

UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE II
FACULTE DES SCIENCES DE LUMINY
ECOLE DOCTORALE DE LA VIE ET DE LA SANTE

THESE DE DOCTORAT
SPECIALITE IMMUNOLOGIE
soutenue par Caroline CHARPIN
en vue d'obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE AIX-MARSEILLE II
le 15 Décembre 2011

NOUVEAUX AUTO-ANTICORPS DANS LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE

JURY

Rapporteur : Professeur Guy SERRE

Rapporteur : Professeur Eric TOUSSIROT

Examineur : Professeur Jean ROUDIER

Directrice de Thèse : Docteur Isabelle AUGER

Laboratoire UMR 639 Immunogénétique de la polyarthrite rhumatoïde
163 avenue de Luminy 13288 MARSEILLE CEDEX 09

Remerciements

Je remercie le Professeur Guy Serre et le Professeur Eric Toussirod d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie le Professeur Jean Roudier qui m'a permis de réaliser le Master 2 puis ces trois années de travail dans l'unité U639.

Je remercie tout particulièrement le Docteur Isabelle Auger, qui a dirigé, encadré et soutenu tout ce projet. Merci pour ton aide indispensable, ta patience, ta franchise.

Une pensée affectueuse pour chacun des membres de l'équipe U639. Vous m'avez fait découvrir votre passion pour le travail de recherche. Merci de votre soutien chaleureux pendant les moments les plus difficiles.

Je remercie aussi les médecins du service du Pr Roudier qui ont collaboré à ce projet, et qui m'ont permis de travailler par alternance au laboratoire.

A ma famille et mes amis.

Résumé

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est le rhumatisme inflammatoire chronique le plus fréquent. Cette maladie auto-immune se manifeste par des poussées d'arthrite, en particulier des mains, et peut entraîner des manifestations systémiques. En l'absence de traitement, le cartilage articulaire se détruit. Il est donc nécessaire de pouvoir faire un diagnostic rapide de la maladie.

La physiopathologie de la PR est complexe. C'est une maladie génétique où il existe plusieurs allèles de susceptibilité HLA-DRB1. Plusieurs auto-anticorps ont été décrits dans cette maladie. La famille la plus spécifique d'auto-anticorps reconnaît les protéines citrullinées. Ils sont détectés par les tests anti-peptides cycliques citrulinés (anti-CCP).

1/L'objectif de notre premier travail était de montrer l'influence des allèles de susceptibilité HLA-DR sur la présence d'anti-CCP dans notre population marseillaise de PR. **Nous avons montré que les allèles de susceptibilité HLA-DR ne sont pas nécessaires à la présence des anticorps anti-CCP. Nous avons mis en évidence une association entre l'allèle HLA-DRB1*04:04 et la présence des anti-CCP.**

2/Environ un tiers des patients présentant une PR n'ont pas d'anticorps anti-CCP. Nous avons donc recherché des nouveaux auto-anticorps pour le diagnostic de la maladie.

Les auto-anticorps dirigés contre le domaine catalytique de la protéine B-Raf (v raf murine sarcoma viral oncogen homologue B1) ont été identifiés par la technique des puces à protéines chez les patients PR. B-Raf est une sérine-thréonine kinase qui est impliquée dans la voie des MAP-kinase jouant un rôle dans l'inflammation. **Nous avons montré que les auto-anticorps anti-B-Raf activent B-Raf.**

En recherchant quels épitopes sont reconnus par ces auto-anticorps, **nous avons montré que le peptide p25 (656-675) de B-Raf est spécifiquement reconnu par les auto-anticorps des PR. Les auto-anticorps anti-p25 identifient 21% des patients PR sans anticorps anti-CCP.**

3/En utilisant des puces à protéines, **nous avons identifié 24 nouveaux auto-antigènes associés aux PR débutantes. Quatre de ces auto-antigènes ont été validés** par ELISA : GABARAPL2 (GABA(A) receptor associated protein like, ZNF706 (zinc finger protein) 706, TPM2 (tropomyosin 2) et WIBG (within BGCN homolog (Drosophila)). Les auto-anticorps anti-WIBG identifient exclusivement les PR.

Ces nouveaux auto-antigènes pourront être utilisés dans le diagnostic des PR débutantes et des PR sans anticorps anti-CCP.

Liste des abréviations

ACAN=anticorps anti-nucléaires

ACPA=auto-anticorps anti-protéines citrullinées

ACR=american college of rheumatology

AFIBA=anti-fibrinogen auto-antibody

AKA=anticorps anti-kératine

AMM=autorisation de mise sur le marché

ANCA=anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires

Anti-CCP=anticorps anti-peptides cycliques citrullinés

APN=anticorps anti-périnucléaire

B-Raf=v raf murine sarcoma viral oncogen homologue B1

CRP=C reactive protein

EBV=Epstein-Barr virus

ELISA=enzyme-linked immuno-sorbent assay

ERK=extra-cellular related kinase

FR=facteur rhumatoïde

GABARAPL2=GABA(A) receptor associated protein like

GPI=glucose-6-phosphate isomérase

IFI=immuno-fluorescence indirecte

Ig=immunoglobuline

IL=interleukine

HAS=Haute Autorité de Santé

HLA=human leucocyte antigen

LB=lymphocyte B

LT=lymphocyte T

MAP-kinase=mitogen activated protein kinase

MEK=mitogen extra-cellular regulated kinase

PAD4=peptidyl-arginine-déiminase 4

PR=polyarthrite rhumatoïde

RhumPso=rhumatisme psoriasique

SPA=spondylarthrite ankylosante

TNF=tumor necrosing factor

TPM2=tropomyosin 2

WIBG=within BGCN homolog (drosophila)

ZNF706=zinc finger protein) 706

Liste des figures et tableaux

Figure 1 Schéma de l'articulation du genou	3
Figure 2 Articulations les plus souvent atteintes dans la PR	5
Figure 3 Déformation typique des mains dans une PR	5
Figure 4 Nodules rhumatoïdes localisés sur le tendon d'Achille	6
Figure 5 Principales voies de signalisation impliquées dans la PR	12
Figure 6 Localisation des gènes HLA-DR sur le bras court du chromosome 6	14
Figure 7 Nomenclature des allèles HLA de classe II	15
Figure 8 Séquence de l'épitope partagé sur les différents allèles de susceptibilité	16
Figure 9 Cristallographie de la molécule HLA-DR correspondant au génotype HLA-DR4	17
Figure 10 Gènes impliqués dans la PR	18
Figure 11 Schéma d'un FR complexé avec le fragment Fc d'une IgG	25
Figure 12 Citrullination : hydrolyse d'un résidu arginine en citrulline avec libération d'une molécule d'ammonium	29
Figure 13 APN en immunofluorescence sur cellules buccales	32
Figure 14 AKA par IFI	32
Figure 15 Prévalences des anticorps anti-CCP dans les autres rhumatismes	36
Figure 16 Structure de B-Raf	44
Figure 17 Situation de B-Raf dans la cascade de la MAP-kinase ERK	44
Figure 18 Puces à protéines	48
Figure 19 Critères ACR 1987 et ACR 2010	51
Figure 20 Radiographie de mains de PR	54
Figure 21 Déformations des mains	59
Figure 22 Risque de développer une PR avec ACPA selon le tabagisme et selon le nombre d'allèles de susceptibilité	71

Figure 23 Pourcentage de PR avec auto-anticorps anti-p25 selon le nombre d'EP, parmi 297 PR de Marseille et Evry	77
Figure 24 Pourcentage de sérum positif pour p25	78
Tableau 1 Facteurs génétiques de prédisposition à la PR	20
Tableau 2 Positivité du FR dans les pathologies non rhumatismales	27
Tableau 3 Positivité du FR dans les pathologies rhumatismales	27
Tableau 4 Implication de la citrullination dans plusieurs situations pathologiques	31
Tableau 5 Sensibilité et spécificité des différents tests anti-peptides ou protéines citrullinées comparés au FR	35
Tableau 6 Combinaison des FR et anticorps anti-CCP	37
Tableau 7 Les biothérapies indiquées dans la PR en 2011	56
Tableau 8 Evolution des arthrites indifférenciées après 6 à 12 mois	59
Tableau 9 Comparaison des FR et du génotype HLA-DR pour les PR de Marseille avec et sans ACPA	77
Tableau 10 Pourcentage de sérum contenant des auto-anticorps dirigés contre les 4 protéines associées aux PR débutantes	82
Tableau 11 Caractéristiques des PR débutantes et des PR de plus de 5 ans d'évolution	84

Table des matières

INTRODUCTION	1
1. LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE (PR)	1
1. EPIDEMIOLOGIE	1
2. PRESENTATION CLINIQUE	3
A) LESIONS HISTOLOGIQUES	3
B) ATTEINTES ARTICULAIRES	4
C) ATTEINTES EXTRA-ARTICULAIRES	6
D) CO-MORBIDITES	7
3. LES ACTEURS DE L'ARTHRITE RHUMATOÏDE	8
A) LE ROLE CENTRAL DES LT	8
B) LES SYNOVIOCYTES FORMENT LE PANNUS SYNOVIAL	9
C) LE ROLE DES LB	9
D) LES CYTOKINES	10
E) LES VOIES DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRES INFLAMMATOIRES	11
2. LES ORIGINES DE LA PR	13
1. LES ACTEURS GENETIQUES	13
A) LES GENES HLA-DR SONT LES PRINCIPAUX FACTEURS DE PREDISPOSITION A LA PR	13
B) LES AUTRES GENES DE PREDISPOSITION	18
2. LES ACTEURS ENVIRONNEMENTAUX	20
A) LE TABAGISME	21
B) LES INFECTIONS	22
C) LES FACTEURS LIES AU SEXE	23
3. LES AUTO-ANTICORPS DANS LA PR	24
1. L'IMPORTANCE DES AUTO-ANTICORPS DANS LA PR	24
2. LA PR AVANT LES ACPA : LE FACTEUR RHUMATOÏDE (FR)	25
A) NATURE DU FR	25
B) PLUSIEURS TESTS PEUVENT METTRE EN EVIDENCE LE FR	25
C) LE FR DANS LA PR	26
3. LES ACPA ONT REVOLUTIONNE LE DIAGNOSTIC DE LA PR	28

A) LA CITRULLINATION	28
B) LES CIBLES DES ACPA	31
C) LES TESTS DE DETECTION DES ANTICORPS ANTI-PEPTIDES CITRULLINES	34
4. LES AUTO-ANTICORPS DIRIGES CONTRE DES PROTEINES NON CITRULLINEES	39
A) LES AUTO-ANTICORPS ANTI-COLLAGENE DE TYPE II	39
B) LES AUTO-ANTICORPS ANTI-NUCLEAIRES (ACAN)	39
C) LES AUTO-ANTICORPS ANTI-CYTOPLASME DES POLYNUCLEAIRES (ANCA)	40
D) LES AUTO-ANTICORPS ANTI-RA-33	40
E) LES AUTO-ANTICORPS ANTI-FERRITINE	40
F) LES AUTO-ANTICORPS QUI INTERFERENT AVEC LES VOIES DE CO-STIMULATION	41
G) LES AUTO-ANTICORPS ANTI-GLUCOSE-6-PHOSPHATE ISOMERASE (GPI)	41
H) LES AUTO-ANTICORPS ANTI-CALPASTATINE	41
I) LES AUTO-ANTICORPS ANTI-PEPTIDYL ARGININE DEIMINASE 4 (PAD4)	42
J) LES AUTO-ANTICORPS ANTI-B-RAF	42
5. LES STRATEGIES DANS LA RECHERCHE DE NOUVEAUX AUTO-ANTICORPS DANS LA PR	47
A) GEL BI-DIMENSIONNEL ET SEQUENÇAGE	47
B) LES LIBRAIRIES D'ADN COMPLEMENTAIRES RECOMBINANTS	47
C) LES PUCES A PROTEINES	48
D) LES PUCES A PEPTOÏDES	49
4. LE DIAGNOSTIC DE LA PR EN PRATIQUE	50
1. QUELS SONT LES OUTILS A NOTRE DISPOSITION POUR LE DIAGNOSTIC ?	50
A) ELEMENTS CLINIQUES	50
B) CRITERES DE CLASSIFICATION	50
C) DIAGNOSTIC ANATOMO-PATHOLOGIQUE	52
D) DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE	52
E) EXAMENS D'IMAGERIE	53
2. POURQUOI UN DIAGNOSTIC RAPIDE EST NECESSAIRE	55
A) LES BASES DU TRAITEMENT	55
B) LES TRAITEMENTS DE LA PR SONT TRES EFFICACES	56
C) LES BIOTHERAPIES SONT RESERVEES AUX PR CERTAINES	57
3. POURQUOI LE DIAGNOSTIC DE PR PEUT ETRE DIFFICILE	58
A) CERTAINS RHUMATISMES RESSEMBLENT A LA PR	58
B) CERTAINS RHUMATISMES RESTENT INDIFFERENCIES	60
C) LES SITUATIONS DIFFICILES EN PRATIQUE	61

RESULTATS EXPERIMENTAUX **63**

PUBLICATION 1 HLA-DRB1*04:04 IS STRONGLY ASSOCIATED WITH ANTI-CYCLIC CITRULLINATED PEPTIDE ANTIBODIES IN RHEUMATOID ARTHRITIS **63**

CLIN EXP RHEUMATOL. 2008 **63**

PUBLICATION 2 AUTO-ANTIBODY TO B-RAF, A NEW FAMILY OF AUTO-ANTIBODY ASSOCIATED WITH RHEUMATOID ARTHRITIS **65**

ARTHRITIS RES THER. 2010 **65**

PUBLICATION 3 NEW AUTO-ANTIBODIES ASSOCIATED WITH EARLY RHEUMATOID ARTHRITIS (EN PRÉPARATION) **67**

DISCUSSION **69**

1. PHYSIO-PATHOLOGIE DE LA PR : LA PRODUCTION DES ACPA EST-ELLE-CONTROLEE PAR LE GENOTYPE HLA-DR? **69**

A) ROLE DU GENOTYPE HLA-DR DANS LA PRODUCTION D'ACPA 69

B) ROLE DU TABAGISME DANS LA PRODUCTION D'ACPA 71

C) PAR QUEL MECANISME LE GENOTYPE HLA-DR ET LE TABAGISME INFLUENCENT-ILS LA PRODUCTION D'ACPA ? 72

D) LES PR AVEC ET SANS ACPA SONT-ELLES DES MALADIES DIFFERENTES ? 73

2. AUTO-ANTICORPS ANTI-B-RAF : IMPLICATIONS DANS LA PR **76**

A) LES AUTO-ANTICORPS ANTI-B-RAF, OUTIL DIAGNOSTIQUE DANS LA PR 76

B) ROLE FONCTIONNEL DES AUTO-ANTICORPS ANTI-B-RAF 79

C) MUTATIONS DE BRAF DANS LA SYNOVIALE DE PR 79

D) EXISTE-IL UN LIEN ENTRE PR ET MELANOME ? 80

3. RECHERCHE DE NOUVEAUX AUTO-ANTICORPS DANS LES PR DEBUTANTES **81**

A) QUATRE NOUVEAUX AUTO-ANTICORPS SPECIFIQUES DES PR DEBUTANTES 81

B) DIMINUTION DES 4 AUTO-ANTICORPS EN FONCTION DE L'ÉVOLUTION DE LA PR 85

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES **87**

BIBLIOGRAPHIE

ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

INTRODUCTION

1. La polyarthrite rhumatoïde (PR)

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est caractérisée par une atteinte articulaire bilatérale et symétrique, évoluant vers la **destruction des articulations** atteintes. Le terme « rheuma » veut dire « ce qui s'écoule » et désigne l'épanchement articulaire.

La PR est une **maladie systémique** car elle ne concerne pas seulement les articulations. Le poumon, le cœur et le système nerveux peuvent être atteints.

La PR est une **maladie auto-immune**. En effet il existe des anomalies du système immunitaire qui se manifestent par la production d'**auto-anticorps**.

La PR a été identifiée il y a plusieurs milliers d'années en Amérique du Nord mais la maladie n'est apparue en Europe qu'au 17^{ème} siècle. Elle est en pleine révolution thérapeutique depuis les années 2000 avec l'utilisation des médicaments de la famille des anti-TNF α qui ont largement amélioré le traitement de la maladie.

La cause de la maladie est toujours inconnue. Les gènes HLA-DR constituent le facteur génétique de risque le plus important. Les auto-anticorps anti-citrulline jouent un rôle majeur dans la maladie.

1. Epidémiologie

La PR est le rhumatisme inflammatoire chronique le plus fréquent. On estime que sa **prévalence mondiale est d'environ 0,5%** (Lawrence *et al.*, 1998; Kvien *et al.*, 1997). En France, sa prévalence est estimée à 0.3% (Guillemin *et al.*, 2005) et à 0,7% pour la région PACA (Roux, 2007).

Depuis les années 1950 une diminution de la prévalence a été notée dans la plupart des pays (Uhlig, 2005).

L'incidence de la maladie est estimée à 20 à 75 cas/ 100 000 par an aux Etats-Unis (Gabriel *et al.*, 1999) et en Europe du Nord (Aho *et al.*, 1998). Elle est plus

faible au Sud de l'Europe avec environ 8 cas/100 000 en Espagne (Carbonell *et al.*, 2008).

L'incidence est la plus haute **entre 40 et 60 ans** et **les femmes sont 3 fois plus touchées** que les hommes (Carbonell *et al.*, 2008).

2. Présentation clinique

a) Lésions histologiques

La membrane synoviale est la principale cible de la PR. La synoviale recouvre la capsule articulaire, la gaine des tendons et les bourses séreuses (figure 1).

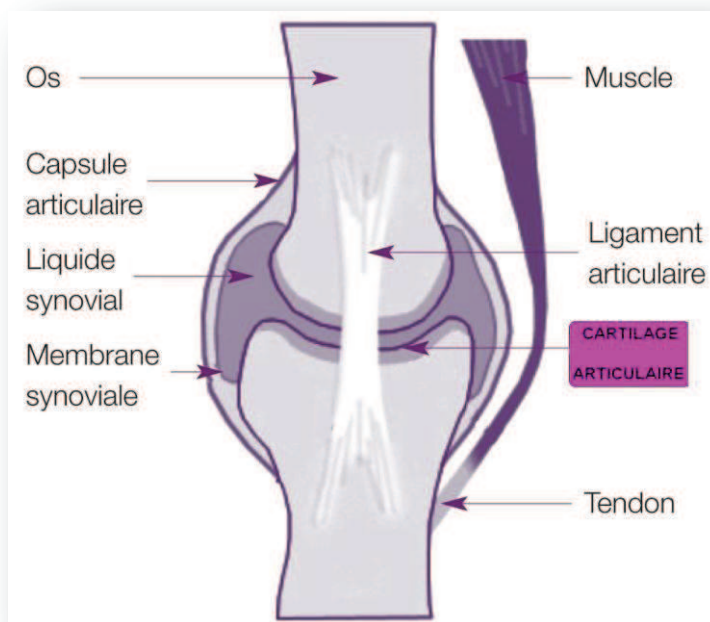


Figure 1 Schéma de l'articulation du genou

La synoviale normale est composée d'une couche unique comprenant 2 types de cellules : les synoviocytes A qui sont des macrophages et les synoviocytes de type B qui sont des fibroblastes. Il n'y a pas de membrane basale.

La synovite inflammatoire est la lésion élémentaire responsable de la destruction articulaire dans la PR. Les premières lésions touchent les microvaisseaux situés sous la synoviale. La synoviale prolifère, à la fois à partir des synoviocytes de type A et de type B, et par l'arrivée par voie vasculaire de lymphocytes T (LT) CD4+. Ces cellules s'organisent en agrégats lymphoïdes dont la structure rappelle celle d'un ganglion. On trouve également de la nécrose et des dépôts de fibrine. La synoviale devient hyperplasique et hypertrophique. Elle forme des villosités macroscopiques dans la cavité articulaire appelées pannus synovial. Les LT activés et les synoviocytes sécrètent des cytokines pro-

inflammatoires et des métallo-protéases qui agressent le cartilage et entraînent une destruction osseuse sous-chondrale (Firestein, 1996).

b) Atteintes articulaires

La PR se manifeste par une polyarthrite bilatérale, symétrique et distale. Elle concerne en général plus de 3 articulations, en particulier les poignets, les articulations métacarpo-phalangiennes ou inter-phalangiennes proximales, et les métatarso-phalangiennes (figure 2). Le patient décrit des douleurs de rythme inflammatoire et l'examen objective une **synovite** (gonflement articulaire). Les ténosynovites (extenseur ulnaire du carpe) et bursites (olécrânienne, achilléenne) sont fréquentes.

