide. Les anticorps attachés sont détectés avec des anticorps anti- IgA humaine marqués à la peroxydase et ils sont rendus visibles en utilisant une solution chromogène / substrat capable de favoriser une réaction colorée.

Protocole

- Tous les réactifs et les échantillons doivent être amenés à température ambiante (20-26°C) et bien les mélanger avant de les utiliser.
- Seul le sérum des patients sont dilué : 10ul dans 2000ml de tampon d'échantillon.

- Transfère 100ul des calibrateurs 1,2 et 3, les control positive et négative puis les échantillons dilués dans les puits appropriés suivant le plan de la plaque de microtitration
- Après la phase d'incubation pendant 30min à température ambiante, réalisé une série de 3 lavage via 300ul de solution de lavage dilué.
- Incubation du conjugué pendant 30min : pipette 100ul de l'enzyme conjugué (anti-humains IgA marqués à la peroxydase) et incubé à température ambiante. Puis réalisée une deuxième série de lavage.
- Incubation du substrat : pipette 100ul de la solution chromogène/substrat dans les puits, incuber pendant 15min à température ambiante à l'obscurité. Perpette 100ul de la solution stop dans chaque puits respectivement.

Lecture et calcul des résultats

L'évaluation photométrique de l'intensité de la coloration (DO) se fait par le lecteur ELISA, et elle doit être faite à 450nm pendant l'heure qui suit l'addition de la solution stop.

La courbe l'étalonnage standard à partir de laquelle la concentration des anticorps dans le sérum des échantillons est obtenue est tracée point à point de la lecture d'extinction mesurée pour les calibrateurs par rapport aux unités correspondantes.

Les calibrateurs (étalons) sont utilisés pour tracer la courbe d'étalonnage car ils sont de concentration connue (mentionner sur la fich technique du kit) et une densité optique obtenue, donc il assurant l'obtention des résultats fiable. Les contrôles fortement positif et négatif permettent de contrôler le bon fonctionnement du teste.

3.3 recherche de facteurs rhumatoïdes IgM par immunofluorimétrie en flux (technologie luminex)

Dérivée de la cryométrie en flux, elle s'agit d'un système analytique multiplex qui repose sur trois éléments : un support solide constitué de microbilles, des marqueurs fluorescents, et un fluorimètre en flux. Le support analytique est représenté par des microbilles en polystyrène de 5,6 nm de diamètre, la puissance de ce système réside dans le fait qu'il est possible d'analyser simultanément jusqu'à cent types de microsphère. Ceci est rendu *possible en* incorporant dans ces billes des quantités déterminées de deux marqueurs fluorescents, orange et rouge (**Figure 17**).

Selon l'application envisagée, les microsphères sont sensibilisées par des IgG, humaines ou animales permettant de capturer le facteur rhumatoïde des classe IgM qui se fixe au niveau de leurs déterminants Fc (latex et waaler rose). Cette fixation est ensuite révélée par un conjugué fluorescent : un anticorps anti-immunoglobulines humaines sur lequel est fixé un fluorochrome différent de ceux qui sont incorporés dans les billes.

Le troisième élément essentiel est le dispositif de mesure de la fluorescence Il s'agit d'un fluorimètre en flux (Luminex 100™ ou 200™) : les billes passent l'une après l'autre dans le trajet de deux faisceaux lasers : le premier laser (635 nm) excite les colorants internes orange et rouge, ce qui permet d'identifier la bille, donc l'auto- anticorps qu'elle a éventuellement capturé.

Le deuxième laser (532 nm) excite le fluorochrome du conjugué qui s'est fixé sur l'anticorps capturé au cours de la réaction, ce qui permet de le quantifier

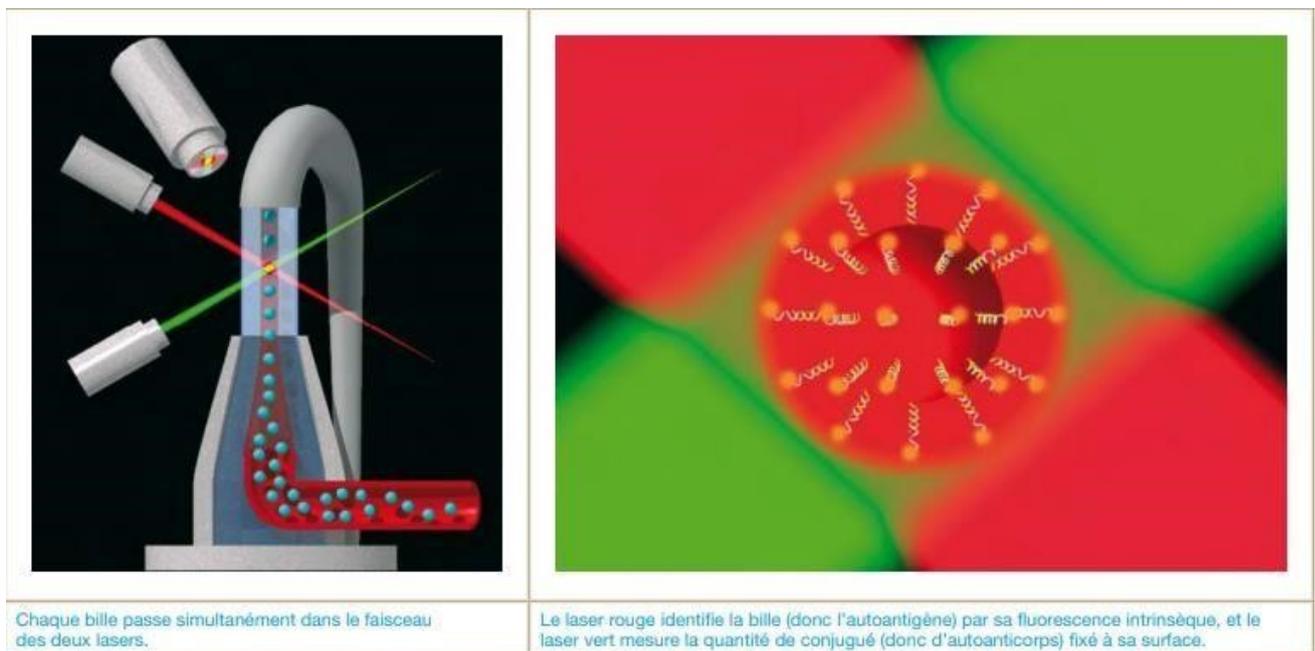


Figure 17 : Analyse des billes dans le fluorimètre en flux. (Daniela et Nils-Olivier 2008)

Protocole

- Environ 30min avant le début de la manipulation, le kit et les échantillons sont ramenés à une température ambiante.
- Reconstitué les microsphères en ajoutant tout le flacon de D1 tampon de reconstitution des billes au flacon A, attendre 5min et bien agiter en utilisant un vortex.

+

- Préparation des échantillons et des contrôles positifs et négatifs : en les diluant 1/201 dans le tampon de dilution (B2) ; 10ul d'échantillon dans 2000ml de tampon de dilution. Puis agiter vigoureusement au vortex.
- Déposer 50ul des microsphères dans chaque micropuits de la plaque à membrane filtrante, par la suite 100ul de blanc, de contrôle négatif dilué, de contrôle positif dilué du calibrateurs en duplicate et des échantillons des patients sont déposés, dans l'ordre des puits restants.
- Après, une incubation à l'obscurité est réalisée durant 30min. lavé la plaque en utilisant l'unité de filtration par cycles successifs de 3ul de tampon de lavage (C2).
- Déposer 100ul de conjugué et laisser incuber 30min à température ambiante a l'obscurité. Puis réalisé un deuxième lavage via 100ul du tampon de lavage (B2), aspirer et rajouter 100ul du même tampon et procéder à l'analyse des microplaques via le système FIDIS™.
- Puis un passeur d'échantillon (plateforme XY des microplaques), (**annexe 4**) placé sous le fluorimètre, qui permet d'automatiser l'étape de lecture puit par puit ; d'autre part un logiciel informatique qui pilote l'ensemble et enregistre les mesures de fluorescence.

4. Analyse statistique :

La comparaison entre les résultats sérologique du facteur rheumatoid entre les patients et les témoins a été réalisée via le logiciel SPSS IBM Statistics, l'Odd Ratio (OR) permet d'apprécier L'intensité de l'association entre un marqueur et une maladie. La corrélation entre les variables (anti-CCP/FR) a été vérifiée via le teste de Pearson ou l'intervalle de confiance est déterminer à 95%. Des tableaux de contingence et les graphes ont été exécutés via XLstate et le niveau de signification a été établi à $P < 0,05$.