A la phase de début, les lésions sont douloureuses mais réversibles. Les phases inflammatoires évoluent par poussées successives favorisées par les infections, le stress, les interventions chirurgicales. En l'absence de traitement adapté, les articulations sont déformées par ces poussées inflammatoires du fait de la destruction du cartilage articulaire et des lésions tendineuses.

Les déformations les plus typiques aux mains sont : le pouce en Z (hyperflexion de la 1^{ère} métatarso-phalangienne), les doigts en maillet, en col de cygne, en boutonnière (rupture des extenseurs et fléchisseurs de doigts), le coup de vent ulnaire par subluxation des articulations métacarpo-phalangiennes (figure 3).

Pour le pied : hallux valgus, pied plat triangulaire, orteils en griffe. D'autres atteintes sont fréquentes : le flessum des coudes, l'arthrite cervicale entre les deux premières vertèbres responsables de compression médullaire.

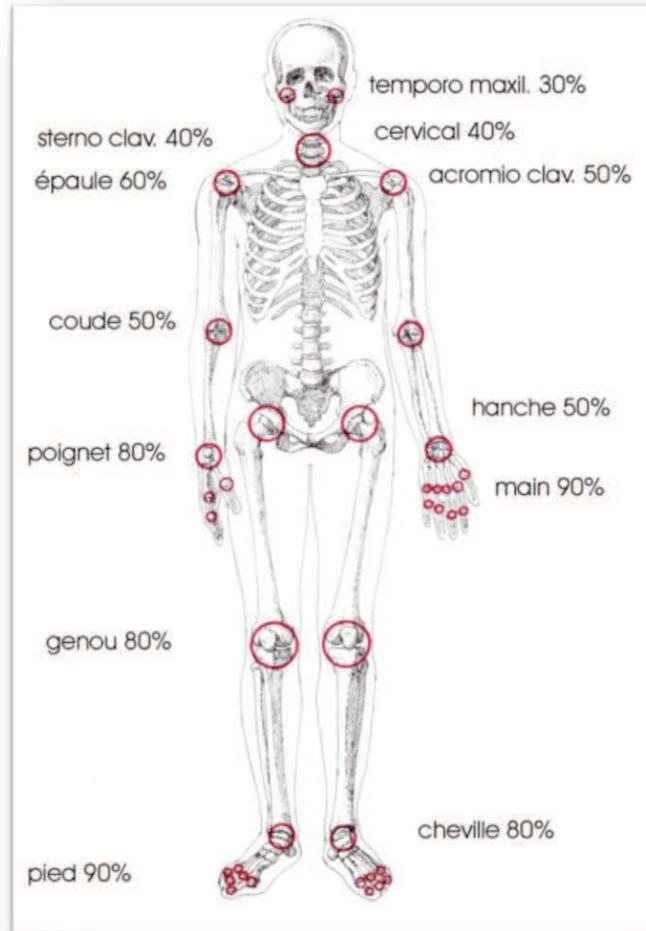


Figure 2 : Articulations les plus souvent atteintes dans la PR

Toutes ces lésions sont responsables **d'un handicap esthétique et fonctionnel** retentissant sur la qualité de vie et l'aptitude professionnelle.



Figure 3 Déformation typique des mains dans une PR : subluxation des articulations métacarpo-phalangiennes

c) Atteintes extra-articulaires

Elles sont présentes chez environ 40% des patients et sont d'autant plus fréquentes que la maladie articulaire est sévère.

Les nodules rhumatoïdes sont des tuméfactions arrondies localisées principalement dans les tissus sous-cutanés, aux faces d'extension des coudes, sur le tendon d'Achille, autour du pavillon de l'oreille (figure 4). Ils sont très spécifiques de la maladie mais apparaissent tardivement au cours de la PR et sont corrélés à d'autres complications extra-articulaires. Il s'agit d'un foyer de nécrose fibrinoïde entouré d'une couronne histiocytaire palissadique.

Il s'agit de l'atteinte extra-articulaire la plus fréquente (20% des patients) et la plus précoce (après 3 ans d'évolution de la maladie) (Turesson *et al.*, 2008).



Figure 4 Nodules rhumatoïdes localisés sur le tendon d'Achille

La vascularite rhumatoïde est une complication sévère et rare (1%) de la maladie. Il s'agit d'une vascularite leucocytoclasique le plus souvent. Elle est due à des dépôts de complexes immuns dans la paroi vasculaire. Elle se manifeste surtout par des ulcérations cutanées (Mikuls, 2003).

La maladie peut toucher tous les organes. Les atteintes les plus fréquentes sont le cœur (péricardite, myocardite), le poumon (pleurésie, fibrose pulmonaire, nodules), les yeux (sclérite), le rein (glomérulopathie et amylose secondaire). Des complications nerveuses sont possibles (vascularite nerveuse, compression radiculaire (nerf médian au canal carpien) ou médullaire).

d) Co-morbidités

La PR était considérée jusqu'au début des années 1980 comme une maladie handicapante mais avec un bon pronostic vital. Cette notion n'est plus d'actualité car il a été mis évidence une surmortalité cardio-vasculaire dans la PR qui est responsable d'une diminution de la durée de vie de 10 ans en moyenne. Il existe donc un enjeu vital à traiter les patients.

Les complications cardio-vasculaires sont fréquentes et représentent la moitié des causes de décès liés à la PR. Le risque relatif de décès cardiovasculaire est de 2,2. Le risque d'insuffisance cardiaque congestive est augmenté de 60% et le risque d'infarctus est augmenté de 40%. Le risque cardio-vasculaire est lié chez ces patients à l'augmentation des facteurs de risque classiques (tabagisme, hypertension, diabète, cortisone) mais aussi à l'inflammation systémique liée à la PR non contrôlée (Mikuls, 2003). En pratique la PR est actuellement considérée comme un facteur de risque cardio-vasculaire indépendant.

L'ostéoporose. L'inflammation systémique chronique est responsable d'une perte osseuse générale. La PR est reconnue comme un facteur d'ostéoporose indépendant des traitements administrés. Un tiers des femmes souffrant d'une PR vont avoir une fracture ostéoporotique au bout de 5 ans d'évolution de la maladie (El Maghraoui *et al.*, 2010).

Les infections sont plus fréquentes. Elles représentent un quart des causes de décès dans la PR. Selon les études le risque relatif est de 5 à 15 par rapport à la population générale. Elles sont favorisées par les traitements immuno-suppresseurs et le diabète cortico-induit. Il s'agit d'infections principalement pulmonaires et cutanées (Mikuls, 2003).

Les syndromes lympho-prolifératifs. Le risque relatif de lymphomes malins non hodgkiniens dans la PR est de 2 à 23 et de 2 à 7 pour la maladie de Hodgkin selon les études (Mikuls, 2003). Ce risque varie en fonction des traitements utilisés, de l'activité de la maladie et de l'ancienneté de la maladie.

3. Les acteurs de l'arthrite rhumatoïde

a) Le rôle central des LT

- **Comment le LT contribue à la formation du pannus synovial**

Au départ de l'inflammation, il y a l'activation des LT par la reconnaissance d'un antigène. On ne connaît pas l'antigène déclenchant.

Les LT, une fois activés, sont recrutés dans la synoviale à partir du sang périphérique. Ce recrutement des LT est favorisé par une angiogénèse exacerbée notamment par l'intermédiaire du VEGF (vascular endothelial growth factor) (Szekanecz *et al.*, 2009).

Les LT de la synoviale rhumatoïde sécrètent davantage de cytokines pro-inflammatoires (Dolhain *et al.*, 1996). Cette sécrétion va permettre l'activation des cellules synoviales résidentes (LB, macrophages, cellules endothéliales et fibroblastes). L'ensemble de ces cellules synoviales activées va sécréter des cytokines, chemokines et métallo-protéases. C'est une boucle d'inflammation.

- **Particularités des LT dans la PR**

Le profil des LT est de type Th1. Les LT CD4+ naïfs (Th0) après reconnaissance d'un antigène vont se différencier en plusieurs types de LT. Les lymphocytes de type Th1 produisent des cytokines pro-inflammatoires : l'interféron gamma (INF γ), le Tumor necrosing Factor alpha (TNF α) et l'interleukine 2 (IL-2). Les LT de type Th2 sécrètent des cytokines anti-inflammatoires (surtout l'IL-4 et IL-10) (Mosmann *et al.*, 1989; Lutzky *et al.*, 2007). Dans la synoviale rhumatoïde, les lymphocytes Th1 sont particulièrement abondants.

En 2007, un autre type de **LT, distinct des LT Th 1 et Th 2, sécrétant de l'IL-17, a été identifié et nommé Th17.** Les LT Th 17 ont un rôle pro-inflammatoire dans la PR (Bettelli *et al.*, 2007). Les LT Th 17 sécrètent aussi de l'IL-6, de l'IL-21, de l'IL-22 et du TNF α . Les LT Th 17 sont stimulés par l'IL-6 et l'IL-23 (Miossec *et al.*, 2009).

Les LT régulateurs sont déficients dans la PR. L'activation des LT est sous le contrôle des LT régulateurs CD4+ CD25+. Ces LT régulateurs (T reg) sont capables d'inhiber l'expansion clonale des LT CD4+. Chez les patients atteints de PR, il existe un déficit quantitatif et fonctionnel de ces LT dans le sang et l'articulation (Yamagiwa *et al.*, 2011).

Les LT auto-réactifs sont plus nombreux. On appelle LT auto-réactifs, les LT qui sont capables de réagir avec des peptides du soi présentés dans un contexte HLA donné. Chez les patients atteints de PR, la proportion des LT auto-réactifs serait plus élevée que chez les sujets normaux et serait due à une anomalie de la sélection thymique. Dans le thymus, les LT qui reconnaissent les peptides du soi meurent en général par apoptose. Cette sélection clonale dite négative serait déficiente chez les malades atteints de PR et contribuerait à la survie d'un plus grand nombre de LT auto-réactifs. Cette hypothèse est soutenue par les différences observées entre le répertoire des LT des malades atteints de PR et celui des sujets normaux (Schmidt *et al.*, 1996).

b) Les synoviocytes forment le pannus synovial

Les synoviocytes A activés par les LT sont les véritables moteurs de l'inflammation. Ils produisent des médiateurs primaires : les prostaglandines, les leucotriènes, les radicaux libres et des protéases qui participent à la destruction tissulaire. Ils produisent aussi des médiateurs secondaires principalement les cytokines pro-inflammatoires IL-1 et TNF- α (Kinne *et al.*, 2000).

Les synoviocytes B se caractérisent aussi par une capacité de prolifération qui ressemble à celle des cellules cancéreuses par exemple la perte d'inhibition de contact et l'augmentation de l'expression des proto-oncogènes (You *et al.*, 2006).

c) Le rôle des LB

Plusieurs données ont montré l'importance des LB dans le développement de la maladie, en particulier les plasmocytes qui produisent les auto-anticorps. Ces auto-anticorps font de la PR une maladie auto-immune. Les différents auto-anticorps connus dans la PR sont décrits chapitre III.

Les LB interviennent aussi dans la formation de la synovite rhumatoïde. Le nombre des LB peut être très élevé dans le pannus synovial, on parle alors de synovite de type folliculaire.

Les LB aident à l'activation des LT. Ils sont capables de présenter des antigènes aux lymphocytes TCD4+ via les molécules HLA-DR qu'ils expriment.

d) Les cytokines

Dans la PR, il existe un déséquilibre entre les cytokines pro et anti-inflammatoires. Les cytokines pro-inflammatoires produites par les monocytes/macrophages (TNF- α , IL-1, IL-6) sont augmentées dans les articulations rhumatoïdes.

Le TNF- α a un rôle capital dans l'entretien de l'inflammation articulaire (Keffer *et al.*, 1991). Il est principalement produit par les macrophages (Park *et al.*, 2007).

Le TNF- α existe sous 2 formes : le TNF soluble et membranaire. Il peut se lier à 2 types de récepteurs, le TNF-R1 (TNF- α receptor type 1) et le TNF-R2 (TNF-receptor type 2). Le TNF-R1, ubiquitaire, peut être activé par le TNF- α membranaire et le TNF- α soluble, alors que le TNF-R2 que l'on trouve uniquement dans les cellules immunitaires, se lie uniquement au TNF- α membranaire.

Le TNF- α entraîne la production d'IL-1 et d'IL-6, augmente les molécules d'adhésion endothéliales et augmente la production des métallo-protéases qui agressent le cartilage articulaire (Clark, 2005).

L'**IL-1** est produite dans l'articulation principalement par les macrophages. Elle a un effet pro-inflammatoire dans la PR, activant les LT, les LB et les macrophages, stimulant la production de molécules d'adhésion, du TNF- α et de des prostaglandines. Elle a également une action destructrice dans l'articulation (production des métallo-protéases de manière plus importante que le TNF- α) (Dayer, 2003).

L'**IL-6** est sécrétée uniquement en situation pathologique. Elle est produite par plusieurs types de cellules (LT, LB, fibroblastes, cellules endothéliales, monocytes) en réponse à différents stimuli (IL-1, TNF- α , IFN- γ). Elle est un acteur central de la phase aiguë de l'inflammation. L'IL-6 induit la production d'auto-anticorps par les plasmocytes mais n'a pas de rôle sur leur prolifération. Elle entraîne l'activation et la prolifération des LT dans le thymus via l'IL-2. Elle a un rôle dans la destruction osseuse en activant les ostéoclastes (Park *et al.*, 2007).

L'IL-17 stimule la production de métallo-protéases par les ostéoblastes et les chondrocytes. Elle augmente l'expression du RANK-ligand (receptor activator of nuclear factor- κ B) par les ostéoblastes. Le RANK-ligand active les ostéoclastes, ce qui entraîne la résorption osseuse (Miossec *et al.*, 2009).

L'IL-23, produite par les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules présentatrices d'antigènes, contrôle la production d'IL-17 par les LT Th 17 (Aggarwal *et al.*, 2003).

Le rôle central de ces cytokines dans la pathogénie de la PR a été démontré ces dernières années avec l'utilisation des traitements capables de les neutraliser. (tableau 7 p56).

e) Les voies de signalisation intracellulaires inflammatoires

La fixation d'une cytokine à son récepteur membranaire entraîne des phosphorylations en cascade sur des enzymes appelées protéines kinases qui vont activer à leur tour des facteurs de transcription. Ces facteurs de transcription régulent la synthèse de protéines en agissant directement sur le promoteur des gènes codant pour des protéines de l'inflammation, en particulier les métallo-protéases.

Dans la PR, les principales voies de signalisation impliquées dans l'inflammation sont les voies des MAP-kinases (mitogen activated protein kinases). Il existe trois familles de MAP-kinases : ERK (extra-cellular related kinase), c-Jun et p38-MAPK-kinase. Toutes les trois sont exprimées dans le tissu synovial des patients atteints de PR (figure 5).

La voie ERK aboutit à la translocation dans le noyau de facteurs de transcription c-fos et c-jun qui vont permettre l'expression de protéines impliquées dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire.

Les voies c-Jun et p38 MAP-kinase activent des facteurs de transcription tels que Jun, Bcl2, p53, NF κ B qui vont permettre l'expression de protéines de l'inflammation, de l'apoptose ou encore de la motilité cellulaire.

Ces voies de signalisation intra-cellulaires sont des cibles de traitement de la PR en cours d'évaluation. Par exemple l'inhibiteur de MEK1 permet de diminuer l'inflammation (Nishikawa *et al.*, 2003) et la destruction cartilagineuse dans un

modèle d'arthrite au collagène (Thiel *et al.*, 2007). De même l'administration d'un inhibiteur de ERK permet de diminuer le développement d'arthrite au collagène (Ohori *et al.*, 2007). Des inhibiteurs de p38 MAP-kinase ont été essayés avec succès chez des rats présentant une arthrite au collagène en diminuant les signes d'arthrite (Nishikawa *et al.*, 2003).

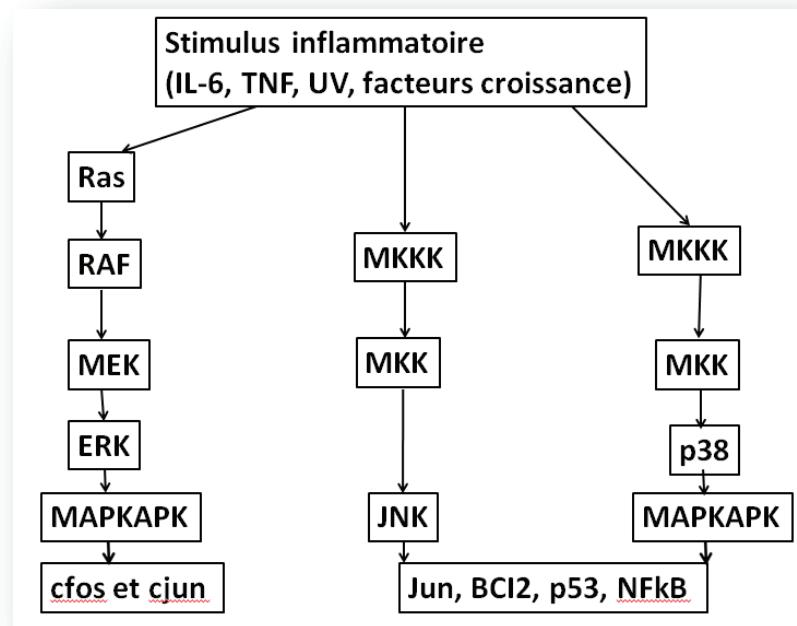


Figure 5 Principales voies de signalisation impliquées dans la PR. MEK=MAP mitogen extra-cellular regulated kinase, ERK =extra-cellularly regulated kinase; JNK = c-Jun N-terminal kinase; MAP = mitogen-activated protein; MAPKAPK = MAP kinase-activated protein kinase; MKK = MAP kinase kinase; MKKK = MAP kinase kinase kinase.

2. Les origines de la PR

Les mécanismes physiopathologiques de la PR ne sont pas encore élucidés mais de nombreuses pièces du puzzle sont assemblées. Plusieurs acteurs interagissent dans la survenue d'une PR : un terrain génétique prédisposant, des facteurs environnementaux et des facteurs liés au sexe.

1. Les acteurs génétiques

La connaissance d'une prédisposition génétique dans la PR est venue de l'analyse des paires de jumeaux dont l'un présentait une PR. Le taux de concordance dans les paires de jumeaux homozygotes est de 12 à 30% et de 5 à 10% pour les jumeaux dizygotes du même sexe (Dieudé *et al.*, 2005).

Une étude réalisée sur 148 paires de jumeaux (64 paires de jumeaux monozygotes et 84 paires de jumeaux dizygotes) montre que les facteurs génétiques contribuent pour 60% au développement de la PR (van der Woude *et al.*, 2010).

a) Les gènes HLA-DR sont les principaux facteurs de prédisposition à la PR

Les gènes HLA-DRB1

Les allèles de prédisposition HLA-DR représentent le facteur génétique le plus important dans la PR : environ 40% des facteurs génétiques (Bowes *et al.*, 2008; Imboden, 2009). Environ 40% de la population générale possède un des allèles de prédisposition à la PR, versus 70% des patients atteints de PR (Dieudé *et al.*, 2005).

Les gènes HLA-DRB1 font partie du système HLA de classe II qui est situé sur le chromosome 6. Le système HLA (human leucocyte antigen) comporte trois classes de gènes (figure 6):

- les gènes de classe I codent pour la chaîne α (chaîne lourde) des molécules d'histocompatibilité de classe I. Cette chaîne lourde, associée à la B2-

microglobuline, présente des peptides d'origine endogène aux LT CD8+ cytotoxiques. Les 3 gènes principaux sont les gènes HLA-A, HLA-B et HLA-C (Staerz *et al.*, 1987).

- les gènes de classe II, en particulier les gènes HLA-DRB1, codent pour les molécules HLA-DR qui sont surtout exprimées sur la membrane des cellules présentant l'antigène. Elles présentent des peptides exogènes aux LT CD4+.

- les gènes de classe III forment un ensemble hétérogène comportant les gènes du TNF α et β , les gènes du complément, et des gènes dont la fonction est inconnue.

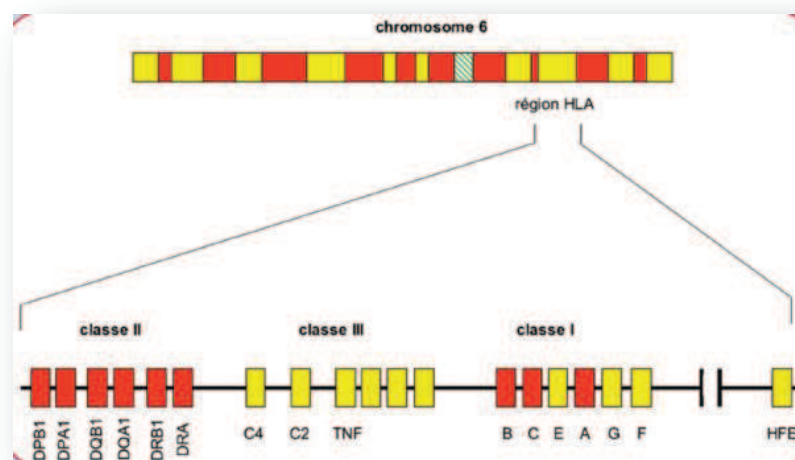


Figure 6 Localisation des gènes HLA-DR sur le bras court du chromosome 6 (d'après Narinder)

Les molécules HLA-DR

Ces molécules sont composées d'une chaîne A et d'une chaîne B, avec un site de liaison pour le peptide antigénique. La chaîne A est codée par le gène HLA-DRA peu polymorphe et la chaîne B est codée par plusieurs gènes dont HLA-DRB1 est le plus polymorphe. C'est ce polymorphisme concentré sur trois régions dites hypervariables qui permet de définir des allèles. La molécule HLA-DR est formée de 2 hélices α et de feuilletts β .

Nomenclature des allèles HLA-DR

La nomenclature des allèles HLA-DR est maintenant définie par le séquençage direct des gènes (Marsh *et al.*, 2010). Par exemple pour l'allèle HLA-DRB1*04:04 (figure 7) :

- D désigne un ensemble de 30 gènes faisant partie de la région HLA de classe II
- R désigne la sous-région
- B désigne la chaîne B
- 1 désigne le locus 1 des gènes DR
- un astérisque suivi de 4 chiffres : les 2 premiers désignent l'allèle, les 2 derniers le sous-type allélique, séparés par deux points.

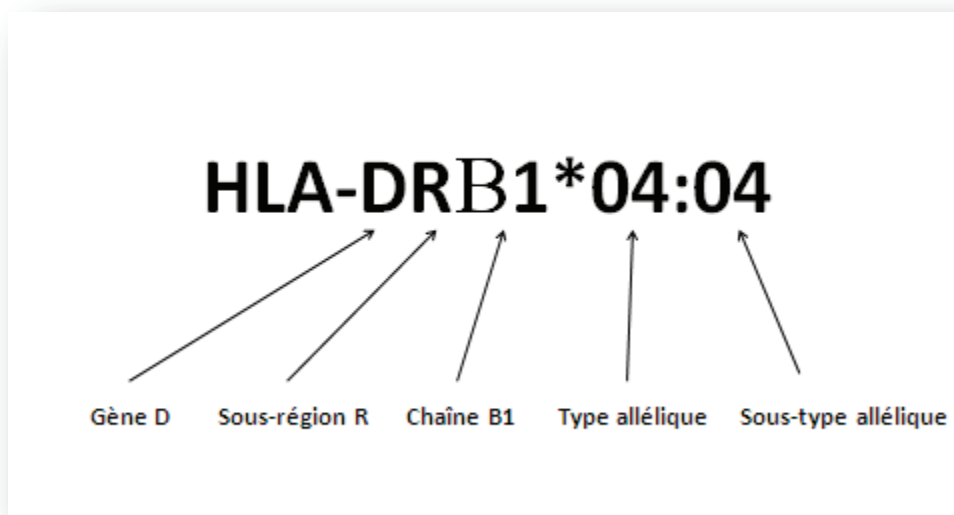


Figure 7. Nomenclature des allèles HLA de classe II

- **Lien entre les gènes HLA-DR et la PR**

L'épitope partagé

Depuis la fin des années 70, on sait que la région HLA-DRB1 représente le principal locus de susceptibilité à la PR (Stastny, 1978).

En 1987, P. Gregersen a montré que la susceptibilité à la PR n'est pas associée à un allèle particulier mais à une séquence d'acides aminés présente sur

plusieurs allèles. Les allèles de susceptibilité ont dans la troisième région hypervariable de leur chaîne B1 en position 70-74 une séquence conservée d'acides aminés (QKRAA, QRRAA, ou RRRAA) appelée épitope partagé (EP) (Figure 8) (Gregersen *et al.*, 1987).

	65	70	74	80	
HLA-DR1	KDLLE	QRRAA	VDTYCR		0101, 0102
HLA-DR10	KDLLE	RRRAA	VDTYCR		1001
HLA-DR4	KDLLE	QKRAA	VDTYCR		0401
	KDLLE	QRRAA	VDTYCR		0404, 0408
	KDLLE	QRRAA	VDTYCR		0405
	KDILE	DERAA	VDTYCR		0402
	KDLLE	QRRAE	VDTYCR		0403, 0406

Figure 8 Séquence de l'épitope partagé sur les différents allèles de susceptibilité (en jaune)

L'épitope partagé est situé dans une poche d'ancrage à peptide de la molécule HLA-DR, la poche P4 (Stern *et al.*, 1994) (figure 9). C'est la charge de cette poche P4 qui définit des allèles de susceptibilité à la PR, des allèles neutres et des allèles protecteurs (Reviron *et al.*, 2001).

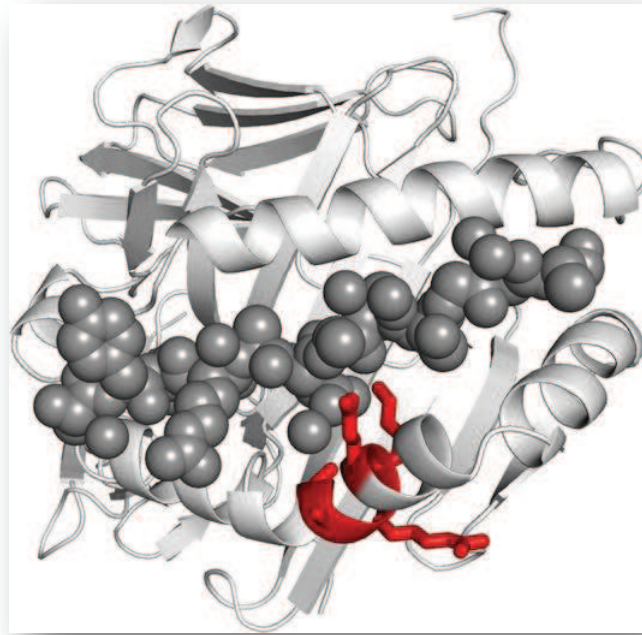


Figure 9 Cristallographie de la molécule HLA-DR correspondant au génotype HLA-DR4. Les 2 hélices α , en rouge l'épitope partagé, et en gris foncé le peptide présenté

Les allèles de susceptibilité

Les allèles de susceptibilité sont :

- HLA-DRB1*01:01 et HLA-DRB1*01:02
- HLA-DRB1*04:01, HLA-DRB1*04:04, HLA-DRB1*04:05 et HLA-DRB1*04:08
- HLA-DRB1*10:01 et HLA-DRB1*14:02

Ces allèles ont une charge très positive dans leur poche P4.

Les allèles protecteurs sont principalement HLA-DR7, HLA-DR8, HLA-DR11, HLA-DR13 (Reviron et al. 2001). Ces allèles ont une charge neutre ou négative dans leur poche P4.

Les allèles neutres sont HLA-DRB1*03, *04:03, *04:06, *04:07, *09:01, *11:07, *14, *15, et *16. Ces allèles ont une charge positive.

En France, environ 50% des PR ont un seul allèle de susceptibilité, 25% en ont deux, et 25% n'en ont aucun (Reviron *et al.*, 2001). En Amérique du Nord

l'association est moins forte : 50% des patients PR ont un des allèles de susceptibilité (Hughes *et al.*, 2008).

Le risque et la sévérité de développer une PR ne sont pas équivalents pour tous les allèles de susceptibilité. En particulier l'allèle HLA-DRB1*04:01 prédispose au phénotype le plus sévère (Ollier *et al.*, 1984; Weyand *et al.*, 1995). Plusieurs études ont montré que les allèles HLA-DR4 sont associés à la présence de manifestations extra-articulaires (Ollier *et al.*, 1984).

L'effet dose

Il existe aussi un effet dose et synergique des allèles de susceptibilité (Wordsworth *et al.*, 1992; Jawaheer *et al.*, 1994). Par exemple en France, la probabilité de développer une PR en l'absence d'allèle de susceptibilité est de 1/230. Elle est de 1/50 pour un sujet porteur d'un allèle de susceptibilité. Elle est de 1/3 pour un sujet porteur de 2 allèles de susceptibilité (Roudier, 1995). Le risque et la sévérité les plus forts sont associés aux génotypes HLA-DRB1*04:01/04:04 et HLA-DRB1*04:01/04:01 (Wordsworth *et al.*, 1992).

Les allèles de susceptibilité de la PR sont repartis différemment selon les populations. Les allèles HLA-DR4 sont les plus fréquents en Europe du Nord et aux Etats-Unis. Les allèles HLA-DRB1*01:01 et HLA-DRB1*01:02 sont plus fréquents dans les populations méditerranéennes (Reviron *et al.*, 2001). Chez les Indiens Pima l'allèle le plus fréquent est HLA DRB1*14:02 (Ferucci *et al.*, 2005).

b) Les autres gènes de prédisposition

D'autres gènes de susceptibilité à la PR ont été identifiés (figure 10-tableau 1).

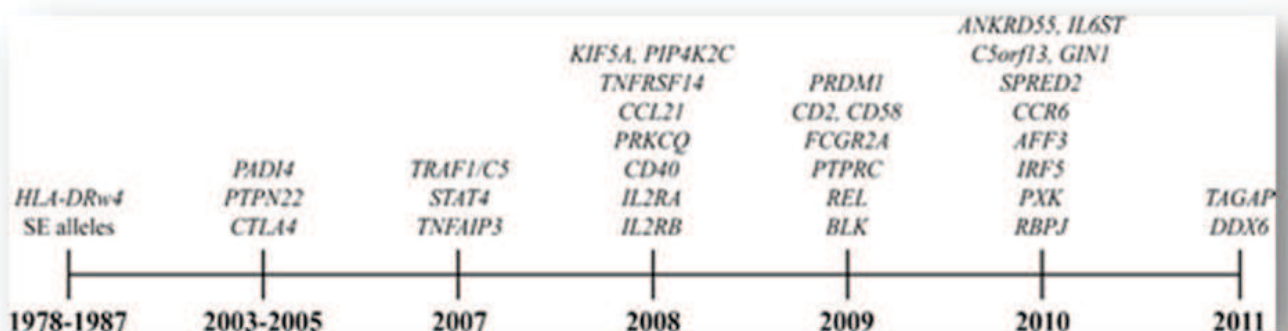


Figure 10 Gènes impliqués dans la PR (d'après Bax)

PTNP22

Le gène PTPN 22 est le deuxième facteur de susceptibilité à la PR. Il a été mis en évidence initialement dans une cohorte de patients américains, européens et asiatiques (Begovich *et al.*, 2004), puis confirmé dans une méta-analyse concernant 20 000 PR et 22 000 contrôles (Lee *et al.*, 2011).

Le gène PTPN22 localisé sur le chromosome 1p13 code pour une protéine tyrosine phosphatase (protein tyrosine phosphatase non-receptor 22). Le rôle de cette phosphatase est d'inhiber l'activation des LB et LT. La prévalence de l'allèle à risque est de 28% dans la PR versus 17% de la population générale. Ceci correspond à un OR de 1,56 et 1,75 respectivement pour les populations européennes et non-européennes (Lee *et al.*, 2011). Cependant ce polymorphisme n'est pas spécifique de la PR puisqu'il est aussi associé au diabète de type 1, à la sclérodermie et à la sclérose en plaque.

TRAF1/C5

En 2007, le locus TRAF1/C5 a été identifié par la technique d'analyse de gène candidat (Kurreeman *et al.*, 2007) et de manière concomitante par l'analyse du génome entier : soit 300 000 SNP sur 500 PR et 1800 contrôles provenant de Suède et d'Amérique du Nord. Ce locus TRAF1/C5 est lié à la PR (OR=1,28) (Chang *et al.*, 2008). TRAF1 (TNF receptor-associated factor 1) et C5 (complement component 5) sont situés sur le même locus TRAF1/C5 sur le chromosome 9q33–34. TRAF1 et TRAF2 forment un hétérodimère intervenant dans la voie de MAP-kinases. C5 est un élément de la cascade du complément.

La région 6q23

En 2007 Wendy Thomson a montré que la région intergénique 6q23 contient un SNP lié à la PR. Cette région est attenante au gène TNF-AIP3 (TNF- α induced protein 3) (Thomson *et al.*, 2007). Le gène TNFAIP3 inhibe la stimulation du facteur de transcription NF κ B par le TNF- α et par les Toll-like récepteurs. Le polymorphisme identifié n'est pas spécifique de la PR. Il est impliqué dans plusieurs maladies auto-immunes : dans la PR (OR=1.9), le syndrome de Sjögren, (OR=3.38), la maladie de Crohn (OR=2.25) et le psoriasis (OR=0.037) (Musone *et al.*, 2011).

STAT4

En 2007 Remmers a découvert que le polymorphisme de STAT4 (signal transducer and activator of transcription 4) est lié à la PR dans une population d'Amérique du Nord avec un OR de 1,32 (Remmers *et al.*, 2007b). Ces résultats ont été confirmés dans la population coréenne (Lee *et al.*, 2007). STAT4 code pour une protéine impliquée dans la transmission du signal intracellulaire.

Cependant le polymorphisme de STAT4 n'est pas spécifique de la PR puisqu'on le retrouve aussi dans plusieurs autres maladies auto-immunes comme le lupus (OR=1,5) (Remmers *et al.*, 2007a).

PAD4

En 2003, une étude sur la population japonaise a décrit un polymorphisme du gène de la peptidyl-arginine-déiminase 4 (PADI4) dans la PR. Ce polymorphisme est localisé dans l'intron 3, avec un OR à 1,97 (Suzuki *et al.*, 2003). Cependant ce résultat n'a pas été confirmé dans la population caucasienne (Burr *et al.*, 2010).

Facteur de risque génétique	Niveau de preuve	Spécificité pour la PR
Allèles HLA-DRB1	confirmé	oui
PTNP22	confirmé	non
Locus TRAF1-C5	confirmé	non
région 6q23	confirmé	non
STAT4	confirmé	non
PAD4	non confirmé	

Tableau 1 Facteurs génétiques de prédisposition à la PR (d'après Klareskog)

2. Les acteurs environnementaux

Les facteurs génétiques n'expliquent pas à eux seuls le développement de la PR. Le seul facteur environnemental identifié dans la physio-pathologie de la PR

est le tabagisme. Les infections virales et bactériennes sont des facteurs potentiels.

a) Le tabagisme

Le tabagisme augmente le risque de développer une PR

Le tabagisme est le facteur environnemental le plus clairement établi. Le premier travail sur le sujet date de 1987 (Vessey *et al.*, 1987). Une étude sur des jumeaux a montré un risque plus élevé de développer une PR chez les patients tabagiques (Silman *et al.*, 1996). Le risque relatif de développer une PR est de 2, que ce soit pour un tabagisme en cours ou sevré (Stolt, 2003).

La durée du tabagisme augmente le risque de développer une PR (Voigt *et al.*, 1994).

Le tabagisme augmente la sévérité de la PR

Le tabagisme est aussi lié à la sévérité clinique de la maladie, aux manifestations extra-articulaires, à la progression radiologique (Saag *et al.*, 1997)(Masdottir *et al.*, 2000).

Tabagisme et inflammation

Le tabagisme modifie le fonctionnement du système immunitaire. La fumée de cigarette elle-même et la nicotine diminuent l'activité phagocytaire des macrophages et altèrent donc la défense anti-microbienne. La fumée de cigarette contient beaucoup de radicaux libres donc augmente le stress oxydatif (Baka *et al.*, 2009).

Tabagisme et citrullination

Le tabagisme interviendrait dans la citrullination par l'augmentation de l'expression des PAD, enzyme responsable de cette modification. Il a été mis en évidence une augmentation de l'expression de PAD2 dans des biopsies de muqueuse bronchique de fumeurs comparées aux non-fumeurs (Makrygiannakis *et al.*, 2008).

b) Les infections

Plusieurs virus peuvent entraîner l'apparition d'une arthrite transitoire : la rubéole, le parvovirus B19, l'hépatite B et C, le virus HTLV1, et le virus du Chikungunya. L'exposition à des agents infectieux notamment le virus d'Epstein-Barr (EBV) et la bactérie porphyromonas gingivalis (*p. gingivalis*) pourrait jouer un rôle dans la PR.

EBV

Le candidat infectieux le plus sérieux est le virus d'Epstein-Barr (EBV). Le virus d'Epstein Barr est un herpès virus qui infecte 98% de la population mondiale. Il est impliqué dans la mononucléose infectieuse et dans certains lymphomes. Plusieurs arguments sont en faveur d'une implication d'EBV dans la PR (Toussirot *et al.*, 2007) :

1/ Les anticorps anti-EBV sont plus élevés chez les patients PR que chez les contrôles (Inoue *et al.*, 1991)

2/ Il y a plus de LB infectés par EBV chez les PR que chez les contrôles (Tosato *et al.*, 1984)

3/ Il y a un mauvais contrôle de l'émergence de lignées de LB par les LT chez les patients PR immunisés par EBV (Tosato *et al.*, 1981)

4/ De plus la charge en EBV dans l'ADN des cellules sanguines mononuclées circulantes est plus haute (environ 10 fois plus) chez les PR que les contrôles (Balandraud *et al.*, 2003).

5/ La réponse des LT au virus d'EBV varie en fonction de l'allèle HLA-DR chez les patients PR: la fréquence des LT spécifiques de la glycoprotéine gp110 (protéine d'EBV qui intervient dans le cycle de réplication d'EBV) est plus faible chez les PR exprimant l'allèle susceptibilité HLA-DRB1*04:04. Inversement la fréquence des LT spécifiques de la glycoprotéine gp110 est plus élevée chez les PR exprimant l'allèle protecteur HLA-DRB1*07 (Toussirot *et al.*, 1999). Ceci pourrait traduire un défaut de contrôle de l'infection à EBV par le système immunitaire des patients PR.

P.gingivalis

Plusieurs études ont montré un lien entre l'inflammation des gencives (périodontite) et la PR (de Pablo *et al.*, 2008).

La bactérie *p.gingivalis* est l'agent principal des périodontites. Hitchon a montré en 2010 que le taux d'anticorps anti-*p.gingivalis* est plus élevé chez les PR que chez les contrôles (Hitchon *et al.*, 2010).

De plus *p. gingivalis* est le seul procaryote qui a une enzyme capable de citrulliner des protéines. *P. gingivalis* pourrait être impliquée dans la génération des épitopes citrullinés reconnus par les auto-anticorps dans la PR (Rosenstein *et al.*, 2004).

c) Les facteurs liés au sexe

La PR est 3 fois plus fréquente chez la femme que chez l'homme. Il y a une influence de la grossesse sur l'apparition de la maladie. Pendant la grossesse, le risque de développer une PR diminue et il y a une augmentation des poussées après l'accouchement (Østensen *et al.*, 2004).

3. Les auto-anticorps dans la PR

Les auto-anticorps sont dirigés contre un ou plusieurs constituants de l'organisme. Les auto-anticorps dans la PR sont à la fois un outil diagnostique clé et un élément central dans la physio-pathologie de la maladie. Les auto-anticorps dans la PR sont nombreux mais ils ne sont pas tous spécifiques de la maladie.

1. L'importance des auto-anticorps dans la PR

L'importance des auto-anticorps a été établie par plusieurs travaux :

1/ Déjà en 1937 Waaler découvre les facteurs rhumatoïdes (FR) dans le sérum d'un patient atteint de PR (Waaler, 2007).