+

Références bibliographiques

1. Abbas A.K, Murphy K.M, Sher A. 1996. Functional diversity of helperT lymphocytes. *Nature*. 383: 787–793.
2. Adamopoulos I.E, Chao C.C, Geissler R, Laface D, Blumenschein W, Iwakura Y, McClanahan T, Bowman E.P. 2010. Interleukin-17A upregulates receptoractivator of NF-kappaB on osteoclast precursors. *Arthritis Research & Therapy*. 12: R29.
3. Afzali B, Lombardi G, Lechler R.I, Lord G.M. 2007. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 148: 32–46.
4. Agarwal S, Misra R, Aggarwal A. 2008. Interleukin 17 levels are increased in juvenile idiopathicarthritis synovial fluid and induce synovial fibroblasts to produce proinflammatory cytokinesand matrix metalloproteinases. *Journal of Rheumatology*. 35: 515–519.
5. Aletaha D, Neogi T, Silman A, Funovits J, Felson D.T, Birnbaum N.S, Burmester G.R, Bykerk V.P, Cohen M.D, Combe B, Costenbader K.H, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes J.M, Hobbs K, Huizinga T.W et al. 2010. Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheumatology*. 62: 2569–2581.
6. Alpízar-Rodríguez D, Pluchino N, Canny G, Gabay C, Finckh A. 2017. The role of female hormonal factors in the development of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 56: 1254–1263.
7. Arnett F, Edworthy S, Bloch D, McShane DJ, Fries J.F, Cooper N.S, Healey L.A, Kaplan S.R, Liang M.H, Luthra H.S, et al. 1998. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatology*. 31: 315–324.
8. Boyce B.F, Xing L, 2007. Biology of RANK RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Research & Therapy*. 9: 1–7.
9. Bugatti S, Vitolo B, Caporali R, Montecucco C, Manzo A. 2014. B Cells in Rheumatoid Arthritis: From Pathogenic Players to Disease Biomarkers. *Immunity*. 20: 681678.
10. Colebatch A.N, Edwards C.J, Østergaard M, Van der Heijde D, Balint P.V, D’Agostino

+

- M.A, Forslind K, Grassi W, Haavardsholm E.A, Haugeberg G, Jurik A.G, Landewé R.B.M, Naredo E, O'Connor P.J, Ostendorf B, Potocki K, Schmidt W.A, Smolen J.S, Sokolovic S, Watt I, Conaghan P.G. 2013. EULAR recommendations for the use of imaging of the joints in the clinical management of rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 72: 804–814.
11. Combe B, Codreanu C, Fiocco U, Gaubitz M, Geusens P.P, Kvien T.K, Pavelka K, Sambrook P.N, Smolen J.S, Wajdula J, Fatenejad S. 2006. Etanercept and sulfasalazine, alone and combined, in patients with active rheumatoid arthritis despite receiving sulfasalazine: a double-blind comparison. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 65: 1357–1362.
 12. Cornelia M Weyand et Jorg J Goronzy. 2006. T-cell-targeted therapies in rheumatoid arthritis. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. 2: 201–210.
 13. Courtesy D et al. 1997. Rheumatoid Arthritis. *Clinical Immunology*. 7: 30173-30178
 14. Dayer J.M, Choy E. 2010. Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor. *Rheumatology*. 49: 15–24.
 15. Deane K.D, El-Gabalawy H. 2014. Pathogenesis and prevention of rheumatic disease: focus on preclinical RA and SLE. *Nature Reviews Rheumatology*. 10: 212–228.
 16. Deane K.D, Norris J.M, Holers V.M. 2010. Pre-Clinical Rheumatoid Arthritis: Identification, Evaluation and Future Directions for Investigation. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 36: 213–241.
 17. Derksen V. F. A. M, Huizinga T. W. J, Van der Woude D. 2017. The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Seminars in Immunopathology*. 39: 437–446.
 18. Elshafie A.I, Elbagir S, Aledrissy M.I.E, Elagib E.M, Nur M.A.M, Rönnelid J. 2019. Occurrence of anti-CCP2 and RF isotypes and their relation to age and disease severity among Sudanese patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*. 38: 1545–1553.
 19. Eyre S, Bowes J, Diogo D, Lee A, Barton A, Martin P, Zhernakova A, Stahl E, Viatte S, McAllister K, Amos C.I, Padyukov L, Toes R.E, Huizinga T.W, Wijmenga C, Trynka G, Franke L, Westra H.J, Alfredsson L, Hu X, Sandor C, de Bakker P.I, Davila S, Khor C.C, Heng K.K, et al. 2012. High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. *Nature Genetics*. 44: 1336–1340.
 20. Frisell T, Saevarsdottir S, Askling J. 2016. Family history of rheumatoid arthritis: an old concept with new developments. *Nature Reviews Rheumatology*. 12: 335–343.

+

21. Giles I, Salama A.D. 2018. The auto-immune rheumatic diseases – an introduction. *Medicine*. 46: 77.
22. Haberman A. M, William J, Euler C, Shlomchik M. J. 2003. Rheumatoid factors in health and disease: structure, function, induction and regulation. *Current Directions in Autoimmunity*. 6. 169–195.
23. Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, Jakobsson P.J, Baum W, Nimmerjahn F, Szarka E, Sarmay G, Krumbholz G, Neumann E, Toes R, Scherer H.U, Catrina A.I, Klareskog L, Jurdic P, Schett G. 2012. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *Journal of Clinical Investigation*. 122: 1791–1802.
24. Jenkins J.K, Kenneth J.H, McMurray R.W. 2002. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: A Guide to Therapy. *The American Journal of the Medical Sciences*. 323: 171–180.
25. Harris E.D. Rheumatoid arthritis. 1990. Pathophysiology and implications for therapy. *The New England Journal of Medicine*. 322: 1277–1289.
26. Kim K.W, Cho M.L, Kim H.R, Ju J.H, Park M.K, Oh H.J, Kim J.S, Park S.H, Lee S.H, Kim H.Y. 2007. Up-regulation of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) production in rheumatoid synovial fibroblasts through interactions with T lymphocytes: role of interleukin-17 and CD40L-CD40 interaction. *Arthritis Rheumatology*. 56:1076–1086.
27. Lakomya D, Olssona N-O. 2008. Apport du multiplexage en pratique diagnostique immunologique. *Revue francophone des laboratoires*. 38: 59–66.
28. G. Lakos, L. Soós, A. Fekete, Z. Szabó, M. Zeher, I.F. Horváth, K. Dankó, A. Kapitány, A. Gyetvai, G. Szegedi, Z. Szekanecz. 2008. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody isotypes in rheumatoid arthritis: association with disease duration, rheumatoid factor production and the presence of shared epitope. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 26: 253–260.
29. Legoux P. 2013. Revues générales. Polyarthrite rhumatoïde: les éléments biologiques, diagnostiques et pronostiques utiles à la prise en charge en pratique. *Rhumatologie*. 3–9.
30. Linn-Rasker S, Der van, Breedveld F, Huizinga T. 2006. Arthritis of the large joints - in particular, the knee - at first presentation is predictive for a high level of radiological destruction of the small joints in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*.