2/ Il y a une dizaine d'années, il a été montré que le transfert d'un sérum d'un modèle murin d'arthrite à une souris normale induit le développement d'une arthrite. Le modèle murin KRN/NOD est un croisement entre une souris transgénique pour un récepteur du LT et une souris NOD (Non Obese Diabetic). La souris KRN/NOD présente une arthrite spontanée proche de la PR (Kouskoff *et al.*, 1996). Le sérum d'une souris KRN/NOD transféré à une souris normale induit le développement d'une arthrite (Korganow *et al.*, 1999).

3/ L'efficacité du rituximab dans la PR suggère le rôle des auto-anticorps dans la maladie (Edwards *et al.*, 2004). En effet le rituximab est un anticorps monoclonal dirigé contre le CD20 qui est une phospho-protéine exprimée à la surface des LB depuis un stade précoce de leur maturation jusqu'au stade de plasmocyte, producteur d'anticorps.

4/ La découverte des auto-anticorps anti-protéines citrullinées (ACPA) qui sont les auto-anticorps les plus spécifiques de la PR confirme l'importance des auto-anticorps dans la PR (Girbal-Neuhauser *et al.*, 1999).

2. La PR avant les ACPA : le Facteur Rhumatoïde (FR)

a) Nature du FR

En 1937, Erik Waaler découvre dans le sérum d'un sujet atteint de PR un facteur provoquant l'agglutination des globules rouges sensibilisés par du sérum de lapin anti-sérum de mouton. Ce facteur a d'abord été appelé "facteur activateur agglutinant", puis dénommé "facteur rhumatoïde" (FR). Ces résultats de Waaler furent confirmés par Rose en 1948.

Les FR sont des immunoglobulines d'isotypes IgG, IgA et IgM dirigées contre des déterminants antigéniques situés sur les chaînes lourdes du fragment cristallisable (Fc) des IgG. Il s'agit le plus souvent d'IgM (figure 11).

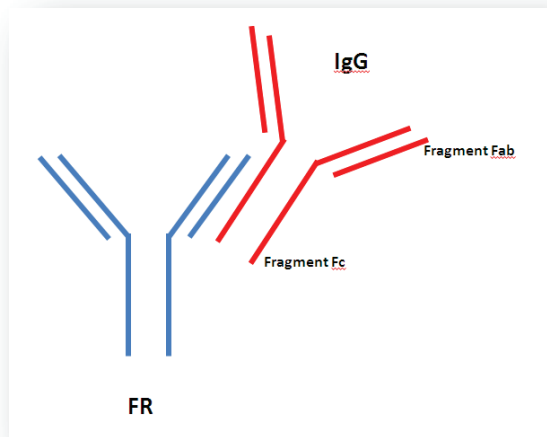


Figure 11 Schéma d'un FR complexé avec le fragment Fc d'une IgG

b) Plusieurs tests peuvent mettre en évidence le FR

1/ Le test d'agglutination de Latex utilise des particules de latex sensibilisées par des **IgG humaines** qui induisent une réaction d'agglutination dans le sérum de patients PR (Plotz *et al.*, 1956).

2/ Le test de Waaler-Rose utilise des globules rouges de mouton sensibilisés avec des **IgG de lapin** anti-IgG de mouton qui précipitent en présence de FR (Valkenburg, 1963). Des résultats contradictoires pour ces tests sont possibles : Latex positif, Waaler-Rose négatif; l'inverse est exceptionnel.

Ces tests sont moins utilisés en routine. Ils sont remplacés maintenant par 2 types de tests qui ont une bonne sensibilité et une meilleure spécificité : la

néphélométrie laser et le test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) qui permet en plus de déterminer les différents isotypes IgG, IgA, IgM.

c) Le FR dans la PR

Le FR est produit dans l'articulation par les plasmocytes situés dans les follicules lymphoïdes de la synovite rhumatoïde (Wernick *et al.*, 1985).

La plupart des patients présentant une PR ont un FR positif. Une méta-analyse portant sur 50 études montre que la sensibilité et la spécificité du FR IgM sont de 69% et 85% (Nishimura *et al.*, 2007). Le FR peut-être négatif sans écarter le diagnostic, à fortiori au début de la maladie. C'est ce qui définit une PR "séropositive" ou "séronégative".

La spécificité du FR

Le FR est peu spécifique de la PR puisqu'on peut le mettre en évidence chez les sujets sains et dans d'autres pathologies. Dans la population générale, la fréquence du FR varie entre 1,5 et 3% chez les caucasiens (Egeland *et al.*, 1983).

- chez les sujets sains, la proportion augmente avec l'âge, pouvant atteindre 10% au-delà de 80 ans (Silvestris, Goodwin, et Williams 1985). Cependant chez les sujets sains, le FR est présent à faible taux et avec une faible affinité pour les IgG.

- le FR peut être positif au cours d'infections bactériennes (Chlamydia, Lyme, Syphilis, Klebsielle), virales (hépatites A, B, C, herpès, parvovirus, CMV), et les parasitoses (toxoplasmose, paludisme, leishmaniose) (tableau 2). En général le reste de l'examen clinique et de la biologie permettent facilement de faire la part des choses mais il faut se méfier des endocardites qui peuvent se manifester par des arthralgies avec FR positif.

- Le FR peut être positif de manière non spécifique dans les hépatopathies, les affections pulmonaires et les cancers (tableau 2) (Bartfeld, 1969).

- le FR peut aussi être positif au cours d'autres rhumatismes inflammatoires que la PR dont le diagnostic différentiel est plus difficile (tableau 3) (Shmerling *et al.*, 1991).

Pathologies non rhumatismales	% de FR positif
Infection bactérienne	20
Endocardite subaiguë	48
Hépatite virale	17
Fibrose pulmonaire	32
Cirrhose	36
Cancer	22

Tableau 2 Positivité du FR dans les pathologies non rhumatismales (d'après Bartfeld)

Pathologies rhumatismales	% de FR positif
Sarcoïdose	11
Sclérodermie	20-30
Syndrome de Sjogrën	75-95
Lupus systémique	15-35
Dermatomyosite	5-10

Tableau 3 Positivité du FR dans les pathologies rhumatismales (d'après Shmerling)

Intérêt pronostique du FR

Un taux élevé de FR IgM ou la présence de FR IgA sont corrélés avec une destruction radiologique plus importante, la présence de manifestations extra-articulaires dont les nodules rhumatoïdes et un score d'activité clinique plus élevé (Nell *et al.*, 2005; Pää *et al.*, 1998).

Rôle du FR

Le rôle exact des FR n'a pas encore été démontré mais il y a plusieurs éléments en faveur du rôle pathogène du FR.

Le FR est présent dans le liquide synovial des patients PR et il est synthétisé par les plasmocytes de la synoviale (Shmerling *et al.*, 1991). Un argument renforçant le rôle du FR dans la PR est sa présence jusqu'à 19 ans avant l'apparition des symptômes (del Puente *et al.*, 1988).

Le FR est présent dans des modèles animaux d'arthrite. Par exemple dans le modèle murin d'arthrite induite par le pristane, le FR est présent et corrélé à la présence d'une synovite ou d'une vascularite (Wooley *et al.*, 1989).

Dans la PR, le FR participe à la formation des complexes immuns et active le complément ce qui induit des lésions vasculaires (Aho *et al.*, 1991).

Evolution du FR dans le temps

Le FR peut diminuer au cours du temps sous l'effet de plusieurs traitements. Une étude montre que sous methotrexate, on observe une diminution du FR IgM et IgA mais que c'est seulement la baisse du taux d'IgM qui corrèle avec l'amélioration clinique (Alarcón *et al.*, 1990). Sous anti-TNF α , le FR peut aussi diminuer, cela est corrélé avec l'efficacité thérapeutique (Bos *et al.*, 2008; Bobbio-Pallavicini *et al.*, 2004).

3. Les ACPA ont révolutionné le diagnostic de la PR

La démarche diagnostique d'une PR a été révolutionnée par la découverte d'une famille d'auto-anticorps : les auto-anticorps anti-protéines citrullinées (ACPA).

a) La citrullination

La citrullination est une réaction enzymatique réalisée par des peptidyl-arginine-déiminases (PAD). Elle consiste à transformer un résidu arginine en un résidu citrulline, plus acide (figure 12). Cette modification qui entraîne des changements dans la charge, le poids moléculaire peut jouer sur la conformation tri-dimensionnelle et l'immunogénicité des protéines.

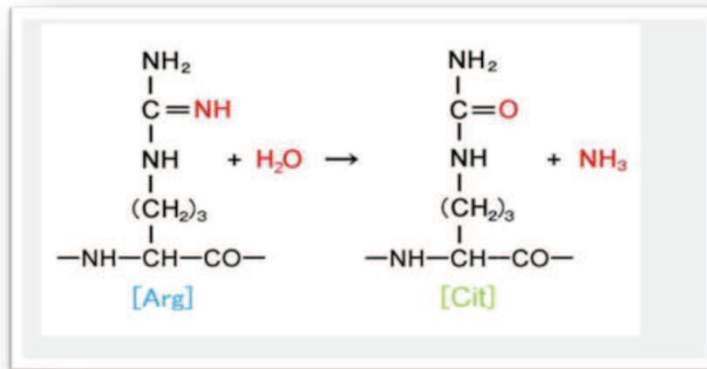


Figure 12 Citrullination : hydrolysatation d'un résidu arginine en citrulline avec libération d'une molécule d'ammonium (d'après Yamada)

Les PAD sont impliquées dans de nombreux mécanismes physiologiques et pathologiques (Méchin et al. 2011).

Historique

La citrullination a été mise en évidence pour la première fois en 1977, au niveau du follicule pileux (Rogers *et al.*, 1977). En 1991 plusieurs types de PAD ont pu être purifiés à partir de tissus murins, dont 3 dans l'épiderme (Terakawa *et al.*, 1991).

A ce jour les données génomiques ont permis de révéler l'existence cinq gènes (PAD1 à 4 et 6) codant respectivement pour les PAD1, 2, 3, 4 et 6, regroupés en un seul locus (chromosome 1p35-36 chez l'homme) et conservés au cours de l'évolution (Chavanas *et al.*, 2004).

Les isotypes des PAD

Les PAD humaines sont exprimées dans la plupart des organes, bien que chaque isotype présente un profil d'expression particulier (Méchin *et al.*, 2011).

PAD4 (initialement nommée PAD5) est impliquée dans plusieurs mécanismes physiologiques et physio-pathologiques (tableau 4). C'est la seule PAD à avoir une localisation intranucléaire. Elle est largement exprimée dans les cellules hématopoïétiques et on la retrouve dans la plupart des tissus sauf le muscle squelettique, la peau, le colon, le cerveau.

PAD1 et 3 sont présentes dans l'épiderme, mais aussi le colon, le pancréas, le poumon, les testicules, le thymus et le placenta.

PAD2 est exprimée dans tous les tissus.

PAD6, d'expression restreinte principalement aux gonades, est nécessaire dès les premiers stades du développement embryonnaire.

Conformation de la PAD4

La structure cristallographique de la PAD4 est bien connue (Arita *et al.*, 2004). Nous nous sommes intéressés à PAD4 car dans notre laboratoire, nous avons montré à l'aide de puces à protéines que PAD4 est la cible d'auto-anticorps dans la PR. (Auger *et al.*, 2009).

PAD4 est une protéine de 663 aa. Le domaine N-terminal est divisé en 2 sous-domaines "immunoglobulin-like". Le domaine C-terminal comprend le site actif qui fixe le substrat. Il existe 5 sites de fixation au calcium, dont 3 dans le domaine N-terminal et 2 dans le domaine C-terminal. La fixation du calcium dans la région C-terminale joue un rôle conformationnel dans la capacité de fixer le substrat (Nachat *et al.*, 2005b). L'analyse cristallographique suggère que la PAD4 est dimérisée (Arita *et al.*, 2004).

Rôles physiologiques des PAD

Les PAD sont exprimées dans la plupart des tissus, suggérant une implication dans de nombreuses fonctions biologiques. Mais le rôle de ces enzymes n'est pas complètement connu. PAD1 et 3 sont impliquées dans la citrullination de la filaggrine *in vitro* (Nachat *et al.*, 2005b). Les filaments intermédiaires de kératine sont aussi citrullinés de manière physiologique dans l'épiderme humain (Senshu *et al.*, 1996). La tricho-hyaline qui est une protéine du follicule pileux est également la cible de la PAD3 (Nachat *et al.*, 2005a). La citrullination intervient probablement dans les interactions entre les protéines.

Les PAD interviennent aussi dans l'apoptose. La surexpression de PAD4 semble impliquée dans des modifications du cycle cellulaire (arrêt du cycle cellulaire) par l'intermédiaire de la citrullination des histones (Nakashima *et al.*, 2002).

Les PAD dans la PR

Les ACPA sont les auto-anticorps les plus spécifiques de la PR. Ils sont très certainement des acteurs-clés dans l'auto-entretien de l'inflammation, cause de la destruction articulaire. La cible majeure des ACPA dans le tissu synovial des patients atteints de PR est la fibrine citrullinée (chaînes α et β) (Masson-Bessière *et al.*, 2001).

De plus, dans le tissu synovial des patients atteints de PR, les PAD2 et 4 ont été détectées à proximité des dépôts de fibrine citrullinée ; leur expression est corrélée avec l'inflammation (Foulquier *et al.*, 2007).

En 2003, un lien génétique direct entre certains haplotypes de PADI4 et la susceptibilité à la PR a été observé dans des populations asiatiques mais ce lien n'a pas été confirmé dans les populations caucasiennes (chap2.1 b).

Les PAD dans d'autres pathologies

Les PAD sont impliquées dans la physio-pathologie de plusieurs maladies dont la sclérose en plaque, la démence d'Alzheimer, les adénocarcinomes (tableau 4).

Pathologies	Protéine citrullinée	PAD impliquée
Sclérose en plaque	Protéine basique de la myéline	PAD2
Maladie d'Alzheimer	Protéine acide fibrillaire gliale	?
PR	Chaîne α et β de la fibrine	PAD2 et/ou PAD4
Cancer	?	PAD4

Tableau 4 Implication de la citrullination dans plusieurs situations pathologiques (d'après Méchin)

b) Les cibles des ACPA

Les auto-anticorps anti-périnucléaires et les auto-anticorps anti-kératine

L'histoire des ACPA débute en 1964 par la découverte de facteurs anti-périnucléaires (APN) dans le sérum de patients PR, qui sont dirigés contre des

granules cytoplasmiques de cellules de la muqueuse jugale (figure 13) (Nienhuis *et al.*, 1964).

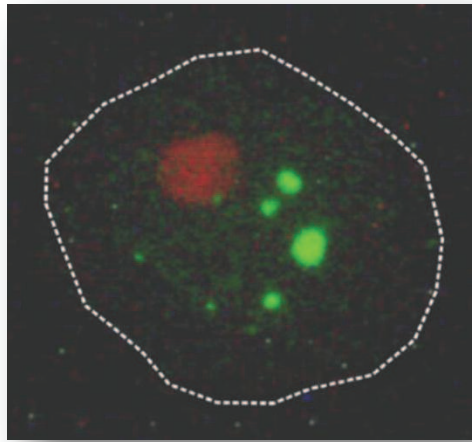


Figure 13 APN en immunofluorescence sur cellules buccales (d'après van Venrooij)

En 1979, Young *et al* décrivent d'autres auto-anticorps présents dans le sérum de patients PR par une technique d'immuno-fluorescence indirecte sur des coupes d'œsophage de rat (figure 14). Ces auto-anticorps de sous-type IgG marquent le stratum cornéum de l'épithélium kératinisé et sont donc d'abord appelés "anti-kératine" (AKA) (Young *et al.*, 1979).

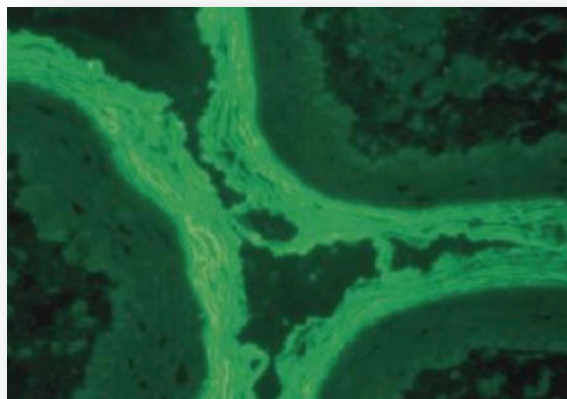


Figure 14 AKA par IFI sur lames d'œsophage de rat (d'après Galati)

Les APN et les AKA sont spécifiques de la PR. Ils sont présents chez 52% et 55% des PR avec une spécificité de 99% (Vincent *et al.*, 1999).

En 1993, des études immuno-histochimiques ont montré que les APN et AKA reconnaissent le même antigène, la filaggrine (Simon *et al.*, 1993). La filaggrine est une protéine qui joue un rôle dans l'assemblage des filaments intermédiaires des kératinocytes. On parle d'auto-anticorps anti-filaggrine (AFA).

Puis en 1998 il a été montré que la filaggrine reconnue par ces auto-anticorps est citrullinée (Girbal-Neuhauser *et al.*, 1999).

De plus les AFA sont produits localement dans la synoviale rhumatoïde (Masson-Bessière *et al.*, 2000).

Cependant la filaggrine n'est pas exprimée dans les tissus articulaires (Masson-Bessière *et al.*, 2001). On se demande donc quelles sont les protéines citrullinées de l'articulation qui sont les cibles des ACPA ?

Les auto-anticorps anti-fibrine citrullinée

La fibrine est présente dans les articulations. Il a été montré que la cible majeure des ACPA dans le tissu synovial des patients atteints de PR est la fibrine citrullinée (chaînes α et β) (Masson-Bessière *et al.*, 2001). La fibrine est donc un auto-antigène naturel de la PR. Deux épitopes au sein de la fibrine ont été précisés par la suite. Il s'agit sur la chaîne B de la région 60-74 (comprenant 3 citrullines en position 60, 72 et 74), et sur la chaîne α la région 36-50 (comprenant 2 citrullines en 38 et 42). La combinaison de ces épitopes identifie 100% des patients PR qui ont des ACPA (Sebbag *et al.*, 2006).

Les auto-anticorps anti-vimentine citrullinée ou anti-Sa

Les auto-anticorps anti-Sa ont été décrits dans la PR en 1994 pour un patient dont les initiales étaient "Sa". Ces anticorps reconnaissent une protéine de 50 kDa sur des extraits de placenta, rate, et tissu synovial humains (Després *et al.*, 1994). Il a été montré ensuite que les auto-anticorps anti-Sa reconnaissent la vimentine citrullinée (Vossenaar *et al.*, 2004). La vimentine est une protéine des filaments intermédiaires.

c) Les tests de détection des anticorps anti-peptides citrullinés

Différents tests de détection de ces anticorps ont été mis au point. L'objectif est de définir un test simple, reproductible, avec une sensibilité (taux de patients PR positifs) et une spécificité (taux de patients non PR négatifs) élevées.

- Sensibilité et spécificité des tests diagnostiques (tableau 5)

Les anticorps anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP)

Pour détecter en routine les ACPA, des tests ELISA ont été mis au point. Dans le premier test, des peptides citrullinés ont été synthétisés à partir de la filaggrine citrullinée. De façon à optimiser l'exposition des résidus citrullinés et/ou pour introduire des contraintes structurales pouvant améliorer leur antigénicité, des variants cycliques de ces peptides ont été développés par substitution de 2 résidus sérine par 2 résidus cystéine (Schellekens *et al.*, 2000). Des tests anti-CCP dits de 2ème génération (anti-CCP2) sont disponibles depuis 2002, mais leur composition antigénique précise n'est pas connue.

Différentes études dans la PR montrent que la sensibilité des anticorps anti-CCP est de 68% et que la spécificité est de 98% pour les tests de 2ème génération (Avouac, 2005). Le test anti-CCP2 reste la référence. Des tests de 3ème génération ont été développés, mais semblent être sans supériorité diagnostique par rapport au test anti-CCP2 (Lutteri *et al.*, 2007).

Pour doser les ACPA, le test anti-CCP2 est le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité (tableau 5).

Les autres tests diagnostiques

La détection des APN n'est pas réalisée en pratique du fait de la difficulté technique majeure d'obtenir de manière standardisée des cellules de la muqueuse buccale.

La détection des AKA par immuno-fluorescence indirecte (IFI) a été remplacée par la détection des anti-CCP par ELISA, plus sensible et aussi spécifique.