- 66:646–650.
31. Littlejohn E.A, Monrad S.U. 2018. Early Diagnosis and Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Primary Care*. 45: 237–255.
 32. Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren AK, Nicholas AP, Zendman AJ, Eklund A, Grunewald J, Skold CM, Klareskog L, Catrina AI. 2008. Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expressions in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 67: 1488–1492.
 33. Meyer P, Ally M, Hodkinson B, Anderson R, Tikly M. 2018. Diagnostic utility of, and influence of tobacco usage and genetic predisposition on, immunoglobulin A, rheumatoid factor and anti-citrullinated peptide auto-antibodies in South African rheumatoid arthritis patients. *African Health Sciences*. 18: 295–303.
 34. McInnes I, Schett G. 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews of Immunology*. 7: 429–442.
 35. Musset L, Ghillani-Galbin P. 2013. La polyarthrite rhumatoïde: apport de la biologie au diagnostic et au suivi thérapeutique. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*. 28: 281–286.
 36. Nakamura T, Kamogawa Y, Bottomly K, Flavell R.A. 1997. Polarization of IL-4- and IFN-gamma-producing CD4 T cells following activation of naive CD4 T cells. *Journal of Immunology*. 158: 1085–1094.
 37. Pää S, Pää L, Birkenfeldt R. 1998. Correlation of serum IgA rheumatoid factor levels with disease severity in rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*. 27. 252–256.
 38. Pia I, Juha P. 1997. Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Rheumatoid Arthritis. *Annals of Medicine*. 29: 499–507.
 39. Picerno V, Ferro F, Adinolfi A, Valentini E, Tani C, Alunno A. 2015. One year in review: the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 33: 551–558.
 40. Rantapää-Dahlqvist S, de Jong B.A, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, Sundin U, van Venrooij W.J. 2003. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 48: 2741-2749.
 41. Sacre S.M, Drexler S.K, Andreakos E, Feldmann M, Brennan F.M, Foxwell B.M. 2007. Could toll-like receptors provide a missing link in chronic inflammation in rheumatoid

- arthritis? Lessons from a study on human rheumatoid tissue. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 66: 81–86.
42. Schett G, Hayer S, Zwerina J, Redlich K, Smolen J.S. 2005. Mechanisms of disease: the link between RANKL and arthritic bone disease. *Nature Clinical Practice Rheumatology*.1: 47–54.
43. Schulze-Koops H, Lipsky P.E, Kavanaugh A.F, Davis L.S. 1995. Elevated Th1- or Th0like cytokine mRNA in peripheral circulation of patients with rheumatoid arthritis. Modulation by treatment with anti-ICAM-1 correlates with clinical benefit. *Journal of Immunology*. 155: 5029–5037.
44. Sieghart D, Platzer A, Studenic P, Alasti F, Grundhuber M, Swiniarski S, Horn T, Haslacher H, Blüml S, Smolen J, Steiner G. 2018. Determination of autoantibody isotypes increases the sensitivity of serodiagnostics in rheumatoid arthritis. *Frontiers in Immunology*. 9: 876.
45. Silman A.J, Hochberg M.C. 1993. Epidemiology of rheumatoid arthritis. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*.102: 721–728.
46. Singh J.A, Noorbaloochi S, Singh G. Golimumab for rheumatoid arthritis: a systematic review. *Journal of Rheumatology*. 2010. 37: 1096–1104.
47. Slimani S, Ladjouze-Rezig A. 2014. Prevalence of rheumatoid arthritis in an urban population of Algeria: a prospective study. *Rheumatology (Oxford)*. 53: 571–573.
48. Smolen J.S, Aletaha D, McInnes I.B. 2016. Rheumatoid Arthritis. *The Lancet*. 388: 2023–2038.
49. Solomon L, Robin G, Valkenburg H.A. 1975. Rheumatoid arthritis in an urban South African Negro population. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 34: 128–135.
50. Suter L.G, Fraenkel L, Braithwaite R.S. 2011. Role of magnetic resonance imaging in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care & Research*. 63. 675–688.
51. Swedler W, Wallman J, Froelich C. J, Teodorescu M. 1997. Routine measurement of IgM, IgG, and IgA rheumatoid factors: high sensitivity, specificity, and predictive value for rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology*. 24. 1037–1044.
52. Taylor P.C, Narayan N. 2018. Aetiopathology of rheumatoid arthritis. *Medicine*. 46: 207–210.
53. Van den Bosch W.B, Mangnus L, Reijnerse M, Huizinga T.W, Van der Helm-van Mil A.H. 2015. The diagnostic accuracy of the squeeze test to identify arthritis: a crosssectional cohort study. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 74: 1886–1889.

54. Van Venrooij W.J, Zendman A.J, Pruijn G.J. 2006. Autoantibodies to citrullinated antigens in (early) rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews*. 6: 37–41.
55. Vasanthi P, Nalini G, Rajasekhar G. Role of tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a review. *APLAR Journal of Rheumatology banner*. 2007. 10: 270–274.
56. Viatte S, Barton A. 2017. Genetics of rheumatoid arthritis susceptibility, severity, and treatment response. *Seminar in immunopathology*. 39: 395–408.
57. Wakefield R.J, Balint P.V, Szkudlarek M, Filippucci E, Backhaus M, D’agostino M.A, Sanchez E.N, Iagnocco A, Schmidt W.A, Bruyn G, Kane D, O’connor P.J, Manger B, Joshua F, Koski J, Grassi W, Lassere M.N.D, Swen N, Kainberger F, Klauser A, Ostergaard M, Brown A.K, Machold K.P, Conaghan P.G. 2005. Musculoskeletal ultrasound including definitions for ultra-sono graphic pathology, *The Journal of Rheumatology*. 32. 2485–2487.
58. Yuji Y, Toshio T. 2014. Interleukin 6 and Rheumatoid Arthritis. *BioMed Research International*. 2014: 698313.
59. Zavala-Cerna M.G, Nava A, García-Castañeda E, Durán-González J, Arias-Merino M.J, Salazar-Páramo M. 2008. Serum IgG activity against cyclic citrullinated peptide in patients evaluated for rheumatoid factor correlates with the IgM isotype. *Rheumatology International*. 28: 851–857.
60. Zvaifler N.J. 1973. The immunopathology of joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Advances in Immunology*. 16: 265–336.

Annexes

Annexe 1

Les articulations

Une articulation est la jonction entre deux pièces squelettiques (articulation simple) ou plus (articulation composée). Elle a pour fonction de relier les os entre eux et conféré une certaine mobilité au squelette. Il existe trois types d'articulations : immobiles ou synarthroses, semi-mobiles ou amphiarthrose et mobiles ou diarthrose. Quatre éléments principaux constituent : l'os sous chondral, le cartilage, la membrane synoviale et le tendon.

La PR cible les articulations diarthrodiales, dans lesquelles les extrémités osseuses recouvertes de cartilage sont séparées par une cavité articulaire contenant un liquide dit liquide synovial dont ses fonctions les plus importantes sont la lubrification et la nutrition du tissu articulaire les constituants cellulaires de cet liquide sont les leucocytes, y compris les lymphocytes, les monocytes, les plasmocytes, les synoviocytes de type A, et cellules polynucléaires.



Figure 25 : Schéma d'une articulation saine (Aleth *et al* , 2019)

□ Synovium

Le tissu synovial normal est un tissu conjonctif lâche, formé par deux couches :

- La couche sous-intimale (subintima) riche en cellules, mais beaucoup plus vascularisée, elle comprend des fibroblastes, des histiocytes, des mastocytes et des fibres collagènes de très nombreux capillaires, des artérioles et des vaisseaux lymphatiques.
- La couche bordante (intima) contient deux types de cellules : Les synoviocytes de type A (macrophage expriment CMH II) sont les plus nombreux et les synoviocytes de type B (fibroblast-like) sont moins nombreux.

Annexe 1

Rôles des cytokines dans la PR :

TNF- α

Produit par les macrophages, les monocytes les fibroblastes, les NK et les mastocytes, il contribue à la prolifération et la différenciation des lymphocytes B et d'autres cellules, et il induit la production des IL-1, IL-6 et IL-8, et une régulation positive des prostaglandines, collagénase, granulocyte monocyte-colony stimulating factor (GM-CSF) sécrété par les cellules synovial et les molécules d'adhésion sécrétées par les fibroblastes.

IL-1

La famille des IL-1 augmente l'expression des cytokines sécrétées par les fibroblastes synoviaux ainsi que les chimiokines, INOS, PGs, les molécules d'adhésion par les cellules endothéliales et active les ostéoclastes.

IL-6

Il agit sur les neutrophiles, ces dernières secrètent des ROS et des enzymes protéolytiques, il induit la différenciation des ostéoclastes via un mécanisme dépendant ou indépendant de RANKL (Yuji Y et al., 2014). En synergie avec l' IL-1 et le TNF- α , ils contribuent ensemble à la production du VEGF : une cytokine majeure de l'établissement de PR ainsi que le maintien du pannus inflammatoire.

IL-17

Sécrété par les cellules nouvellement caractérisé, TH17 CD4+, IL-17A et IL-17F sont les cytokines qui présentent une forte association avec les maladies auto-immunes. S'en lient à leurs récepteurs IL-17RA et IL-17RC, respectivement. Ils augment la sécrétion des MMPs,

l'INOS par les ostéoclastes et ainsi que d'autres cytokines pro- inflammatoires. Il améliore l'infiltration de cellules immunitaires dans la synoviale en stimulant la production de certaines cytokines telles que la chimiokine à motif C-X-C (CXCL5) et le motif à base de C-X-C chimiokine 12 (CXCL12)

IL-10

Une cytokine anti-inflammatoire, connu sous le terme human cytokine inhibitory factor (CSIF), elle a un effet inhibiteur sur : la production des cytokines pro- inflammatoires : $TNF\alpha$, $IL-1\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-8$, $IL-12$ et GM-CSF, la présentation antigénique via les macrophages, la production de MMP, d'autre part, elle stimule la sécrétion des TIMP-1 par les monocytes et diminue la production des prostaglandines E2 par les fibroblaste synoviales

Tableau 1 : Critères de classification de la polyarthrite rhumatoïde ACR-EULAR en 2010

Domaine	Points
Atteinte articulaire (0-5)	
1 gross articulation	0
2-10 gross articulation	1
1-3 petite articulation	2
4-10 petite articulation	3
>10 articulations (au moins 1 petite articulation)	5
Sérologie (0-3)	
FR négatif et ACPA négatif	0
FR faiblement positif ou ACPA FAIBLEMENT positif	2
FR fortement positif ou ACPA fortement positif	3
Durée des symptômes (0-1)	
<6 semaines	0
≥ 6 semaines	1
Biologie inflammatoire (01)	
CRP normale et VS normale	0
CRP anormale ou VS anormale	1

Annexes 2

+

Les kites :



Figure 1 : QUANTA Lite® ccp3.1 IgG/IgA ELISA (Inova diagnostics) (USA)



Figure 2 : EUROIMMUN IgA rheumatoid factor ELISA (Germany)



Figure 3 : FIDIS™ Rheuma-RF (Theradiag) (France)

+

Annexe 3

Les plaques a microtitration

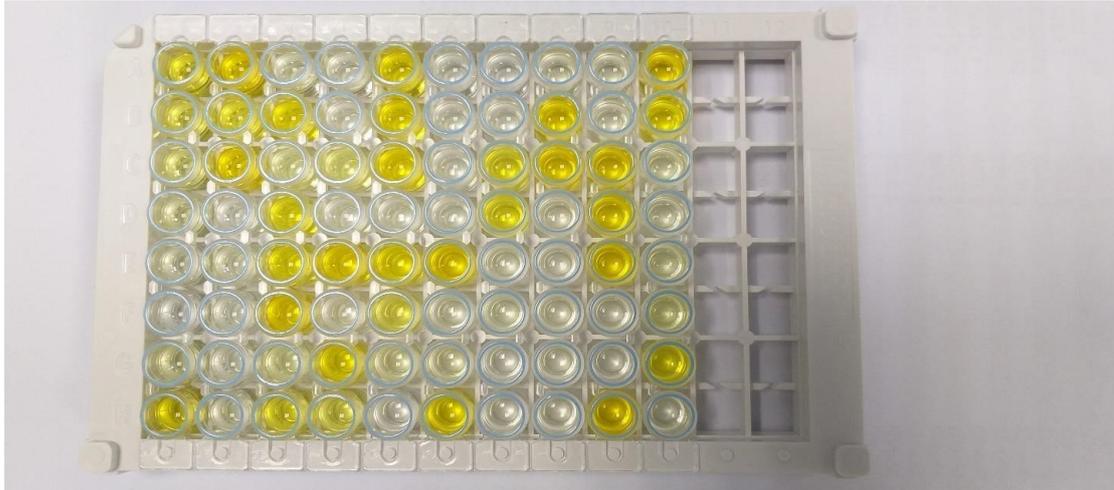


Figure 1 : Coloration de la plaque a micropuits après ajoute de la solution stop.

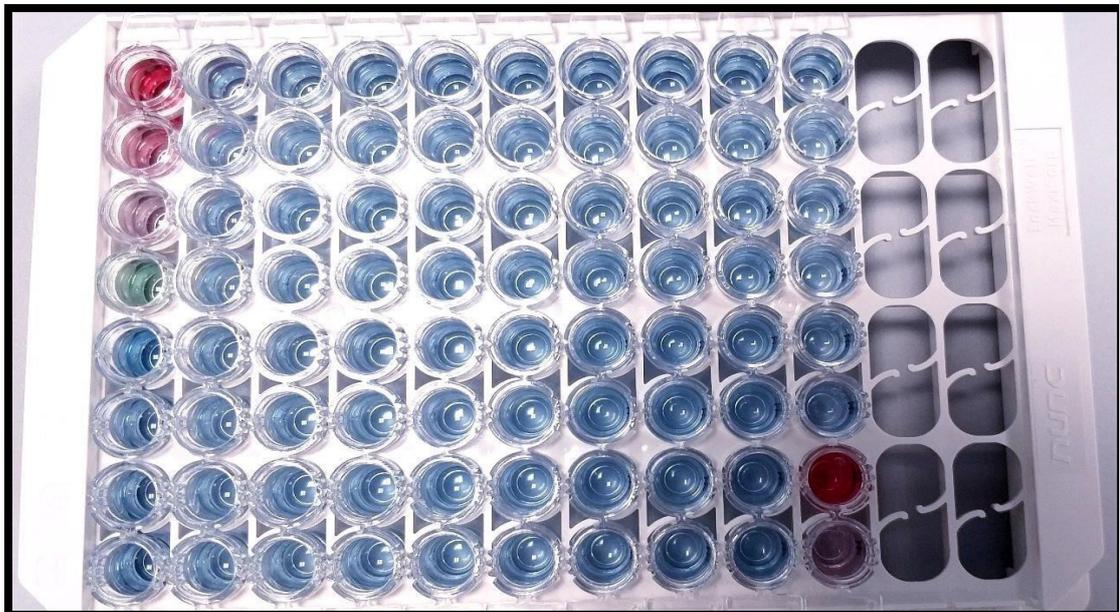


Figure 2 : La plaque a micropuits après incubation

Annexe 3 (suite)