Les auto-anticorps anti-fibrinogène citrulliné sont aussi détectables en ELISA (Vincent *et al.*, 2005).

Les premiers tests ELISA utilisant de la vimentine citrullinée avaient une sensibilité faible dans la PR, de l'ordre de 40%, mais des tests plus récents montrent une sensibilité de 70% (Dejaco *et al.*, 2006).

	FR IgM	AKA	Anticorps anti-fibrinogène citrulliné	Anticorps anti-vimentine citrullinée	Anti-CCP2
Sensibilité (%)	69	55	76	70	68
Spécificité (%)	85	95	99	91	98

Tableau 5 Sensibilité et spécificité des différents tests anti-peptides ou protéines citrullinées comparés au FR

- Valeur des anticorps anti-CCP dans le diagnostic différentiel de la PR

La spécificité des anticorps anti-CCP dans la PR est très bonne, contrairement au FR, ce qui en fait un outil diagnostique très précieux. Cependant ils peuvent être présents dans d'autres situations, notamment des rhumatismes inflammatoires.

La méta-analyse de 2005 concernant 8200 PR et 8400 contrôles montre que 0,4% des sujets sains seulement ont des anticorps anti-CCP, vs 1 à 3% pour le FR. Les rhumatismes inflammatoires dans lesquels les anticorps anti-CCP sont les plus fréquents sont: le lupus, le syndrome de Sjögren, les spondylarthropathies, la sclérodermie systémique (figure 15) (Avouac, 2005).

Dans la sclérodermie et le lupus systémique, les anticorps anti-CCP sont plus élevés s'il y a des atteintes articulaires (Ueda-Hayakawa *et al.*, 2010; Qing *et al.*, 2009)(Ueda-Hayakawa *et al.* 2010).

Pathologies	Prévalence
Lupus érythémateux systémique	9-13 %
Sclérodermie systémique	15 %
Syndrome CREST	29 %
Syndrome de Gougerot-Sjögren	3-8 %
Spondylarthropathie	9 %
Hépatites auto-immunes de type I	9 %
Rhumatisme psoriasique	6-8 %
Cirrhose biliaire primitive	4-6 %
Hépatite C	1 %

Figure 15 Prévalences des anticorps anti-CCP dans les autres rhumatismes (d'après Fabien)

L'intérêt des anticorps anti-CCP dans le diagnostic différentiel dépend aussi de la valeur des anti-CCP. Lorsque les anti-CCP sont positifs dans d'autres rhumatismes, les taux sont plus faibles (Kudo-Tanaka *et al.*, 2007).

Anticorps anti-CCP dans les PR débutantes

Si l'on s'intéresse aux PR récentes de moins de 6 mois d'évolution, la sensibilité des ELISA anti-CCP varie entre 50 et 58 % (Goldbach-Mansky *et al.*, 2000).

- Combinaison des tests FR et anti-CCP

Le dosage des FR et des anticorps anti-CCP est complémentaire. Alors que 20% des PR sans FR ont des anticorps anti-CCP (Vander Cruyssen *et al.*, 2006), 45% des PR qui n'ont pas d'anticorps anti-CCP ont des FR (Mackie *et al.*, 2011) (Terao *et al.*, 2011a).

En pratique il existe 4 situations (tableau 6) :

2/3	Anti-CCP+ /FR+	Anti-CCP+/FR-
1/3	Anti-CCP-/FR+	Anti-CCP-/FR-

Tableau 6 Combinaison des FR et anticorps anti-CCP

La combinaison du FR et des anti-CCP2 identifie les PR à haut risque d'évolution radiologique (Taylor *et al.*, 2011).

- Valeur pronostique des anticorps anti-CCP

Corrélation avec l'activité clinique de la maladie

Les anticorps anti-CCP sont associés aux formes sévères et actives de la PR (Bas *et al.*, 2000; De Rycke *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2003), ce qui est aussi vrai pour les FR. Leur présence a été corrélée à la sévérité clinique (raideur matinale des articulations, index fonctionnel, érosions articulaires, déformations des mains, présence de nodules sous-cutanés) et à l'inflammation (VS, CRP, haptoglobine) (Papadopoulos *et al.*, 2008).

Corrélation avec la sévérité radiologique

La présence d'anti-CCP est un marqueur pronostique du développement d'une PR érosive (Meyer *et al.*, 2003) . Une étude a comparé la sévérité des lésions radiologiques chez les patients PR selon leur statut ACPA et FR ; il a été montré que la valeur pronostique des anticorps dans la PR repose sur les ACPA. En effet la progression radiologique était forte dans les groupes de patients ACPA+/FR+ et ACPA+/FR- et moindre dans les groupes ACPA-/FR+ et ACPA-/FR+ (van der Linden *et al.*, 2009).

Corrélation avec la résistance aux traitements

Les patients qui ont des anticorps anti-CCP ont plus de risque de développer une résistance au methotrexate et d'avoir besoin d'un traitement par anti-TNF α (Mori *et al.*, 2010).

- Evolution dans le temps

Il y a très peu de données disponibles sur l'évolution des taux d'anti-CCP pour une PR non traitée.

Dans un travail réalisé sur plus de 250 PR débutantes traitées, le taux d'anti-CCP s'est négativé pour 7 patients, et positif pour 10 patients en 30 mois de suivi. De plus, un taux bas d'anti-CCP est lié à un taux de négativation plus fort. La disparition d'un anticorps (FR ou anti-CCP) est liée à un meilleur pronostic clinique (Guzian *et al.*, 2010).

Une étude sur les isotypes des anticorps anti-CCP (IgA, IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) montre que la plupart des patients gardent des anticorps positifs au bout d'un an. Au bout de 7 ans de suivi, la proportion de patients PR positifs pour IgA et IgG3 diminue, sans changement pour les autres isotypes alors qu'on aurait pu attendre une diminution des IgM (Verpoort *et al.*, 2006).

Le taux des anticorps anti-CCP peut être influencé par les traitements de la PR. Sous rituximab qui est un inhibiteur des LB (anti-CD20), on observe une diminution du taux des anti-CCP au bout 6 mois de traitement. Ils reviennent ensuite au taux de base (Bobbio-Pallavicini *et al.*, 2004).

Sous anti-TNF α , les taux d'anticorps anti-CCP semblent diminuer mais cette observation n'est pas consensuelle. En effet, pour 2 traitements anti-TNF α (etanercept et adalimumab), il a été observé que le taux d'anti-CCP diminue au cours du traitement (Cuchacovich *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2006). Cependant une étude portant sur l'infliximab, un autre anti-TNF α , montre que le traitement fait baisser le taux de FR mais pas des anticorps anti-CCP (De Rycke *et al.*, 2005).

L'évolution des anticorps anti-CCP sous traitement montre que la corrélation entre les anticorps et la clinique est trop faible pour que le suivi des anti-CCP ait un intérêt dans la pratique (Landmann *et al.*, 2010).

4. Les auto-anticorps dirigés contre des protéines non citrullinées

De nombreux auto-antigènes non citrullinés ont été identifiés dans la PR. Ils ne sont pas tous spécifiques de la maladie.

a) Les auto-anticorps anti-collagène de type II

Les auto-anticorps anti-collagène de type II ont été mis en évidence dans le sérum et le liquide synovial de patients PR (Steffen C, 1969; Clague *et al.*, 1984).

Il a plusieurs arguments plaidant pour un rôle des auto-anticorps anti-collagène de type II dans la PR. La présence des anticorps dans le liquide synovial de PR est associée au génotype HLA-DR4 (Rönnelid *et al.*, 1994). De plus chez la souris il est possible de provoquer des arthrites en leur injectant des anticorps humains purifiés anti-collagène II (Kerwar *et al.*, 1988).

La sensibilité de ces auto-anticorps dans la PR est variable selon les études de 25 à 42%. Ces auto-anticorps ne sont pas spécifiques de la PR puisqu'on peut les trouver dans 15% des lupus (Cook *et al.*, 1994), et 30% des spondylarthrites (Clague *et al.*, 1980). Ils ne présentent pas d'intérêt diagnostique en pratique.

La découverte d'auto-anticorps anti-collagène de type II a donc suscité beaucoup d'espoir dans la compréhension de physio-pathologie de la PR. Mais leur présence est sûrement une conséquence de la destruction articulaire.

b) Les auto-anticorps anti-nucléaires (ACAN)

Les ACAN sont recherchés dans la PR dans le cadre du diagnostic différentiel avec le lupus. Cependant ils peuvent être présents dans des PR certaines. Dix à trente pourcent des PR ont des ACAN, généralement à taux faibles. Il n'y a pas de corrélation entre la présence d'ACAN et la gravité des signes articulaires (Steven *et al.*, 1984).

Les ACAN sont plus fréquents lorsque la PR se déclenche à un plus jeune âge que chez le sujet âgé (Turkcapar *et al.*, 2006).

Les anticorps anti-ADN natifs, qui sont plus spécifiques du lupus que les ACAN, sont retrouvés dans moins de 5% des PR. Dans ce cas on parle de PR-lupus (Nilsson *et al.*, 1980).

Les ACAN et anti-ADN peuvent aussi apparaître dans la PR au cours des traitements anti-TNF α . La présence de ces anticorps n'est pas liée aux manifestations cliniques de lupus (Cavazzana *et al.*, 2007).

Les anticorps anti-antigènes nucléaires solubles (anti-RNP, anti-Sm, anti-SSA ou anti-SSB) sont rares dans la PR (5%). Dans ce cas on parle de syndromes de chevauchement (association d'une PR et d'un syndrome de Sjögren) (Cavazzana *et al.*, 2007).

c) Les auto-anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires (ANCA)

Les ANCA peuvent être dirigés contre la protéinase 3 (PR3) ou la myélo-péroxydase (MPO). Ces anticorps sont associés aux vascularites en particulier dans le syndrome de Churg et Strauss, et à la maladie de Wegener, et la micro-polyangéite. Dans la PR on peut observer dans 10% des cas des ANCA de type MPO, mais sans symptôme de vascularite (Tur *et al.*, 2004).

d) Les auto-anticorps anti-RA-33

Un antigène de 33 kDa spécifiquement reconnu par des sérums PR a été mis en évidence par immuno-transfert à partir d'extraits nucléaires solubles de cellules HeLa (Hassfeld *et al.*, 1993). Les auto-anticorps anti-RA 33 ou anti-A2 sont dirigés contre la protéine A2 du complexe hnRNP (heterogen nuclear riboprotein) (Steiner *et al.*, 1992). La spécificité supérieure à 99% énoncée lors de la mise en évidence des auto-anticorps anti-RA33 a rapidement été contredite. Ces auto-anticorps sont présents chez 23 à 30% des patients atteints de PR mais sont aussi détectés chez 30% des patients atteints de lupus érythémateux systémiques et 40% des patients atteints d'un syndrome de Sharp. Les auto-anticorps anti-RA 33 ne sont donc pas spécifiques de la PR. De plus, ils ne sont corrélés ni avec les FR, ni avec les anti-CCP, ni avec l'activité de la maladie (Meyer *et al.*, 2003; Nell *et al.*, 2005).

e) Les auto-anticorps anti-ferritine

La ferritine est une protéine intervenant dans l'absorption et le stockage du fer. Des auto-anticorps anti-ferritine ont été découverts dans la PR. Ils sont détectés chez 16 % des patients avec une PR établie, 19 % des patients avec une PR précoce. Ils sont rares dans le lupus, l'arthrose et chez les sujets sains (<1%). Le titre de ces auto-anticorps est associé à la sévérité des lésions

articulaires (Mewar *et al.*, 2005). Ces résultats n'ont pas été confirmés par d'autres équipes.

f) Les auto-anticorps qui interfèrent avec les voies de co-stimulation

Les voies de co-stimulation entre les cellules présentatrices de l'antigène et les lymphocytes font intervenir différents systèmes ligand-récepteurs. B7-H1 est un des partenaires des voies de co-stimulation. Des auto-anticorps anti-B7-H1 ont été décrits chez 29% des patients atteints de PR versus 4% des sujets sains. In vitro les auto-anticorps anti-B7-H1 semblent perturber le signal de co-stimulation entraînant une réponse aberrante de ces lymphocytes T (Dong *et al.*, 2003). Cependant ces résultats restent à valider par d'autres équipes.

g) Les auto-anticorps anti-glucose-6-phosphate isomérase (GPI)

La glucose-6-phosphate isomérase (GPI) est une enzyme ubiquitaire qui intervient dans la glycogénèse. Les auto-anticorps anti-GPI ont été identifiés chez la souris KRN/NOD qui présente une arthrite spontanée proche de la PR (Matsumoto *et al.*, 1999).

La découverte d'auto-anticorps dirigés contre GPI dans le sérum et le liquide synovial de PR a donc suscité beaucoup d'intérêt (Schaller *et al.*, 2001). Dans cette étude, les auto-anticorps anti-GPI ont une valeur diagnostique intéressante, avec une sensibilité de 64% et une spécificité de 98%. Cependant ces résultats n'ont pas été confirmés. Un travail portant sur le suivi d'arthrites indifférenciées montre que les anticorps anti-GPI ne sont pas utiles pour prédire l'évolution vers une PR. Ils sont plus souvent rencontrés dans la PR que chez les sujets sains (45% vs 2%), mais ils sont aussi détectés dans 47% des lupus érythémateux systémiques, 55% des polymyosites, 66% des maladies de Still et 57% des sclérodermies systémiques. Ils ne sont pas liés à un mauvais pronostic clinique ou radiologique (Jouen *et al.*, 2004).

h) Les auto-anticorps anti-calpastatine

La calpastatine est un inhibiteur naturel des calpaïnes qui sont des cystine-protéases impliquées dans l'inflammation (Ménard *et al.*, 1996). Les auto-anticorps anti-calpastatine qui ont été mis en évidence en 1995, reconnaissent

la partie C-terminale de l'enzyme, impliquée dans sa fonction inhibitrice (Mimori *et al.*, 1995).

Les auto-anticorps anti-calpastatine ont été identifiés dans la PR par plusieurs équipes. Cependant leur spécificité dans la PR reste controversée. La calpastatine contient un domaine N-terminal et 4 domaines inhibiteurs de la calpaïne (1, 2, 3 et 4). Des auto-anticorps dirigés contre l'extrémité N-terminale et le domaine 1 sont retrouvés chez les sujets sains alors que les autres auto-anticorps dirigés contre le domaine 4 sont rencontrés dans différents rhumatismes inflammatoires (dans la PR et dans le lupus) (Saulot *et al.*, 2002).

L'importance de ces auto-anticorps dans la PR est renforcée par l'association entre les auto-anticorps anti-calpastatine de la synoviale et l'allèle de susceptibilité HLA-DR*04:04 (Auger *et al.*, 2007a).

i) Les auto-anticorps anti-peptidyl arginine déiminase 4 (PAD4)

Les auto-anticorps anti-PAD4 ont été décrits dans la PR en 2005 (Takizawa *et al.*, 2005). La PAD4 dans la PR n'est donc pas seulement responsable de la réaction de citrullination, elle est elle-même la cible d'auto-anticorps. Les auto-anticorps anti-PAD4 sont spécifiques de la PR (Zhao *et al.*, 2008; Halvorsen *et al.*, 2008; Auger *et al.*, 2007b). Environ 30% des PR ont de auto-anticorps anti-PAD4 vs 2% des contrôles.

La prévalence des auto-anticorps anti-PAD4 dans la PR n'est pas très élevée (35-45%) ce qui limite leur utilité dans le diagnostic de la maladie (Zhao *et al.*, 2008)(I Auger et al. 2009). Mais ils ont une valeur pronostique: ils sont associés à une sévérité clinique et radiologique plus importante dans la PR (Halvorsen *et al.*, 2008).

D'un point de vue fonctionnel les auto-anticorps anti-PAD4 jouent un rôle sur l'enzyme qu'ils reconnaissent. Ils inhibent la citrullination ce qui pourrait générer des épitopes citrullinés particuliers reconnus par les ACPA (Auger *et al.*, 2010).

j) Les auto-anticorps anti-B-Raf

A l'aide de puces à protéines, notre laboratoire a identifié B-Raf (v raf murine sarcoma viral oncogen homologue B1) comme un nouvel auto-antigène dans la PR. Les auto-anticorps anti-B-Raf sont positifs chez 35% des PR vs 5% des

contrôles. Ces anticorps sont spécifiques de la PR (Auger *et al.*, 2009). Ils identifient 30% des PR qui n'ont pas d'anticorps anti-CCP.

- Le gène BRAF

B-Raf (v raf murin sarcoma viral oncogen human homologue 1) est une sérine-thréonine kinase. L'oncogène BRAF a été initialement identifié dans un rétrovirus capable d'infecter des cellules embryonnaires de rétine de poulet (Marx *et al.*, 1988) L'orthologue humain a été simultanément mis en évidence dans des cellules infectées par le sarcome d'Ewing (Ikawa *et al.*, 1988). Le gène codant pour les B-Raf est localisé sur le chromosome 7.

- La structure de B-Raf

Chez l'homme il existe 3 protéines fonctionnelles : A-Raf, B-Raf et C-Raf. B-Raf est la plus étudiée car elle est impliquée en cancérologie chez l'homme. Les 3 protéines sont très conservées dans les domaines CR1, CR2 et CR3 (Bonner *et al.*, 1986).

B-Raf est constituée de 766 acides aminés dont:

-une partie N-terminale, régulatrice, comprenant les domaines CR1 et CR2. Le domaine CR1 contient le site de fixation à Ras (RBD) et un domaine riche en cystéine (CRD).

- le domaine catalytique à l'extrémité C-terminale comprenant le domaine CR3. Le domaine CR3 contient un motif riche en glycine (la boucle G), et le segment activateur (dans l'exon 15) (Magnuson *et al.*, 1994) (Figure 16).

Les auto-anticorps anti-B-Raf que nous avons mis en évidence reconnaissent le domaine catalytique de B-Raf.

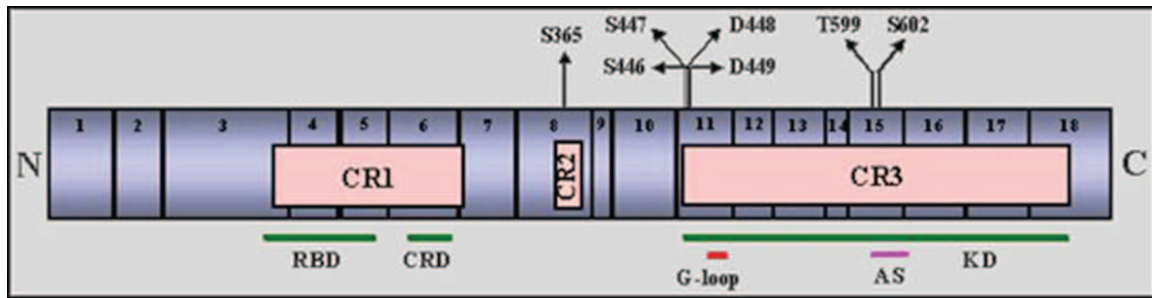


Figure 16 Structure de B-Raf Le domaine CR1 contient le site de fixation à Ras (RBD), un domaine riche en cystéine (CRD). Le domaine CR3 contient le domaine catalytique. Il comprend un motif riche en glycine (G loop), et le segment activateur (AS) dans l'exon 15 (d'après Wan)

- La fonction de B-Raf

B-Raf est une sérine-thréonine kinase impliquée dans la voie des MAP-kinases qui intervient dans l'inflammation (figure 17) (Thalhamer *et al.*, 2008).