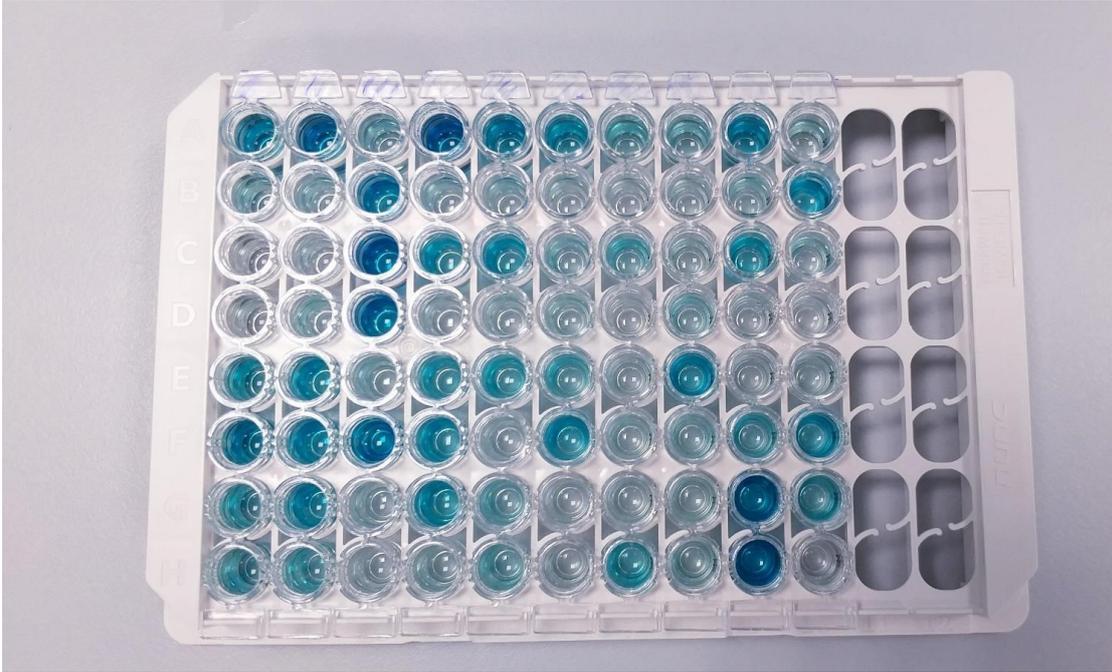


Figure 3 : Après incubation de 15min du substrat

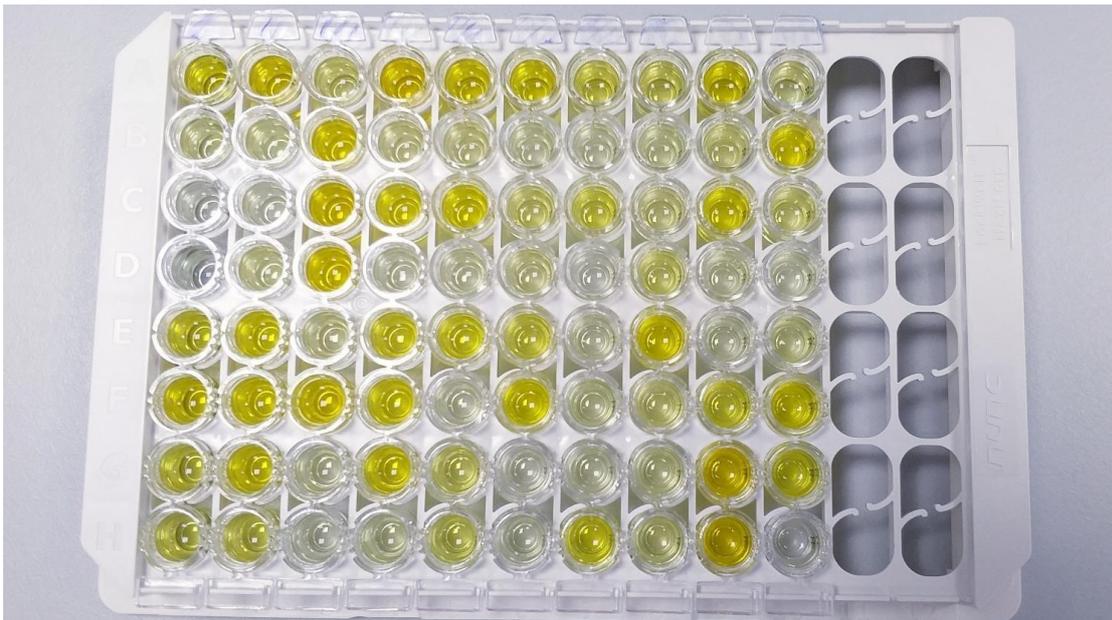


Figure 4 : Couleur des puits après l'ajout de la solution stop

Annexe 4 :



Figure:

Analyseur Luminex XY 200

1. Caractéristique de la cohorte

Notre population étudiée (n=64) est composée de 45 sont du sexe féminin et 19 sont du sexe masculin, atteinte d'une polyarthrite rhumatoïde diagnostiqué selon les critères EULAR / American College of Rheumatology 2010. La moyenne d'âge est de 53 ans avec une distribution comprise entre 15 ans à 77 ans. A cette population, 30 sujets se rajoutent et représente la population témoins.

Une distribution des patients selon l'âge et le sexe, et comparaison des résultats sérologique de facteur rhumatoïde et des anti-CCP des patients atteint de la PR.

2. Distribution des patients PR selon l'âge et le sexe :

2.1 sex-ratio :

La fréquence de la polyarthrite rhumatoïde en fonction du sexe a été déterminée 64 sujets atteints de PR, 45 patients (71.90%) sont de sexe féminin, contre 19 patients (28.10%) de sexe masculin. avec un Sex-ratio (=0,42). La plus grande incidence de la PR est observée chez les femmes. Ces résultats sont compatibles avec les résultats rapportés par la littérature (**Vallbracht *et al.*, 2003**).

Cette prédominance féminine, peut être expliquée par l'intervention du facteur hormonal, ce facteur englobe les événements liés à la modification des taux sérique des hormones sexuelle (des œstrogènes et de la progestérone) que subissent les femmes tout au long de leur vie : le cycle menstruel, la grosses, le post-partum, l'allaitement, la ménopause, l'estrogène est une hormone essentielle et unique à la féminité. Parmi plusieurs de ses fonction, l'estrogène protège le cartilage des articulations et augmente la production de ces deux importants éléments constitutifs : le collagène et les protéoglycanes, la ménopause entraîne une baisse importante dans le niveau d'estrogène chez la femme, privant ainsi les articulations de ces molécule de renforcement. D'une autre parte, l'estrogène influence la maturation des lymphocytes B et T et promouvoir le phénotype cellulaire des Th2 CD4+ qui est à l'origine de la sécrétion des anticorps par les plasmocytes. (**Keith *et al.*, 2013** : **Alpizar-Rodriguez *et al.*, 2017**). Contrairement à la femme, la sécrétion continue de la testostérone chez l'homme protège contre le développement de la PR, cela pourrait être lié, au moins en partie, à la capacité de la testostérone à moduler le développement d'anticorps contre les

+

protéines citrullinées par exemple il inhibe la sécrétion des cytokines proinflammatoire (TNF et IFN- γ) par les leukocytes, ce qui explique le rôle protecteur de la testostérone. (Keith *et al.*, 2013)

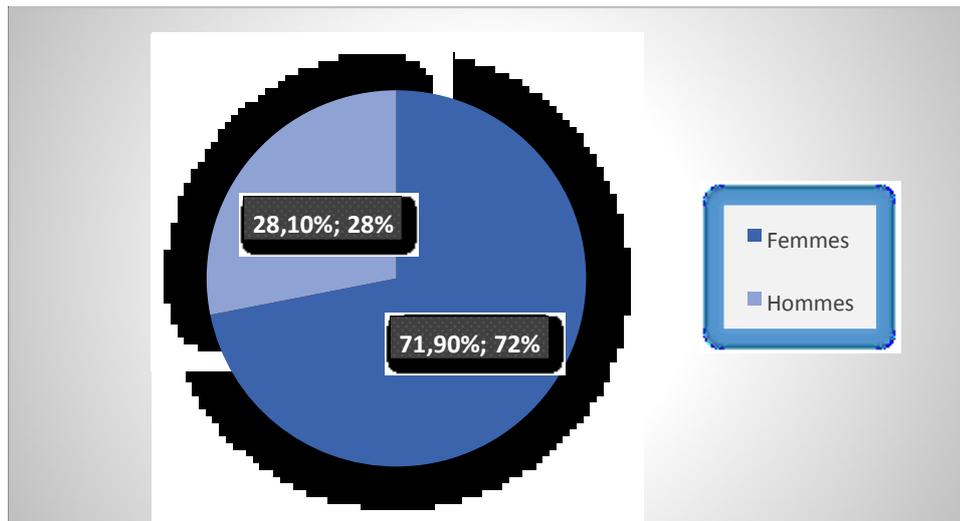


Figure 18 : La répartition des patients PR selon le sexe

2.2 Distribution de la PR en fonction de l'âge :

L'âge de nos patients varie entre 15 et 77 ans avec une moyenne de 53,70 (\pm 14,381) ans. D'après nos résultats, la tranche d'âge la plus touchée par la maladie est celle comprise entre de 46 à 55 ans (34.40%) dans la plupart sont des femmes, suivi par la tranche d'âge de 56 à 65 ans et de 66 à 75 ans, avec un pourcentage de 23,4% 18,8% respectivement. (Figure 19) ces résultats sont compatibles avec ceux de (Zavala-Cerna *et al.*, 2008) avec un âge moyen de 47 (\pm 13.4), cela pourrait être expliquer par la période qui précède la ménopause appelée périménopause caractériser par la diminution de la production des hormones sexuelle féminines (œstrogènes) jusqu'à un arrête total de ces dernier(ménopause). Selon Tengstrand et al, les hommes avec RA présentent une diminution de la testostérone sérique en comparaison avec les hommes sains, et celui-ci est lié avec la sévérité et le développement de la maladie et explique le rôle immuno-régulateur de la testostérone dans la PR.

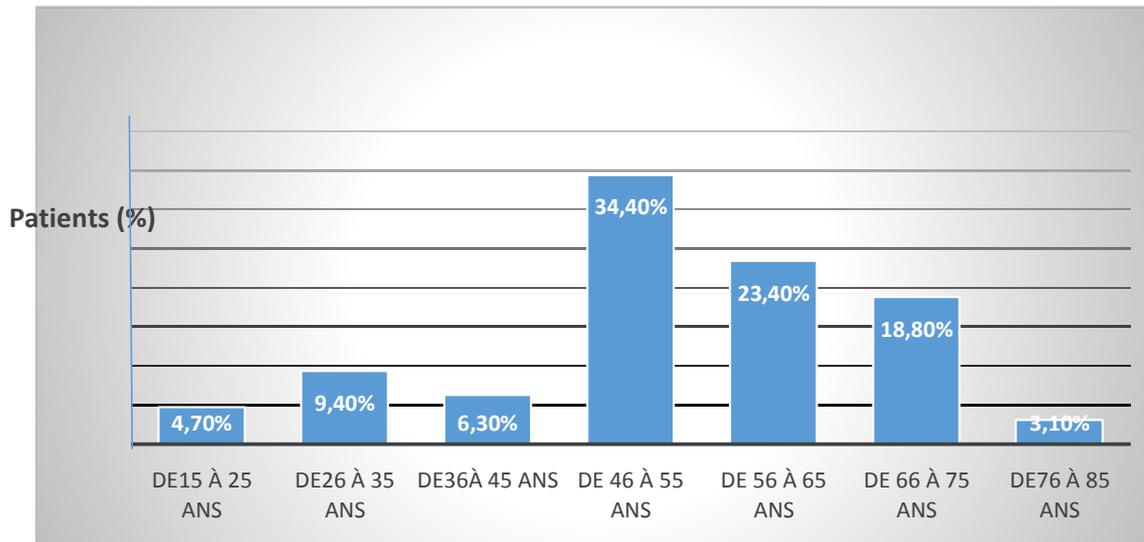


Figure 19 : Histogramme représentatif de la répartition des patients selon les différentes tranches d'âge.

3. Etude des résultats de la recherche des facteurs rhumatoïdes IgM/IgA et de l'anti-CCP IgG/IgA :

L'étude sérologique consiste à doser quatre paramètres biologiques (FR-IgM, FR-IgA et anti-CCP IgG/IgA, anti-IgG) recherchés chez les patients atteints de PR.

3.2 Analyse des résultats sérologique du facteur rhumatoid isotype IgA chez les malades par apport les témoins :

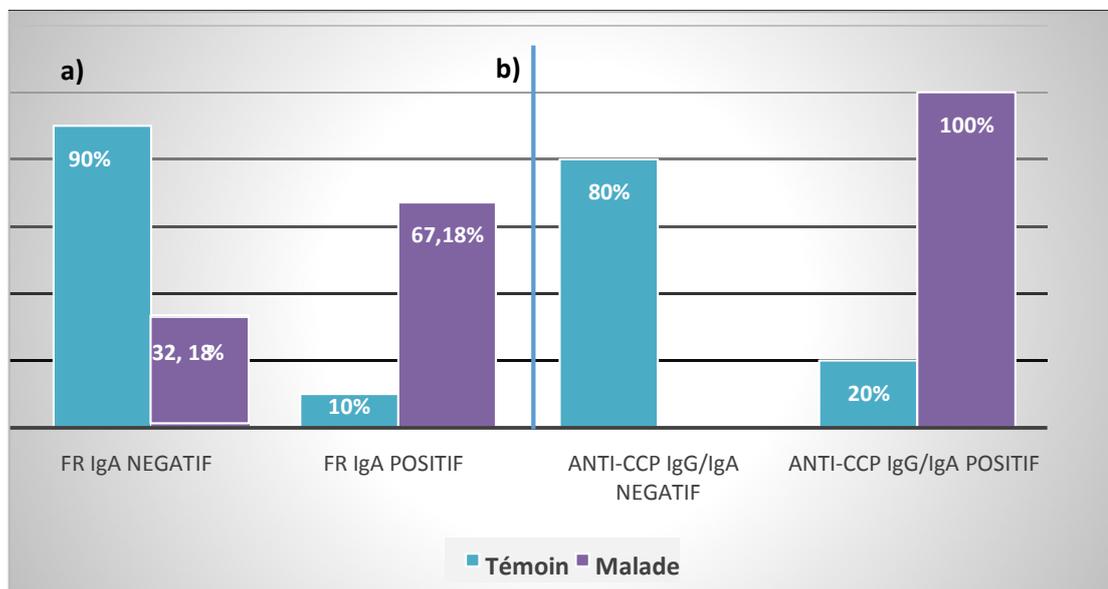
Lors de l'analyse des résultats sérologique de notre échantillonnage, nous avons noté que 67,18% des malades sont IgA séropositive et 10% des témoins (**Tableau 2 et Figure 20a**). Ces résultats indiquent une différence significative de la fréquence de isotypes IgA qui est plus fréquente dans la population malade par apport aux témoins (OR=4,019, P=0,003), mais aussi peut être détecté dans le sérum d'individus normaux et de personne atteintes d'autres maladies auto-immunes. Cela concorde avec les résultats rapportés dans une étude similaire (**Vallbracht et al., 2003**)

Tableau 1. Résultats de facteur rhumatoïde isotype IgA chez les malades et les témoins

		Effectifs		Total	p	OR (IC à 95%)
		Témoin	malade			
FR IgA	Négatif	27	21	48	0,003	4,019(1,55-10,399)
		90%	32,81%	43,29%		
	positif	3	43	46		
		10%	67,18%	56,7%		
Total		30	64	94		
		100,0%	100,0%	100,0%		

3.3 Résultats sérologique des anti-CCP IgG/IgA par rapport les témoins :

Cependant vu que notre population malade ne présente aucune séronégativité pour les anti-ccp IgG/IgA, la fréquence des résultats négatifs sera négliger par rapport celle des témoins 80,0%, par contre 20,0% (n=3) sont positifs, cela concorde avec (Venrooij et al., 2006) (Figure 20b).



+

Figure 20 : résultats sérologique du FR IgA et de l'anti-CCP chez les malades et les témoins

En comparaison avec le taux du facteur rhumatoid qui as étai diminué chez les témoins, cela confirme la spécificité des anticorps anti-CCP dans le diagnostic de la PR. Ainsi, pour nos sujet témoins ayant des résultats positifs, ils doivent être recruté au niveau du laboratoire de l'HCA pour compléter le reste des examen biologique, car dans une étude similaire établie par Rantapaa-Dalqvist et al, a montrer que les anti-CCP et le facteur rhumatoïde IgA sont deux marqueur prédictifs du développement de la polyarthrite rhumatoïde (**Rantapaa-Dalqvist et al., 2003**).

3.4 Comparaison des anti-CCP IgG/IgA et anti-CCP IgG :

Tableau 2. Résultats sérologique de l'anti-CCP IgG par rapport les anti-CCP IgG/IgA chez les malades :

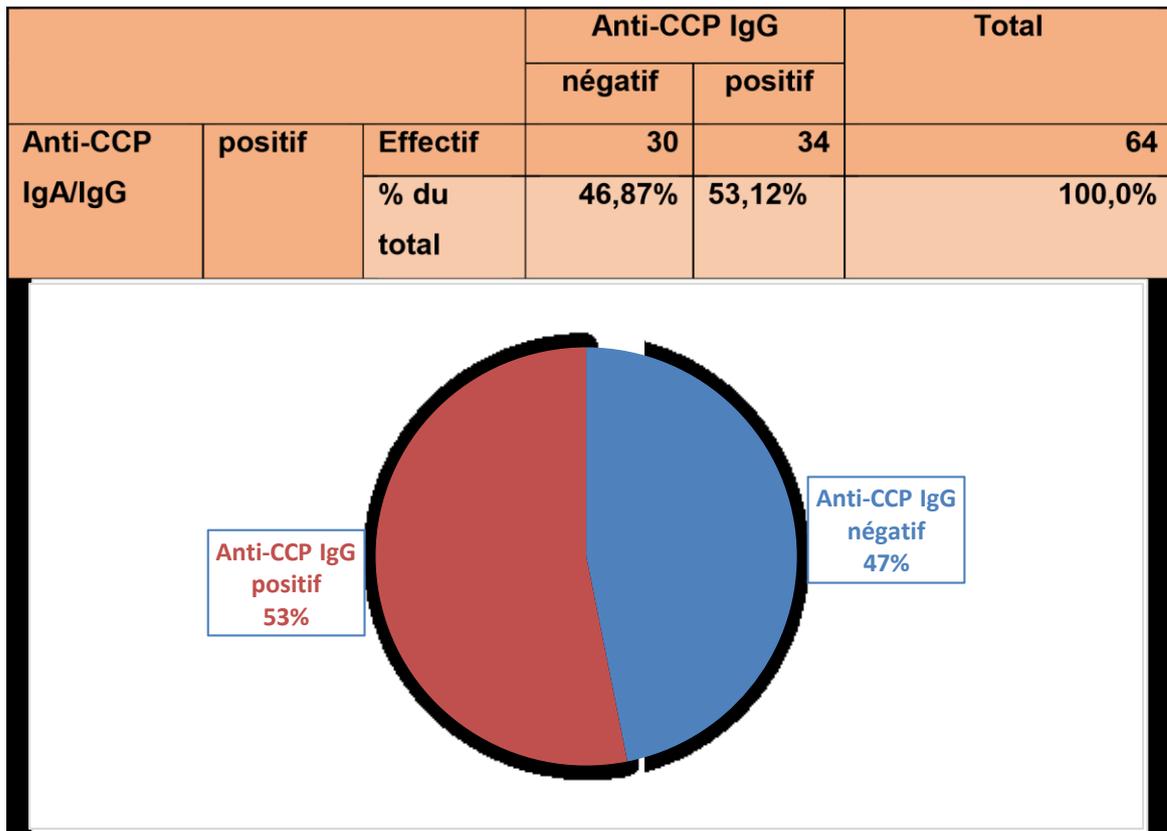


Figure 21 : Résultats de la sérologie anti-CCP IgG chez les malades

Pour l'ensemble de notre population étudié, les résultats de la sérologie anti-CCP IgG/IgA sont à 100% positifs. Donc à ce niveau-là il ne s'agit pas d'une comparaison avec les résultats des anti-CCP