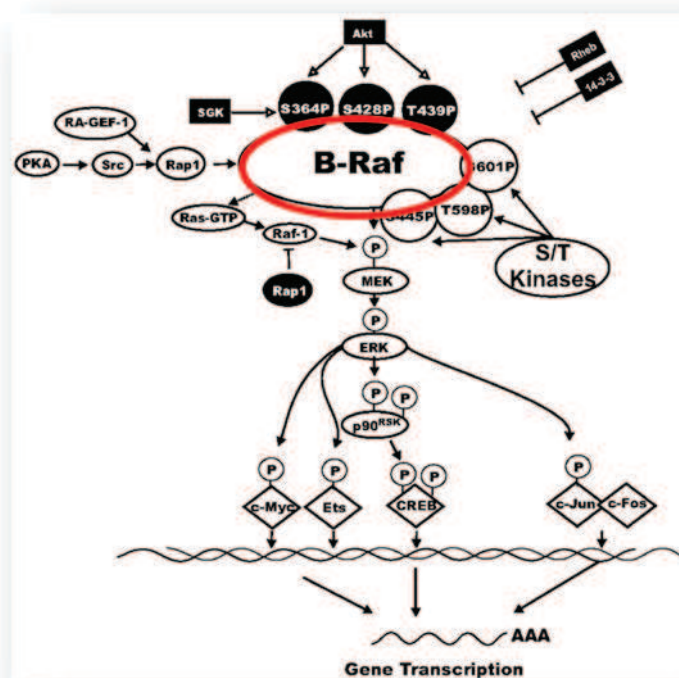


Figure 17 Situation de B-Raf dans la cascade de la MAP-kinase ERK

Ras fixant du GTP devient actif, c'est-à-dire phosphorylé et active B-Raf. B-Raf à son tour active MEK (MAP mitogen extra-cellular regulated kinase) en la phosphorylant puis ERK (extra-cellular regulated kinase) dans le cytoplasme. ERK activé est transloqué dans le noyau pour phosphoryler et réguler l'activité

de nombreuses protéines cytosoliques et nucléaires (Roberts, 1992). Parmi les gènes activés par cette voie il y a :

- le VEGF (rôle dans l'angiogénèse), la β 3-intégrine (rôle dans l'adhésion cellulaire)
- c-myc (proto-oncogène)
- des gènes impliqués dans l'apoptose et la prolifération cellulaire (mdm2 et la cycline) (Crews *et al.*, 1993; Ries *et al.*, 2000). Une faible activité de B-Raf entraîne une forte prolifération cellulaire, alors qu'une forte activité entraîne l'arrêt du cycle cellulaire (Sewing *et al.*, 1997).
- des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6, et TNF- α pouvant entraîner les lésions inflammatoires et destructrices dans l'articulation (Thalhamer *et al.*, 2008).

Dans la cellule au repos, B-Raf est maintenue dans une conformation inactive par l'auto-inhibition de son domaine N-terminal. Le rôle de l'interaction entre les domaines N et C-terminaux serait de maintenir B-Raf dans une conformation fermée qui l'empêche de se lier à d'autres molécules de B-Raf et en conséquence d'être phosphorylée (Tran *et al.*, 2005).

Les 3 protéines Raf humaines ont des mécanismes de régulation différents. En particulier B-Raf a besoin d'un niveau de phosphorylation moins important que A-Raf et C-Raf pour être activée, ce qui explique probablement sa plus forte activité de base et son implication en pathologie (Mason *et al.*, 1999).

- BRAF en cancérologie

Mutations de BRAF dans les cancers

Environ 30 mutations associées à des cancers humains ont été identifiées, le plus souvent dans le domaine catalytique de B-Raf, proche du domaine DFG (593-599) et dans la boucle G riche en glycine (Davies *et al.*, 2002).

La substitution V600E (exon 15) est la mutation de BRAF la plus fréquente dans les cancers (80%). Elle confère à B-Raf une très forte augmentation d'activité enzymatique (Calipel *et al.*, 2003). Cette mutation représente 40% à 50% des mutations dans le cancer de la thyroïde et le mélanome (Ciampi *et al.*, 2005; Wan *et al.*, 2004). La mutation V600R est moins fréquente mais est également très activatrice (Wan *et al.*, 2004) La mutation V600E a également été mise en évidence dans la leucémie à tricho-leucocytes (dans 100% des cas) (Tiacci *et al.*, 2011).

La 2^{ème} région la plus concernée par les mutations est l'exon 11 dans la boucle G (11% des mutations) (Davies *et al.*, 2002).

Parmi les mutations impliquées dans les cancers, les mutations de BRAF représentent 15% des cas. Elles concernent de nombreux cancers, en particulier présent dans 60% des mélanomes, dans le cancer ovarien, le cancer colo-rectal, l'adéno-carcinome pulmonaire, le cancer du foie, du sein, les sarcomes, les gliomes (Davies *et al.*, 2002) et le cancer papillaire de la thyroïde (Hmitou *et al.*, 2007).

B-Raf est impliquée dans la cascade de la mélanogénèse, ce qui expliquerait la fréquence des mutations de BRAF dans le mélanome.

Les auto-anticorps anti-B-Raf dans le mélanome

Les auto-anticorps anti-B-Raf reconnaissant B-Raf et B-Raf V600E ont été détectés chez 9% des patients présentant un mélanome malin et 2,5% des contrôles, sans corrélation avec l'état clinique du patient (Fensterle *et al.*, 2004).

Inhibition de B-Raf : un espoir dans le traitement du mélanome

Le mélanome est le 5ème cancer chez l'homme et le 7ème chez la femme. Dans les stades métastatiques le taux de décès dans l'année est de 40%. Le vemurafemib est un inhibiteur préférentiel de la forme activée de B-Raf associée à la mutation V600E (Tsai *et al.*, 2008). Il agit en se fixant à B-Raf muté. Le vemurafenib est en cours d'évaluation dans le mélanome métastatique. L'essai de phase III montre à 6 mois une diminution du risque de décès de 63% et une diminution de la progression de 74% (Amaria *et al.*, 2011).

Il existe donc de très nombreux auto-anticorps connus dans la PR. Certains auto-anticorps sont dirigés contre des anticorps (FR), d'autres contre des enzymes (calpastatine, GPI, PAD4, B-Raf), d'autres contre des protéines constitutives de l'articulation (collagène de type II). Les plus spécifiques sont les ACPA. Ils ont également une valeur pronostique et sont les plus utilisés dans le diagnostic de PR en pratique. Le rôle fonctionnel de plusieurs auto-anticorps est probable (FR, ACPA, anti-PAD4, anti-B-Raf). Aucun anticorps n'a une sensibilité de 100% dans la PR, d'où l'importance de définir de nouveaux auto-anticorps.

5. Les stratégies dans la recherche de nouveaux auto-anticorps dans la PR

La recherche de nouveaux marqueurs biologiques a plusieurs objectifs :

- 1/ Faire le diagnostic d'une PR lorsqu'il n'y a pas les marqueurs habituels : FR ou ACPA
- 2/ Reconnaître les PR de pronostic plus sévère afin d'adapter les traitements, et identifier des marqueurs prédictifs de la réponse aux traitements
- 3/ Emettre des hypothèses sur le déclenchement de la PR

Plusieurs approches sont possibles dans la recherche de nouveaux auto-anticorps.

a) Gel bi-dimensionnel et séquençage

Les protéines extraites de la membrane synoviale de PR sont séparées par migration en fonction de leur point iso-électrique et de leur poids moléculaire puis révélées grâce au sérum des patients PR. Les protéines reconnues sont ensuite séquencées.

Il s'agit de la technique la plus ancienne. L'extraction de l'auto-antigène directement à partir du tissu malade permet de prendre en compte l'ensemble des modifications post-traductionnelles de l'antigène. Le problème principal est le manque de sensibilité de la technique.

Au laboratoire, l'analyse du tissu synovial de PR a permis de confirmer la présence des auto-anticorps anti-calpastatine dans le sérum des PR (Auger *et al.*, 2007c).

b) Les bibliothèques d'ADN complémentaires recombinants

Les bibliothèques ADN complémentaires (ADNc) recombinants sont réalisées à partir d'extraits de tissu synovial rhumatoïde. L'ADNc est répliqué dans un plasmide puis traduit en protéines ou en peptides, localisés à la surface des phages. Les auto-anticorps contenus dans le sérum des patients PR se lient aux protéines/peptides exprimés à la surface des phages.

Cependant les protéines synthétisées par les phages ne sont pas représentatives des protéines humaines car elles n'ont pas de modifications post-traductionnelles.

Avec la technique des bibliothèques d'ADNc, 11 nouveaux auto-anticorps ont été identifiés à partir de la synoviale rhumatoïde, avec une sensibilité de 2-13% et une spécificité de 100% (Somers *et al.*, 2011a).

c) Les puces à protéines

Les puces à protéines sont des lames sur lesquelles sont déposées des milliers de protéines humaines dont la synthèse est réalisée par des cellules d'insecte via un vecteur (baculovirus). Les puces que nous avons utilisées contiennent 8000 protéines humaines (Invitrogen). Les auto-anticorps du sérum se lient aux protéines de la puce et sont révélés par des anticorps secondaires anti-IgG couplé à un fluorochrome (figure 18).

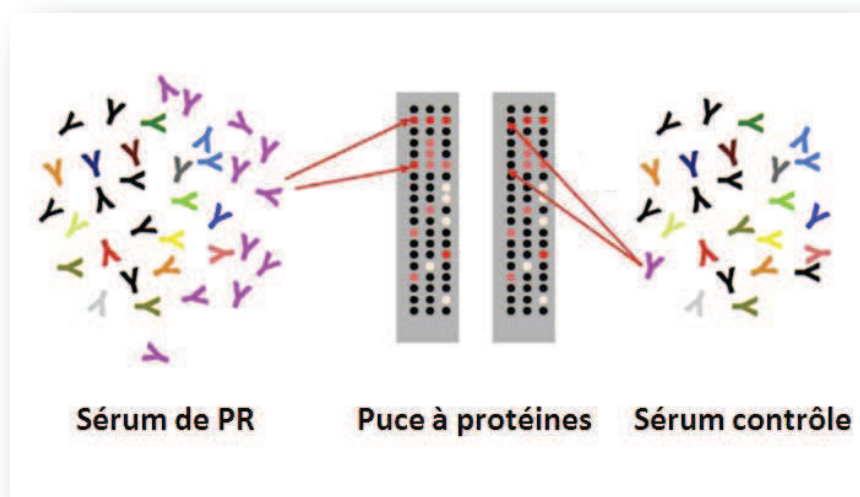


Figure 18 Puces à protéines testant la présence d'anticorps dans un sérum PR dans un sérum contrôle

Cette technique est très intéressante. D'abord par sa forte sensibilité. De plus par la multiplicité des antigènes testés. La production en cellule d'insecte fait que les protéines contiennent la plupart des modifications post-traductionnelles habituelles.

La limite est le coût des puces très élevé et la nécessité de valider les résultats. On teste donc le sérum d'une petite série de patients, puis les résultats sont validés par ELISA sur une population plus grande de patients et de contrôles.

d) Les puces à peptoïdes

Les puces à peptoïdes sont constituées d'une gamme de peptides de synthèse ayant subi des modifications. Pour un peptide normal les chaînes latérales sont construites sur des carbones alors que pour un peptoïde les chaînes latérales sont construites sur des azotes. Ces peptoïdes sont plus résistants aux dégradations enzymatiques et leur conformation peut augmenter la reconnaissance des auto-anticorps.

De cette manière 3 auto-anticorps de classe IgG reconnaissant des peptoïdes ont été mis en évidence chez la souris dans le modèle d'encéphalomyélite auto-immune et 3 autres dans la maladie d'Alzheimer (Reddy *et al.*, 2011).

4. Le diagnostic de la PR en pratique

La PR est une maladie hétérogène sur le plan de la présentation et de la sévérité. En pratique le rhumatologue qui reçoit un patient présentant des gonflements articulaires doit discriminer les arthrites liées à la PR des autres arthrites. Le diagnostic repose sur un ensemble d'arguments cliniques, radiologiques et biologiques.

1. Quels sont les outils à notre disposition pour le diagnostic ?

On peut utiliser les critères de classification de la PR. On analyse les données cliniques, biologiques, et radiologiques.

a) Éléments cliniques

C'est l'examen clinique qui oriente vers le diagnostic.

- L'âge de début : en péri-ménopause, après une grossesse
- Le nombre et la localisation des articulations atteintes ; petites et moyennes articulations, les mains, symétriques
- L'évolution progressive par poussées
- Les manifestations extra-articulaires : fatigue, fièvre, nodules rhumatoïdes
- Le contexte familial : antécédent de PR ou de maladie auto-immune

b) Critères de classification

Les critères ACR 1987

Les critères de classifications les plus anciens sont les critères ACR (American College of Rheumatology) 1987 révisés (Arnett *et al.*, 1988). Ils utilisaient 7 items comprenant des éléments cliniques, biologiques (la présence de FR) et radiologiques (radiographies standards). Il fallait 4 des 7 critères pour valider le diagnostic (figure 19).

1. Raideur matinale (articulaire ou périarticulaire) d'au moins une heure.	
2. Arthrite d'au moins trois articulations (atteinte simultanée constatée par un médecin et due à une tuméfaction des tissus mous ou à un épanchement articulaire. Les 14 régions concernées sont les IPP, MCP, poignets, coudes, genoux et chevilles).	
3. Arthrite des articulations de la main (au moins une région tuméfiée au niveau des IPP, MCP ou poignets).	
4. Arthrite symétrique (atteinte simultanée et bilatérale des articulations ou groupes d'articulations définis en 2. L'atteinte simultanée des IPP, MCP, et MTP est acceptable même en l'absence de symétrie parfaite).	
5. Nodules rhumatoïdes (nodosités sous-cutanées constatées par un médecin sur des crêtes osseuses ou des surfaces d'extension ou en situation périarticulaire).	
6. présence du facteur rhumatoïde	
7. Lésions radiologiques typiques sur les clichés des mains et des poignets (déméralisation en bande évidente ou érosions osseuses).	

Type d'atteinte articulaire (0-5)	
1 articulation moyenne ou grosse	0
2-10 articulations moyennes ou grosses	1
1-3 petites articulations	2
4-10 petites articulations	3
>10 articulations (au moins 1 petite articulation)	5
Sérologie (0-3)	
Ni FR ni ACPA	0
Au moins un test faiblement positif	2
Au moins un test fortement positif	3
Durée de la synovite (0-1)	
<6 semaines	0
>6 semaines	1
Marqueurs de l'inflammation (0-1)	
Ni CRP ni VS élevée	0
CRP ou VS élevée	1

Figure 19 Critères ACR1987 (il faut 4 points sur 7) et ACR2010 (6 points)

Ces critères identifient essentiellement des PR anciennes et sévères. En effet les nodules rhumatoïdes sont présents dans les PR sévères et après plusieurs années d'évolution. De même les érosions radiologiques sont le signe d'une PR ancienne. Les critères ACR 1987 identifient 47% des PR débutantes et 72% des PR au bout de 5 ans d'évolution dans une étude qui suit l'évolution de 800 arthrites récentes (Lunt *et al.*, 2005). Ces critères ne sont donc pas adaptés aux PR débutantes.

Critères ACR 2010

De nouveaux critères de classification ont été établis en 2010 (Aletaha *et al.*, 2010). Ils incluent les ACPA et le syndrome inflammatoire biologique. Les signes radiologiques sont absents des critères. Il faut avoir éliminé une autre cause d'arthrite pour les utiliser (figure 19).

Ces critères sont beaucoup plus sensibles que les critères ACR 1987. Ils identifient 51% des PR ayant nécessité un traitement de fond vs 30% pour les critères ACR 1987. Mais il existe aussi un phénomène de sur-diagnostic: 16% des patients classifiés PR avec les critères ACR 2010 vs 5% avec les critères ACR 1987 ont eu une évolution favorable sans traitement de fond en 18 mois d'évolution, ce qui laisse penser que ce n'était pas des PR (Cader *et al.*, 2011). Les critères ACR 2010 sont aujourd'hui les plus utilisés. Ils sont plus adaptés aux

PR débutantes. Cependant ils n'incluent pas les données du génotype HLA-DR ni les techniques radiologiques récentes (IRM et échographie).

c) Diagnostic anatomo-pathologique

L'analyse de la membrane synoviale par biopsie peut être la seule façon d'apporter la cause d'une synovite chronique. Elle peut montrer des éléments caractéristiques : synoviale inflammatoire et hypertrophique avec infiltrats des LT et LB. Mais en tout début de maladie ces anomalies peuvent être absentes (Pobirci *et al.*, 2011).

Le trocart de biopsie est introduit dans la cavité articulaire par arthroscopie sous anesthésie locale. En pratique la biopsie synoviale est rarement réalisée étant donnée la lourdeur du geste pour le patient.

Plusieurs caractéristiques histologiques peuvent orienter le diagnostic vers une PR dans le cadre d'une arthrite indifférenciée, mais aucun élément n'est discriminant (morphologie des vaisseaux, présence d'ACPA dans la synoviale) (Thevissen *et al.*, 2011).

La biopsie synoviale est indiquée lorsque le diagnostic n'a pas été possible par les autres examens en particulier dans le cas d'une mono-arthrite chronique (Machado *et al.*, 2011a). Elle révèle le plus souvent une synovite villo-nodulaire ou une arthrite septique chronique (Bresnihan, 2003).

d) Diagnostic biologique

Les analyses de sang permettent le plus souvent de faire le diagnostic de PR. Les éléments demandés en routine sont :

1/ **les auto-anticorps**. L'HAS recommande devant une arthrite débutante de demander au moins les FR (IgM ou néphélobimétrie) et les anticorps anti-CCP2 (www.has-sante.fr). Les ACAN sont souvent dosés pour le diagnostic différentiel avec le lupus. On rappelle que les FR sont moins sensibles que les ACPA. Les anti-CCP2 ont une sensibilité de 68% et une spécificité de 98%.

2/ **les paramètres inflammatoires** : vitesse de sédimentation et CRP. La présence d'un syndrome inflammatoire est fréquente dans la PR. C'est un élément de mauvais pronostic mais sans aucune spécificité (Tishler *et al.*, 1985).

3/ **le typage HLA classe I et II.** Il n'est pas réalisé systématiquement mais il est utile pour le diagnostic et le pronostic de PR. En France, 75% des patients PR ont au moins un allèle de susceptibilité HLA-DR (Reviron *et al.*, 2001). Le risque et la sévérité les plus forts sont associés aux génotypes HLA-DRB1*04:01/04:04 et HLA-DRB1*04:01/04:01 (Wordsworth *et al.*, 1992).

La présence d'autres allèles HLA est utile dans le diagnostic différentiel :

-l'allèle HLA-B27 oriente vers une spondylarthropathie : le risque relatif de développer une spondylarthropathie est de 20 (Braun *et al.*, 1998).

-l'association HLA-B8/DR3 oriente vers un lupus (Bishop *et al.*, 1993).

4/ **l'analyse du liquide synovial** permet surtout d'éliminer certains diagnostics : arthrite microcristalline (identification de cristaux d'acide urique ou de pyrophosphate de calcium au microscope optique) et arthrite septique (examen direct et culture).

e) Examens d'imagerie

Radiographies

On réalise des radiographies standards des articulations atteintes, et des mains et poignets de face systématiquement. Les lésions radiologiques de PR sont érosions (lacunes osseuses) et les pincements articulaires (diminution de l'interligne). Ces anomalies sont le plus souvent localisées sur les mains, les poignets et les pieds (figure 20). Il faut plusieurs mois d'évolution avant de pouvoir les visualiser: dans les 4 premiers mois d'évolution 30% ont des anomalies radiologiques, 91% au bout de 3 ans (Caruso *et al.*, 1990). Ensuite on observe des déformations avec subluxation, désaxation des articulations (Brahee *et al.*, 2003).



Figure 20 Radiographie de mains de PR. Destruction des articulations métacarpo-phalangiennes et pincement des inter-phalangiennes proximales.

Les traitements de fond de la PR visent à prévenir ces lésions destructrices. Les examens d'imagerie sont donc plus utiles lors de la phase débutante de la PR.

L'IRM et l'échographie permettent de visualiser des anomalies précoces lorsque les radiographies sont normales (Foley-Nolan *et al.*, 1991).

Imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'IRM permet de visualiser de l'œdème osseux et les synovites puis des érosions, que ce soit aux mains ou aux pieds (McQueen *et al.*, 2003). Ces anomalies peuvent être présentes dès 3 mois d'évolution clinique (Kosta *et al.*, 2011). Cependant en pratique cet examen est difficile d'accès en raison de son coût et du délai d'obtention.

Echographie

L'échographie est un examen simple, peu coûteux, qui peut être réalisé sur plusieurs articulations, avec des délais d'obtention rapide. Elle est très performante pour détecter des synovites et des érosions infra-radiologiques. Elle est plus facile à réaliser sur certaines articulations des mains (Boutry *et al.*, 2007). L'IRM serait plus performante que l'échographie pour prédire l'évolution d'une polyarthrite indifférenciée vers une PR (Machado *et al.*, 2011b).