IgG mais d'une estimation indirecte du taux des anti-CCP IgA c'est à dire : les résultats négatif (47,87%) de la recherche des anti-CCP IgG (**Figure 21**), peuvent être compléter par la recherche d'autre isotypes principalement l'anti-CCP IgA.

les résultats obtenue par (**Lakos et al., 2008 ; Sieghart et al., 2018**) confirme que les anticorps anti peptides cycliques citrulinés présente dans le sérum d'une manière prédominante sont de classe IgG avec un grand échantillon de patients atteint de la PR. Cela suggère que notre étude nécessite un large échantillon pour plus de précision.

Le but principal de cette comparaison c'est de mettre en valeur l'utilité du la recherche de anti-CCP IgG et IgA simultanément ou séparé pour confirmer le diagnostic d'une PR.

Les résultats obtenus dans le **tableau de contingence** montrent l'association entre le FR IgM et le FR IgA et anti-CCP IgG.

3.5 Comparaison du FR IgM et de l'Anti-CCP IgG :

Tableau 3. Corrélation entre le FR IgM et l'Anti-CCP IgG

	ANTI-CCP IgG- négatif	ANTI-CCP IgG- positif	Total
FR/IgM-négatif	86,67% (26)	32,33% (11)	57,81% (37)
FR/IgM-positif	13,33% (4)	67,64% (23)	42,18% (27)
Total	100% (30)	100% (34)	100% (64)

Les résultats obtenue via le logiciel XLstate sont significative (P=0.001). Vingt-six patients (86,67%) sont négative pour le FR IgM et anti- CCP IgG, vingt-trois (67,64%) sont FR IgM+ anti-CCP IgG+, onze malades (32,33%) sont des FR IgM+ anti-CCP IgG-, seul 4 sont des FR IgM+ anti-CCP-.

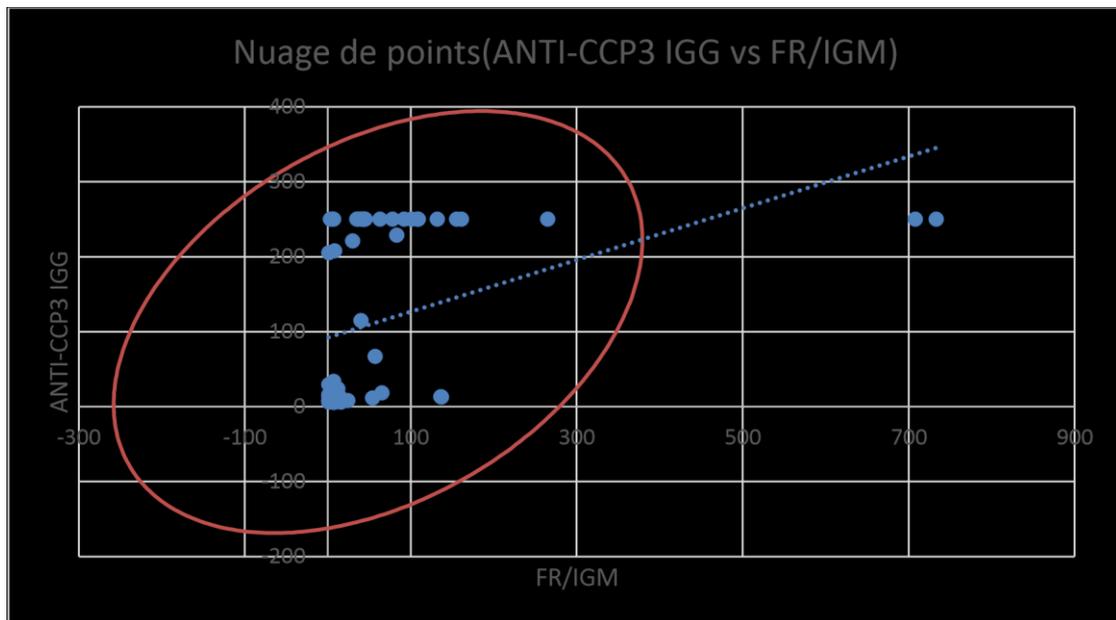


Figure 22 : Représentation de la corrélation FR IgM/anti-ccp IgG en nuage de point. (P= 0,3. IC (95%) (0,160- 0,581))

3.6 Comparaison du FR IgA et de l'anti-CCP IgG :

Tableau 6. Corrélation entre le FR IgA et l'Anti-CCP IgG

	ANTI-CCP IgG-négatif	ANTI-CCP IgG-positif	Total
FR/IgA-négatif	53,33% (16)	14,70% (5)	32,81% (21)
FR/IgA-positif	46,67% (14)	85,29% (29)	67,18% (43)
Total	100% (30)	100% (34)	100% (64)

Les résultats obtenus via le logiciel XLstate sont hautement significative (P=0.000). vingt-neuf patients sont positifs pour les deux anticorps, seize sont négatifs pour les deux anticorps, tandis que quatorze sont négatif pour l'anti-CCP IgG et positifs pour FR IgA, seul cinq sont négatifs pour FR IgA et positif pour l'anti-CCP IgG.

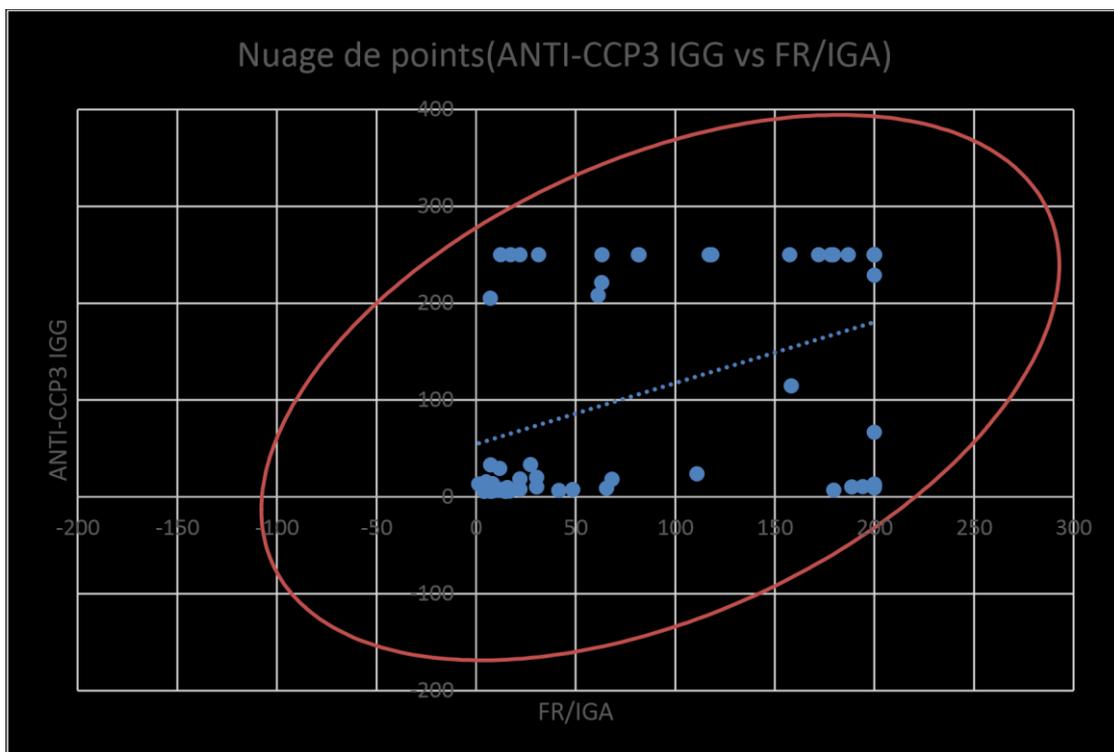


Figure 23 : Représentation de la corrélation FR IgA/anti-CCP IgG en nuage de point. (P= 0,2. IC (95%) (0,228- 0,625))

L'association FR IgM/ anti-CCP IgG et FR IgA/anti-CCP IgG est inférieure par rapport à celle de FR IgM ou FR IgA /anti-CCP IgG/IgA. cela confirme la nécessité de la recherche des anti-CCP isotype IgA pour compléter et établir un diagnostic bien précis d'une PR, même si les résultats statistique sont hautement significatif cela cliniquement ne l'est pas, car dans étude similaire réalisé par (Meyer P *et al.*, 2018) a démontré que la recherche de

+

ACPA-IgA présente une spécificité extrêmement élevée et une valeur prédictive, ainsi qu'une association positive avec l'activité de la maladie.

3.7 Comparaison du Facteur Rhumatoïde :

Tableau 5. Comparaison du facteur rhumatoïde IgM et IgA

	FR/IGA-négatif	FR/IGA-positif	Total
FR/IGM-négatif	31,25% (20)	26,56% (17)	57,81% (37)
FR/IGM-positif	1,56% (1)	40,62% (26)	42,18% (27)
Total	32,81% (21)	67,18% (43)	100% (64)

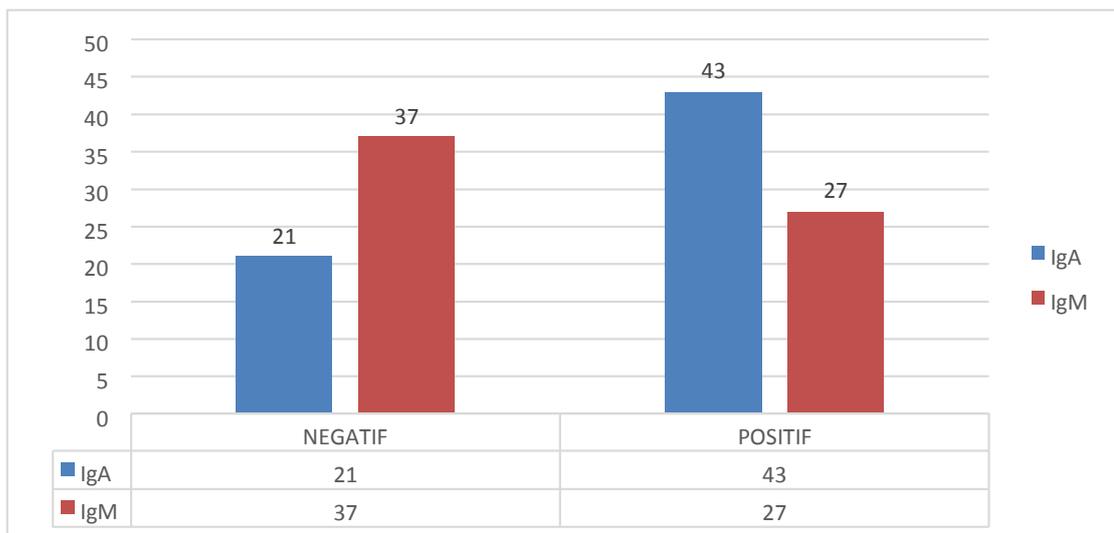


Figure 24 : Histogramme des résultats sérologiques des facteurs rhumatoïdes IgM/IgA chez les malades PR.

Le facteur rhumatoïde le plus recherché en routine pour le diagnostic d'une polyarthrite rhumatoïde est l'IgM, les IgG et IgA sont aussi présents dans le sérum des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, ces deux isotypes peuvent fournir des informations supplémentaires au diagnostic de la PR.

Les résultats statistiques obtenus par SPSS à un facteur, sont hautement significatifs ($p=0.000$) entre les groupes pour les deux paramètres Facteurs rhumatoïdes (IgM/IgA). Les résultats sérologiques sont représentés dans l'histogramme (Figure 24). Pour l'ensemble des patients PR ($n=64$) 42,18% sont IgM séropositive et 67,18% IgA séropositive (c'est résultats représente aussi la combinaison de chaque isotype avec l'anti-CCP IgG/IgA), nos résultats concorde avec celle de (Elshafie *et al.*, 2019) et contrairement à notre étude, (Singh *et al.* 2010) ont trouvé que (47.89%) sont IgM séropositive et (36.97%) FR IgA.

La distribution des isotypes FR est présentée dans le **Tableau 5** : On note que la prévalence la plus exprimé par apports les autres combinaisons isotypes positives revient à IgM+ IgA+ (n=27), puis IgM- IgA+ (n=17), et la plus faible positivité revient à la combinaison IgM+ IgA- (n=1). Suivi par l'association IgM- IgA- (n=20) qui représente les patients séronégatifs, la présence des anti-CCP chez 31.25% des patients atteints de la polyarthrite rhumatoïde en l'absence des facteurs rhumatoïdes (IgM/IgA) semblent jouer un rôle important dans le diagnostic de cette dernière.

D'une part cela ne concorde pas avec l'étude de (**Sieghart *et al.*, 2018**) où l'IgM était le principal auto-anticorps avec 188 patients étaient positifs, d'autre part, cette étude est en accord avec nos résultats en terme de combinaison IgM+ IgA+ avec une prévalence plus élevé que la nôtre.

À travers la recherche de FR IgA on remarque que le nombre des patients séronégatifs diminue de 25% (16 patients).

D'après ces résultats obtenus on peut conclure que la recherche du FR IgM seul n'est pas largement suffisant pour le diagnostic de la PR. Cependant la combinaison IgM+ IgA ou en absence du facteur rhumatoïde le plus dominant l'IgM semble apporté un résultat plus précise pour le diagnostic de la PR, ainsi selon S.Pai *et al.*, la présence du facteur rhumatoïde IgA s'est révélée associée à une évolution progressive rapide, à l'apparition des manifestations extra-articulaires (principalement vascularite rhumatoïde systémique) (**Pai *et al.*, 1998** ; **Bas *et al.*, 2003**)

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune systémique caractérisée par une inflammation chronique des articulations dont la synovite inflammatoire est la lésion élémentaire responsable des troubles structurels et une destruction de l'os et du cartilage.

La polyarthrite rhumatoïde est une affection multifactorielle relevant de facteurs génétiques, environnementaux, neuropsychologiques et immunologiques. Le diagnostic doit être aussi précoce que possible car c'est au stade du début de la maladie que les traitements ont le plus de chance d'être efficaces.

Après avoir réalisé une recherche sérologique du facteur rhumatoïde isotype IgA et des anti-CCP chez les patients PR, cela nous a permis la mise en valeur de ces derniers dans le diagnostic de cette maladie.

Les anti-CCP sont un marqueur biologique de la PR par excellence. Ils jouent un rôle dans la prédiction et dans le suivi de la maladie, car ils peuvent être présents avant l'apparition des symptômes.

La combinaison FR IgM/IgA rajoute de la valeur au diagnostic, car le facteur rhumatoïde est impliqué dans la sévérité de la maladie ce qui suggère un intérêt pronostique de ces derniers.

D'après nos résultats, le dosage du facteur rhumatoïde IgA serait d'un grand intérêt diagnostique pour une immuno-surveillance des patients afin de freiner l'évolution de la PR.

Pour les perspectives, nous souhaitons mettre en évidence le mécanisme par lequel le facteur rhumatoïde est impliqué dans la sévérité de la polyarthrite rhumatoïde, ainsi que le type d'atteinte qu'il peut caractériser. Et pour les anticorps anti-CCP, sont des marqueurs de la PR par excellence mais cela n'empêche pas d'exploiter d'autres marqueurs biologiques, pour un bon suivi et une bonne prise en charge. Ainsi, bien que notre étude ait été réalisée sur un petit groupe de patients, elle montre que ces marqueurs méritent d'être

approfondis dans une population plus large afin de mieux déterminer leur utilité en tant que marqueurs de diagnostic et de pronostic de la polyarthrite rhumatoïde.