Au total l'examen clinique est la base du diagnostic de la PR mais on a besoin d'examens para-cliniques pour affirmer le diagnostic. Les examens d'imagerie sont très utiles mais peu spécifiques. La biologie est le point clé du diagnostic de la PR.

2. Pourquoi un diagnostic rapide est nécessaire

La PR est une maladie grave pour laquelle il existe des traitements efficaces.

a) Les bases du traitement

Il s'agit d'une prise en charge multidisciplinaire associant la kinésithérapie, l'ergothérapie, les aides sociales et la prise en charge médicamenteuse.

Les traitements de fond appelés DMARDs (drug modifying antirheumatic disease) cherchent à bloquer les poussées articulaires. Il est recommandé de toujours associer un traitement de fond au traitement symptomatique, et dans un délai de 3 mois (www.has-sante.fr).

Il existe à l'heure actuelle plusieurs molécules indiquées dans la PR. Le médicament utilisé en première intention est le méthotrexate (inhibiteur de la dihydrofolate reductase). Le leflunomide (inhibiteur de la synthèse des pyrimidines) est indiqué en cas d'intolérance ou d'échec au méthotrexate.

Ensuite vient le groupe des "biothérapies" ou "traitements biologiques", qui sont des traitements immuno-modulateurs, utilisés en cas d'échec aux DMARDs. Les anti-TNF α sont les premières biothérapies en terme d'ancienneté et de quantité de prescription. D'autres molécules sont venues enrichir le panel thérapeutique au cours du temps (tableau 7).

	Médicaments	AMM en France dans la PR
Inhibiteurs du TNF α	Infliximab Anticorps monoclonal chimérique anti-TNF	1999
	Etanercept Récepteur soluble du TNF	2000
	adalimumab Anticorps monoclonal humanisé anti-TNF	2003
	Certolizumab Anticorps monoclonal humanisé pegylé anti-Fab	2010
Antagoniste du récepteur de type I de l'IL-1	Anakinra	2002
Inhibiteur du CD20	Rituximab	2006
Inhibiteur des molécules de co-stimulation du LT	Abatacept	2007
Anti-IL-6	Tocilizumab	2009

Tableau 7 Les biothérapies indiquées dans la PR en 2011

b) Les traitements de la PR sont très efficaces

L'efficacité clinique. Les DMARDs permettent d'obtenir une rémission clinique chez 30% des PR débutantes à 1 an d'évolution (suivi de 4290 PR issues de 20 essais randomisés) (Ma *et al.*, 2010). L'étude Best montre que l'infliximab (anti-TNF α) a une meilleure efficacité sur la rémission clinique s'il est employé dès le début de la maladie (Allaart *et al.*, 2006).

L'efficacité radiologique. Tous les DMARDs diminuent la progression de la destruction articulaire. L'apparition d'érosions chez 10 à 26% des patients dès

les 3 mois d'évolution (Harrison *et al.*, 2000) incite à débiter ces traitements rapidement.

Les traitements de la PR améliorent l'espérance de vie. Plusieurs travaux montrent que les traitements de fond augmentent l'espérance de vie des patients. Le methotrexate et les anti-TNF α diminuent le risque de mortalité en diminuant les événements cardio-vasculaires (Choi *et al.*, 2002; Greenberg *et al.*, 2011). Une étude réalisée en Suède et en Espagne entre 1992 et 2010 a montré que le taux de décès sous anti-TNF α est supérieur à la population générale mais inférieur à celui des PR non traitées par anti-TNF α (Sander, 2010).

L'enjeu social. Avant l'apparition des biothérapies, 92% des patients avaient une diminution de leurs capacités fonctionnelles après 9 ans d'évolution de la maladie (Pincus *et al.*, 1984). Une étude sur 600 PR suivies pendant 5 ans a montré que le traitement par anti-TNF α augmente la présence au travail des patients. Le gain de temps travaillé correspond à 40% des coûts annuels des anti-TNF α (Augustsson *et al.*, 2010).

c) Les biothérapies sont réservées aux PR certaines

Ces traitements ont des effets secondaires sérieux possibles

Les biothérapies augmentent le risque d'infection. Il faut souligner en particulier le sur-risque de **tuberculose** sous anti-TNF α qui a été diminué par un ensemble de précautions lors de son utilisation (Keane *et al.*, 2001).

Il y a une augmentation du risque de **lymphome** sous anti-TNF α , mais une méta-analyse montre que lorsqu'on ajuste le sur-risque de lymphome par rapport à l'activité de la maladie, l'OR est de 1 (Wolfe *et al.*, 2007).

Le sur-risque de **tumeur solide** sous anti-TNF α est controversé. Il y aurait une augmentation des tumeurs cutanées, principalement non mélaniques, et un risque accru de récurrence de cancer chez des patients aux antécédents néoplasiques (Amari *et al.*, 2011).

Les traitements biologiques peuvent aussi entraîner des **allergies sévères**. C'est surtout vrai pour l'infliximab et le rituximab (Hernández-Cruz *et al.*, 2011).

Certains de ces traitements sont indiqués uniquement dans la PR

Le certolizumab, le rituximab, le tocilizumab et l'abatacept ont uniquement l'AMM dans la PR. L'efficacité dans les autres rhumatismes inflammatoires est soit mauvaise soit inconnue. Il est donc nécessaire d'établir un diagnostic solide de PR avant de choisir son traitement de fond.

Ces traitements sont coûteux

Un traitement par methotrexate coute 120 euros par an, 6700 euros pour l'etanercept et 3000 euros pour le rituximab. Certains traitements sont administrés par voie veineuse ce qui augmente le prix global du traitement (coût de l'hospitalisation à prendre en compte).

3. Pourquoi le diagnostic de PR peut être difficile

a) Certains rhumatismes ressemblent à la PR

Le diagnostic de PR peut être évident à la phase d'état, où les signes cliniques sont francs. A la phase de début le diagnostic de certitude est moins facile.

Selon le nombre d'articulations atteintes et la durée des symptômes, l'âge et le sexe du patient on évoquera en priorité certains diagnostics (Figure 21).

La revue de Hazes détaille les principaux diagnostics possibles lors d'une arthrite inflammatoire : PR, spondylarthropathie, arthrite microcristalline, autres maladies systémiques, arthrose (tableau 8) (Hazes *et al.*, 2011).



Figure 21 Déformations des mains. 1^{ère} ligne : PR, rhumatisme psoriasique, goutte. 2^{ème} ligne : arthrose, lupus, sclérodermie

Pathologies	Fréquence selon les études
PR	10-70%
SPA	1-17%
Rhumatisme psoriasique	3-13%
Arthrite microcristalline	2-10%
Arthrose	1-10%
Autres maladies systémiques	1-6%
Autres	6-8%

Tableau 8 Evolution des arthrites indifférenciées après 6 à 12 mois (Hazes *et al.*, 2011)

Les spondylarthropathies comprennent la spondylarthrite ankylosante (SPA), du rhumatisme psoriasique (RhumPso), des spondylarthropathies associées aux maladies inflammatoires intestinales et les arthrites réactionnelles.

Elles concernent majoritairement l'homme (1/3), entre 30 et 40 ans. Il existe souvent une atteinte dite axiale (rachis, articulation sacro-iliaque). Ces éléments ne sont pas discriminants. En effet la prévalence de l'allèle HLA-B27

peut atteindre 10% de la population (al-Attia *et al.*, 1995), et le psoriasis cutané entre 1 et 3% (Jacobson *et al.*, 2011).

Le RhumPso entraîne des arthrites destructrices des mains qui ressemblent à une PR (Slobodin *et al.*, 2009).

Les rhumatismes microcristallins La précipitation de cristaux peut être responsable d'arthrite. Il s'agit le plus souvent de mono ou oligo-arthrite aiguë mais des cas de polyarthrite chronique sont possibles.

La goutte correspond à des cristaux d'acide urique. Elle concerne plus l'homme, atteinte de la 1^{ère} MTP. Il faut rechercher une insuffisance rénale, un traitement hyperuricémiant, une hyperuricémie. Les anomalies radiologiques (macro-géodes) sont tardives (Becker *et al.*, 2010).

Dans la chondrocalcinose ce sont des cristaux de pyruvate de calcium qui se déposent sur les fibrocartilage. Elle concerne plutôt la femme, vers 60 ans, avec une prédilection pour le poignet et le genou (Announ *et al.*, 2007).

L'arthrose érosive des mains peut cliniquement être très proche de la PR. La présence des auto-anticorps oriente facilement vers une PR (Punzi *et al.*, 2004).

Le lupus érythémateux systémique se manifeste par des arthralgies et arthrites des petites articulations. Ces atteintes sont déformantes mais non destructrices. Le contexte clinique est évocateur : femme jeune, antécédent d'auto-immunité, éruptions cutanées photosensibles, aphtes, antécédents de phlébite (Manzi, 2009).

La sclérodémie systémique et le syndrome de Sjögren peuvent se manifester par des arthralgies ou des arthrites. Il s'agit souvent d'une atteinte polyarticulaire.

L'arthrite septique est liée à un germe pyogène (streptocoque et staphylocoque surtout) ou à une mycobactérie. Il s'agit le plus souvent d'une mono-arthrite aiguë, mais elle peut être chronique dans le cadre d'une mycobactérie. Il faut rechercher une "porte d'entrée" : intervention chirurgicale, plaie, ponction articulaire. Il y a une forte fièvre associée. Le diagnostic se fait facilement par l'analyse du liquide articulaire. C'est une maladie très grave avec un taux de mortalité de 11% (Mathews *et al.*, 2010).

b) Certains rhumatismes restent indifférenciés

Au moment de la prise en charge d'un patient se présentant pour une arthrite inflammatoire le diagnostic de certitude n'est pas toujours possible. On parle

d'arthrite indifférenciée. Par définition, l'arthrite indifférenciée correspond à un gonflement (synovite) d'au moins une articulation pendant plus de 6 semaines, ne correspondant à aucune cause d'arthrite.

De nombreuses études observent le devenir dans le temps de ces arthrites indifférenciées (van Venrooij *et al.*, 2008a; Combe *et al.*, 2007; Carbonell *et al.*, 2008). La proportion d'arthrite qui reste indifférenciée au bout d'un an varie entre 1 et 46 % selon les travaux (Hazes *et al.*, 2011).

La présence des anticorps anti-CCP dans une population d'arthrite indifférenciée oriente très fortement vers une PR : 90% développeront une PR dans les 3 ans (van Venrooij *et al.*, 2008b).

c) Les situations difficiles en pratique

Dans la pratique quotidienne du rhumatologue le diagnostic de PR est plus difficile dans deux situations: la PR sans anticorps anti-CCP et la PR débutante.

• **La PR sans anticorps anti-CCP**

Lorsque les anticorps anti-CCP sont négatifs, le diagnostic de PR n'est pas écarté. En effet les anticorps anti-CCP sont négatifs dans 32% des PR dans la méta-analyse la plus récente (Avouac, 2005).

Dans la PR, lorsque les anti-CCP sont négatifs, les FR sont positifs dans 5-20% des cas. Il s'agit de PR de sévérité plus faible. (Inanc *et al.*, 2007; Mewar *et al.*, 2006; Sauerland *et al.*, 2005; Bizzaro *et al.*, 2001).

La difficulté est donc d'éliminer les diagnostics différentiels par les autres moyens décrits plus hauts.

Des situations cliniques fréquentes peuvent rendre le diagnostic d'autant plus délicat :

- antécédent familiaux de PR qui peut biaiser la démarche de consultation du patient et influencer également le médecin
- association avec du psoriasis cutané, qui touche 2% de la population, et peut orienter à tort vers une spondylarthropathie
- atteinte isolée des mains, qui peut passer pour une arthrose digitale.

- **La PR débutante**

On parle de PR débutante lorsque les symptômes de la maladie évoluent depuis quelques mois. Dans notre travail nous avons retenu la durée de **12 mois**.

Une étude récente a été réalisée sur 500 PR suivies dans 10 centres. Le délai moyen entre les symptômes et la consultation est de 3 mois, et le diagnostic est posé en 6 mois en moyenne (Machold *et al.*, 2002). Plusieurs facteurs rendent le diagnostic de PR difficile à porter pendant la première année.

Premièrement les anticorps anti-CCP sont moins fréquents dans les PR débutantes. Dans les PR débutantes de moins de 6 mois de durée, la sensibilité des anti-CCP n'est que de 50 à 58 % (Goldbach-Mansky *et al.*, 2000) pour 68% dans les PR établies.

De plus les signes cliniques peuvent être frustes au départ, ou non spécifiques. Dans une étude rétrospective sur 300 PR le début est insidieux (progressif) dans 64% des cas. L'atteinte mono-articulaire représente 21% des patients (Halla *et al.*, 1987).

Pour faire le diagnostic d'une PR sans anticorps anti-CCP et d'une PR débutante nous avons besoin de nouveaux marqueurs biologiques.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Publication 1 HLA-DRB1*04:04 is strongly associated with anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis

Clin Exp Rheumatol. 2008 Jul-Aug;26(4):627-31

Charpin C, Balandraud N, Guis S, Roudier C, Toussirot E, Rak J, Lambert N, Martin M, Reviron D, Roudier J, Auger I

Les gènes HLA-DR sont les principaux facteurs de susceptibilité à la PR. Les principaux allèles HLA-DR de susceptibilité à la PR sont HLA-DRB1*04:01, HLA-DRB1*04:04, HLA-DRB1*04:05, HLA-DRB1*04:08 et HLA-DR1.

L'objectif de cette étude était d'analyser l'influence des allèles HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB1*04:01 et HLA-DRB1*04:04 sur la présence d'anticorps anti-CCP dans la PR dans notre population marseillaise de PR. Nous avons calculé le pourcentage de patients positifs pour les anticorps anti-CCP parmi ceux exprimant deux, un ou aucun allèle HLA-DR de susceptibilité à la PR. Nous avons analysé 260 patients présentant une PR et 126 patients présentant d'autres rhumatismes inflammatoires chroniques et des sujets sains.

Nos résultats :

1/ Dans notre population, 77% des PR ont des anticorps anti-CCP et seulement 3% des contrôles.

2/ Les allèles HLA-DR de susceptibilité ne sont pas nécessaires à la présence d'anticorps anti-CCP. En effet 68 % des patients n'exprimant pas d'allèle de susceptibilité à la PR ont des anticorps anti-CCP.

3/ Il n'y a pas de différence significative dans le pourcentage d'anticorps anti-CCP entre les patients exprimant un allèle de susceptibilité à la PR ou n'exprimant pas d'allèle de susceptibilité. Les patients porteurs de 2 allèles de susceptibilité n'ont pas plus d'anticorps anti-CCP que les patients porteurs d'un seul allèle de susceptibilité.

4/ l'allèle HLA-DRB1*04:04 est fortement associé à la production d'anticorps anti-CCP dans notre population de PR. Ainsi parmi les PR qui ont 1 allèle de

susceptibilité, l'allèle HLA-DRB1*04:04 est lié à la présence d'anticorps anti-CCP dans 90% des cas, vs 72% pour les autres allèles de susceptibilité (HLA-DRB1*04:01 et HLA-DRB1*01:01), et 68% pour les génotypes sans allèle de susceptibilité.

Enfin l'allèle HLA-DRB1*04:04 est associé à des taux plus élevés d'anticorps anti-CCP.

Les résultats de notre étude confirment que l'allèle HLA-DRB1*04:04 est associé à la production d'anti-CCP dans la PR.

Publication 2 Auto-antibody to B-Raf, a new family of auto-antibody associated with rheumatoid arthritis

Arthritis Res Ther. 2010;12(5):R194. Epub 2010 Oct 18

Charpin C, Martin M, Balandraud N, Roudier J, Auger I

A l'aide de puces contenant 8000 protéines humaines, notre laboratoire a recherché de nouveaux auto-anticorps spécifiques de la PR. Nous avons identifié le domaine catalytique de B-Raf (v raf murine sarcoma viral oncogen homologue B1) comme un nouvel auto-antigène. En effet il est reconnu par 35% des PR vs 5% des contrôles. Les auto-anticorps anti-B-Raf sont présents chez les patients PR avec et sans anticorps anti-CCP.

L'objectif de ce travail était d'identifier les peptides les plus immunogènes sur le domaine catalytique de B-Raf. Pour cela nous avons synthétisé 20 peptides chevauchants sur 10 acides aminés correspondant au domaine catalytique (en position 416-766). La réactivité IgG de chaque sérum contre les peptides a été détectée par ELISA.

1/ Nous avons identifié au sein du domaine catalytique de B-Raf, des peptides reconnus par les sérums de patients PR. **Le peptide p10 de B-Raf (position 506-525) est reconnu par 35% des PR versus 11% des contrôles; p25 (position 656-675) de B-Raf est reconnu par 19% des PR versus 0,7% des contrôles.** Le peptide p10 est plus sensible que p25 mais il est manqué de spécificité et ne peut pas être utilisé en diagnostic. Le peptide p25 a une excellente spécificité dans la PR.

2/ Nous avons constaté que 21% des patients PR sans anticorps anti-CCP ont des auto-anticorps anti-p25 de B-Raf versus 0,7% des contrôles.

3/ Nous avons voulu tester si les auto-anticorps des patients sont capables d'activer B-Raf. Pour cela, les auto-anticorps anti-B-Raf ont été purifiés et incubés en présence de B-Raf et MEK1. **Nous avons montré que les auto-anticorps anti-B-Raf augmentent l'activité de phosphorylation de B-Raf sur son principal substrat MEK1.**

Nous avons montré que B-Raf est un auto-antigène de la PR. Le peptide p25 de B-Raf est très spécifique des PR sans anticorps anti-CCP. La détection d'auto-anticorps dirigés contre B-Raf et le peptide p25 a donné lieu au dépôt de 2 brevets :en 2008: "Methods and kits for the diagnosis of rheumatoid

arthritis" (WO 2009138408 A3) et en 2009: "Methods for the diagnosis of rheumatoid arthritis" (EP 09306063.0).

Publication 3 New auto-antibodies associated with early rheumatoid arthritis (en préparation)

Charpin C, Martin M, Toussirot E, Balandraud N, Wendling D, Roudier J, Auger I

L'objectif de ce travail était d'identifier de nouveaux auto-anticorps spécifiques de PR débutantes.

Nous avons travaillé sur une population de PR de Marseille et de Besançon de moins de 12 mois d'évolution répondant aux critères de l'ACR 2010.

1/ A l'aide de puces contenant 8000 protéines humaines, nous avons testé 20 PR débutantes, 19 PR de plus de 5 ans d'évolution et 23 contrôles. **Nous avons mis en évidence 24 nouveaux auto-antigènes retrouvés chez des patients atteints de PR de moins de 1 an d'évolution.**

2/ Pour valider ces résultats, nous avons testé les sérums de 68 PR débutantes, 40 PR de plus de 5 ans d'évolution et 141 contrôles. **Nous avons validé 4 protéines spécifiques des PR débutantes. Ces protéines sont reconnues par 18 à 41% des PR débutantes vs 5% des contrôles.**

Ces protéines sont: GABARAPL2 (GABA(A) receptor associated protein like 2), ZNF706 (zinc finger protein 706), TPM2 (tropomyosin 2) et WIBG (within BGCN homolog (Drosophila)). La détection d'auto-anticorps dirigés contre l'une de ces protéines dans le diagnostic d'une PR débutante, a donné lieu au dépôt d'un brevet en 2011 (EP 11305584.2. « Method for the diagnosis of early rheumatoid arthritis »).

Soixante pourcent des PR débutantes ont des auto-anticorps dirigés contre au moins une de ces 4 protéines.

3/ De plus nous avons observé que ces auto-anticorps sont présents chez 40% des PR débutantes sans anticorps anti-CCP.

4/ Parmi ces 4 protéines les auto-anticorps anti-WIBG identifient exclusivement les PR.

5/ Les auto-anticorps dirigés contre ces 4 protéines diminuent en fonction de l'ancienneté de la PR. Par exemple les auto-anticorps anti-WIBG sont présents chez 41% des PR débutantes, 12% des PR entre 1 et 5 ans d'évolution, et 5% des PR de plus de 5 ans d'évolution. La diminution de ces auto-anticorps peut être liée aux traitements de la PR.

Ces protéines pourraient être utilisées pour le diagnostic et le suivi des PR débutantes.

Discussion

1. Physio-pathologie de la PR : la production des ACPA est-elle-contrôlée par le génotype HLA-DR?

Dans la PR il y a 2 éléments critiques : le génotype HLA-DR et les ACPA.

1/ Les facteurs génétiques contribuent pour 60% au développement de la PR (van der Woude *et al.*, 2010). Les allèles de prédisposition HLA-DR à la PR représentent le facteur génétique le plus important: environ 40% des facteurs génétiques (Imboden, 2009)

2/ Les ACPA sont les auto-anticorps les plus spécifiques de la PR. Les allèles HLA-DR contribuent à la production d'ACPA mais on ne sait pas encore par quel mécanisme.

Au moment de la réalisation de travail, l'association des allèles de susceptibilité HLA-DR et des ACPA dans la PR était déjà décrite dans plusieurs populations : en Europe du Nord, aux Etats-Unis, au Japon (van der Helm-van Mil *et al.*, 2007; Irigoyen *et al.*, 2005; Furuya *et al.*, 2007; Huizinga *et al.*, 2005a). La spécificité des ACPA dans la PR était connue mais le dosage des anticorps anti-CCP n'était pas encore réalisé en routine en 2007.

L'objectif de notre travail était de montrer l'influence des allèles de susceptibilité HLA-DR sur la présence d'ACPA dans notre population marseillaise de PR. Nous avons analysé 260 patients présentant une PR et 126 patients présentant d'autres rhumatismes inflammatoires chroniques et 56 sujets sains.

a) Rôle du génotype HLA-DR dans la production d'ACPA

La présence d'un allèle de susceptibilité n'est pas indispensable à la production des ACPA

Nous avons observé que la présence des allèles de susceptibilité à la PR n'est ni nécessaire ni suffisante pour produire les ACPA. En effet, 68 % des patients n'exprimant pas d'allèle de susceptibilité à la PR ont des ACPA. Dans une étude antérieure un résultat similaire avait été observé pour les auto-anticorps anti-

fibrinogène citrulliné (AFIBA): 55% des patients PR n'exprimant pas d'allèle de susceptibilité à la PR avaient des AFIBA (Auger *et al.*, 2005a).

La production des ACPA est influencée par le génotype HLA-DR

Nous avons observé que les patients qui expriment au moins un allèle HLA-DR de susceptibilité ont plus d'ACPA que ceux qui n'expriment pas d'allèle de susceptibilité, mais cette différence n'est pas statistiquement significative (probablement pour une question de taille d'échantillon).

Plusieurs études ont montré que les patients exprimant un allèle de susceptibilité avaient plus d'ACPA que les patients n'exprimant pas d'allèle de susceptibilité. Dans une cohorte Néerlandaise de 313 patients PR, 61% des patients exprimant au moins un allèle de susceptibilité ont des ACPA contre 36% des patients sans allèle de susceptibilité (van der Helm-van Mil *et al.*, 2007). Dans une cohorte caucasienne Nord-Américaine de 1723 PR, on observe aussi une association entre les allèles de susceptibilité et la présence d'ACPA (Irigoyen *et al.*, 2005).

De plus on s'attendait à trouver des taux d'ACPA plus élevés lorsqu'il y a 2 allèles de susceptibilité à la PR que lorsqu'il n'y en a qu'un. C'est ce qui a été mis en évidence dans plusieurs cohortes d'arthrites débutantes à Leiden et au Japon (Huizinga *et al.*, 2005b; Furuya *et al.*, 2007). Dans notre étude il n'y a pas de différence significative dans le taux d'ACPA des patients avec un ou 2 allèles de susceptibilité, probablement en raison de la taille de l'effectif.

Les ACPA sont plus élevés chez les patients exprimant l'allèle HLA-DRB1*04:04

Parmi les patients PR exprimant un seul allèle de susceptibilité, nous avons pu mettre en évidence une forte association entre l'allèle HLA-DRB1*04:04 et la présence d'ACPA. D'autre part, nous avons observé que l'allèle HLA-DRB1*04:04 est également associé à des titres plus élevés d'ACPA.

Il avait déjà été montré que HLA-DRB1*04:04 est associé aux auto-anticorps anti-fibrinogène citrulliné (Auger *et al.*, 2005b) et anti-calpastatine (Auger *et al.*, 2007c). L'allèle HLA-DRB1*04:04 semble posséder des propriétés originales associées à la production d'auto-anticorps.

Une étude allemande et une étude néerlandaise ont montré que le génotype HLA-DR4 est fortement associé avec les ACPA et qu'il existait une association plus faible pour HLA-DR1 (van der Helm-van Mil *et al.*, 2007; Senkpiehl *et al.*, 2005). Par contre, c'est l'allèle HLA-DRB1*04:01 qui était associé aux ACPA pour des populations de PR de l'Europe du Nord et du Portugal (van Gaalen *et*

al., 2004; Ligeiro *et al.*, 2007). Notre étude correspond à la première description de l'association des ACPA avec l'allèle HLA-DRB1*04:04.

b) Rôle du tabagisme dans la production d'ACPA

Si le génotype HLA-DR ne peut pas expliquer à lui seul la production des ACPA dans la PR, il faut chercher d'autres facteurs qui influencent l'apparition de ces auto-anticorps. Le seul facteur environnemental actuellement identifié dans la PR est le tabagisme.

Influence du tabagisme dans la production d'ACPA

Le tabagisme augmente le risque de PR uniquement chez les patients possédant des FR (Masdottir *et al.*, 2000) et des ACPA (Linn-Rasker, 2006).

Une étude démembré l'influence du tabagisme et des allèles de susceptibilité dans la production d'ACPA chez les PR. Ce travail montre que le tabagisme influence la production d'ACPA pour les PR sans allèle de susceptibilité, mais de manière moins forte que pour les PR avec allèle de susceptibilité (figure 22). Par exemple pour un tabagisme de plus de 20 paquets-années l'OR est de 1,9 par rapport à un patient non-fumeur (Källberg *et al.*, 2011).

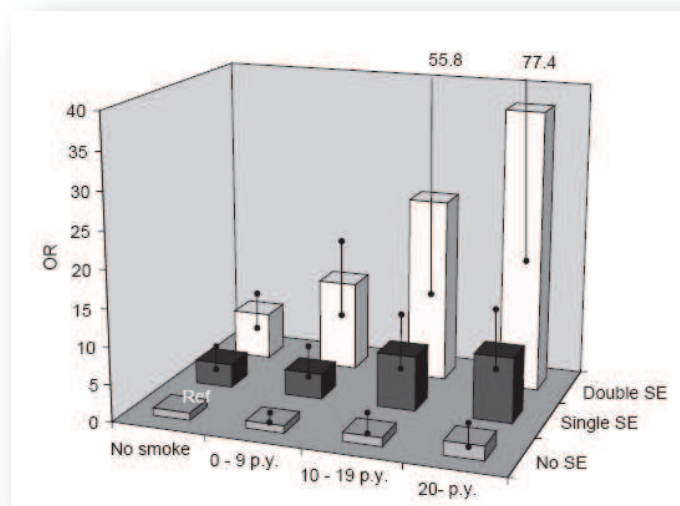


Figure 22 Risque de développer une PR avec ACPA selon le tabagisme (nombre de paquets-années), et selon le nombre d'allèles de susceptibilité (d'après Källberg)

Interaction du tabagisme avec les allèles HLA-DR dans la PR avec ACPA

Pour chaque allèle HLA-DR de susceptibilité à la PR, le tabagisme est lié de manière quantitative au risque de développer une PR avec ACPA (figure 22).

Chez les patients avec 2 allèles de susceptibilité, 55% des PR avec ACPA sont attribuables au tabagisme (Källberg *et al.*, 2011).

La combinaison de l'épitope partagé et du tabagisme prédispose très fortement à la PR avec ACPA: il y a donc une synergie entre ces 2 facteurs. Le risque de développer une PR avec ACPA pour un fumeur porteur de 2 épitopes partagés est de 21 par rapport à un non-fumeur sans épitope partagé (Klareskog *et al.*, 2006).

Le génotype HLA-DR et le tabagisme sont donc 2 facteurs indépendants et synergiques qui influencent la production d'ACPA dans la PR.

c) Par quel mécanisme le génotype HLA-DR et le tabagisme influencent-ils la production d'ACPA ?

Rôle du tabagisme dans la citrullination

Comment peut-on expliquer l'influence du tabagisme dans la production des ACPA? Récemment il a été montré que le tabagisme augmente la citrullination de manière non-spécifique, et non la citrullination d'un antigène en particulier. L'interaction entre les gènes HLA-DR et le tabagisme dans la PR ne passe donc pas par une augmentation de la production des ACPA, mais par l'augmentation de la citrullination d'antigènes (Willemze *et al.*, 2011).

Le tabagisme interviendrait dans l'augmentation de la citrullination par l'augmentation de l'expression des PAD. Il a été mis en évidence une augmentation de l'expression de PAD2 dans des biopsies de muqueuse bronchique chez les fumeurs comparées aux non-fumeurs (Makrygiannakis *et al.*, 2008). Le tabagisme augmente l'apoptose des macrophages alvéolaires (Aoshiba *et al.*, 2001) ce qui peut augmenter la concentration de calcium intracellulaire pouvant contribuer à une activité plus importante des PAD (Klareskog *et al.*, 2006).

Rôle de la citrullination dans la présentation peptidique

On ne sait pas comment les allèles HLA-DR contribuent à la production d'ACPA. Les allèles de susceptibilité ont un commun l'épitope partagé qui se situe dans la poche à peptide P4. Cette poche à peptide est chargée positivement pour les allèles de susceptibilité.

L'équipe de Hill a formulé l'hypothèse suivante: la citrullination d'un antigène permettrait sa fixation aux allèles de susceptibilité. En effet la citrullination transforme un résidu chargé positivement en un résidu neutre, ce qui

favoriserait l'interaction avec la poche à peptide chargée positivement pour les allèles de susceptibilité. La présentation de ce peptide citrulliné via l'épitope partagé à un LT CD4+ pourrait aboutir à production d'ACPA. L'équipe de Hill a travaillé dans le modèle d'arthrite au collagène sur des peptides de la vimentine, et a montré que l'affinité d'un peptide de la vimentine pour la molécule HLA-DRB1*04:01 est meilleure lorsque le peptide est citrulliné (Hill *et al.*, 2003).

Cependant cette hypothèse n'a jamais été confirmée. Prenons l'exemple du travail sur le fibrinogène citrulliné. La fixation de peptides du fibrinogène sur les molécules HLA-DR a été testée en utilisant 93 peptides de la chaîne α et 74 peptides de la chaîne B). La fixation des peptides citrullinés n'est pas plus forte sur les molécules HLA-DR susceptibles (HLA-DRB1*04:01, 04:04) que sur les molécules HLA-DR protectrices HLA-DRB1*04:02 et HLA-DRB1*07:01 (Auger *et al.*, 2005b).

d) Les PR avec et sans ACPA sont-elles des maladies différentes ?

Nous avons montré que l'allèle HLA-DRB1*04:04 est lié à une production plus importante d'ACPA dans la PR. D'autres équipes avaient trouvé un lien entre la présence de l'épitope partagé et la production des ACPA. On peut donc se demander si les PR avec et sans ACPA correspondent à la même maladie ou s'il s'agit de 2 entités à considérer différemment en particulier sur le plan physiopathologique.

Le terrain génétique des PR sans ACPA est-il différent ?

- Les allèles de susceptibilité HLA-DR prédisposent-ils uniquement aux PR avec ACPA ?

Il existe à l'heure actuelle peu de données sur les facteurs génétiques prédisposant aux PR sans ACPA.

Les travaux de Huizinga et Irigoyen n'ont pas mis en évidence d'association entre les allèles de susceptibilité et la PR sans ACPA. Ces études analysent des PR issues de 2 cohortes d'Amérique du Nord et d'Europe du Nord.

Huizinga a analysé une cohorte d'arthrites indifférenciées qui évoluent vers 200 PR sans ACPA et 200 PR avec ACPA. La présence d'ACPA influence l'évolution vers une PR, que ce soit dans le groupe avec ou sans allèle de prédisposition HLA-DR. Par contre la présence d'un allèle de susceptibilité influence

l'évolution vers une PR uniquement lorsque les ACPA sont présents. Il n'y a pas plus de PR avec allèle de susceptibilité que sans allèles de susceptibilité dans le groupe ACPA-, ceci étant valable pour les PR ACPA-/FR- et ACPA-/FR+ (Huizinga *et al.*, 2005a). L'étude d'Irigoyen a regroupé 2 cohortes de PR (1100 PR d'Amérique du Nord et 500 patients d'Europe du Nord). Il n'y a pas plus de PR avec allèle de susceptibilité que sans allèle de susceptibilité parmi les 500 PR sans ACPA, que ce soit dans le sous-groupe ACPA-/FR+ ou ACPA-/FR- (Irigoyen *et al.*, 2005).

Ce résultat provient d'une même équipe de généticiens, et n'a pas été confirmé.

Deux autres travaux récents portant sur de groupes populations de PR sans ACPA analysent la prévalence des FR et la répartition des allèles de susceptibilité HLA-DR (Mackie *et al.*, 2011; Terao *et al.*, 2011a).

L'étude anglaise regroupant 3600 PR provenant de 5 villes différentes a montré que 41% des PR sans ACPA ont des FR. L'association des allèles HLA-DR avec la PR a été confirmée dans le sous-groupe des PR ACPA-/FR+, mais pas dans le sous-groupe ACPA-/FR- (Mackie *et al.*, 2011).

Dans l'étude japonnaise de Terao, 900 PR de Tokyo et Kyoto sans ACPA ont été analysées. Quarante-huit pourcent ont des FR. Les allèles HLA-DR de susceptibilité à la PR habituellement identifiés au Japon (HLA-DRB1*04:05 et HLA-DRB1*09:01) sont associés aux PR ACPA-/FR+ et pas aux PR ACPA-/FR- (Terao *et al.*, 2011a).

Donc ces 2 travaux ont montré que l'association des allèles de susceptibilité HLA-DR avec la PR est valable également pour les PR ACPA-/FR+.

- Il existe des facteurs génétiques spécifiques des PR sans ACPA

Des travaux isolés ont mis en évidence certains allèles HLA-DR spécifiquement associés aux PR sans ACPA.

Dans le travail de Terao, les allèles HLA-DR14 et le génotype HLA-DR8/HLA-DR8 sont associés aux PR sans ACPA et sans FR (Terao *et al.*, 2011b). Les allèles HLA-DR3 sont associés aux PR sans ACPA chez les caucasiens (Irigoyen *et al.*, 2005).

Ces travaux nécessitent confirmation dans d'autres populations.

Les caractéristiques cliniques d'une PR sans ACPA

Au stade de début, les PR avec ou sans ACPA sont cliniquement comparables. Mais les PR avec ACPA ont une évolution clinique et radiologique plus sévères (van der Helm-van Mil *et al.*, 2005; Ohmura *et al.*, 2010).

Récemment, il a été montré une différence dans l'analyse histologique de la synoviale des PR avec ACPA et sans ACPA. La synovite rhumatoïde chez les PR avec ACPA montre notamment un infiltrat lymphocytaire plus important, et corrélant avec une destruction radiologique avoisinante plus importante (van Oosterhout *et al.*, 2008; Ohmura *et al.*, 2010).

La réponse aux traitements est moins bonne pour les PR sans ACPA

Il a été montré pour l'infliximab (anti-TNF α) que la réponse au traitement est meilleure en cas de positivité des FR et des ACPA (Klaasen *et al.*, 2011). Les PR sans ACPA sont donc moins sévères mais répondent moins bien aux traitements.

Ces données suggèrent qu'il existe bien plusieurs PR. Il serait intéressant de mieux caractériser les PR sans ACPA, notamment avec de nouveaux marqueurs biologiques.

2. Auto-anticorps anti-B-Raf : implications dans la PR

A l'aide de puces à protéines notre laboratoire a identifié le domaine catalytique de B-Raf comme un nouvel auto-antigène reconnu par 35% des PR vs 5% des contrôles. Cette protéine est impliquée dans la voie des MAP-kinases. Elle est connue en cancérologie pour ses mutations activatrices qui interviennent dans de nombreuses néoplasies notamment dans le mélanome. Nous avons voulu 1/préciser la cible épitopique de ces auto-anticorps 2/comprendre leur rôle fonctionnel dans la PR 3/en tirer un outil diagnostique dans la PR.

a) Les auto-anticorps anti-B-Raf, outil diagnostique dans la PR

Quels sont les peptides de B-Raf reconnus dans la PR ?

Nous avons identifié au sein du domaine catalytique de B-Raf des peptides spécifiquement reconnus par les sérums de patients PR. Le peptide p10 de B-Raf est reconnu par 35% des PR versus 11% des contrôles; p25 de B-Raf est reconnu par 19% des PR versus 0,7% des contrôles. Le peptide p10 est plus sensible que p25 mais il manque de spécificité et ne peut pas être utilisé en diagnostic car sa spécificité est inférieure à 90%. Le peptide p25 a une excellente spécificité dans la PR.

La détection des auto-anticorps anti-p25 dans le diagnostic de la PR a donné lieu au dépôt de 2 brevets :

-en 2008: "Methods and kits for the diagnosis of rheumatoid arthritis" (WO 2009138408 A3).

-en 2009: "Methods for the diagnosis of rheumatoid arthritis" (EP 09306063.0).

Nous avons analysé la présence des auto-anticorps anti-p25 en fonction du génotype HLA-DR pour 297 PR d'Evry et de Marseille (figure 23). Nous n'avons pas mis en évidence d'association significative entre les anticorps anti-p25 et la présence d'un ou plusieurs allèles de susceptibilité.

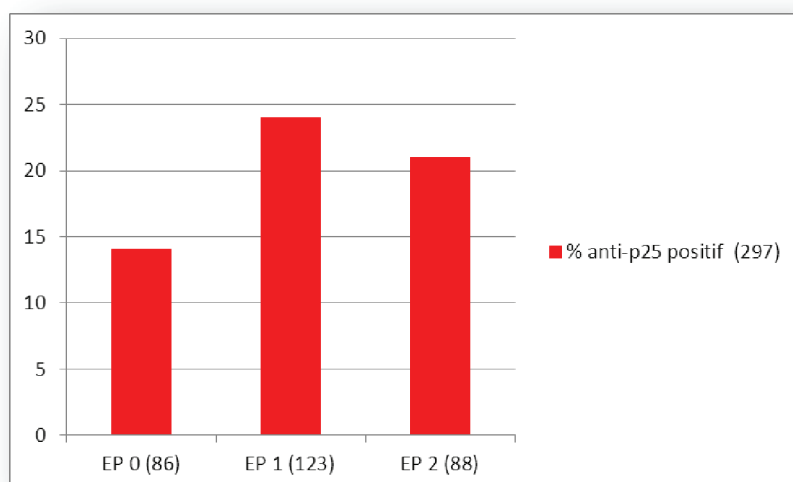


Figure 23 Pourcentage de PR avec auto-anticorps anti-p25 selon le nombre d'EP

Intérêt des auto-anticorps anti-p25 dans le diagnostic des PR sans ACPA

Nous avons montré que le peptide p25 de B-Raf est reconnu par les PR sans ACPA. En général, les PR sans ACPA représentent 1/3 des PR. Lorsque les ACPA sont négatifs, les FR sont positifs dans 45% des cas (Mackie *et al.*, 2011; Terao *et al.*, 2011b). Il y a donc besoin de marqueurs pour ces PR sans ACPA.

Dans notre population de 180 PR de plus de 5 ans d'évolution, 105 PR ont des anticorps anti-CCP et 75 PR n'en n'ont pas. Quarante quatre pourcent des PR avec anti-CCP ont des FR, vs 58% des PR sans anti-CCP (tableau 9).

	PR avec anti-CCP (105)	PR sans anti-CCP (75)
AGE moyen	54	57
FR+ (%)	84	58
GENOTYPAGE (%)		
0 EP	16	36
1 EP	46	41
2 EP	38	23

Tableau 9 Comparaison des FR et du génotype HLA-DR pour les PR de Marseille PR avec et sans ACPA

Nous avons constaté que le peptide p25 de B-Raf est reconnu par 21% des patients qui n'ont pas d'anticorps anti-CCP. De plus, parmi les patients sans anticorps anti-CCP, 17% reconnaissent le peptide p25. Le peptide p25 de B-Raf peut être utile pour identifier des PR sans anticorps anti-CCP.

Ce résultat a pu être confirmé avec plus de patients provenant de Marseille (95 PR), Toulouse (101 PR) et Evry (50 PR) (figure 24).

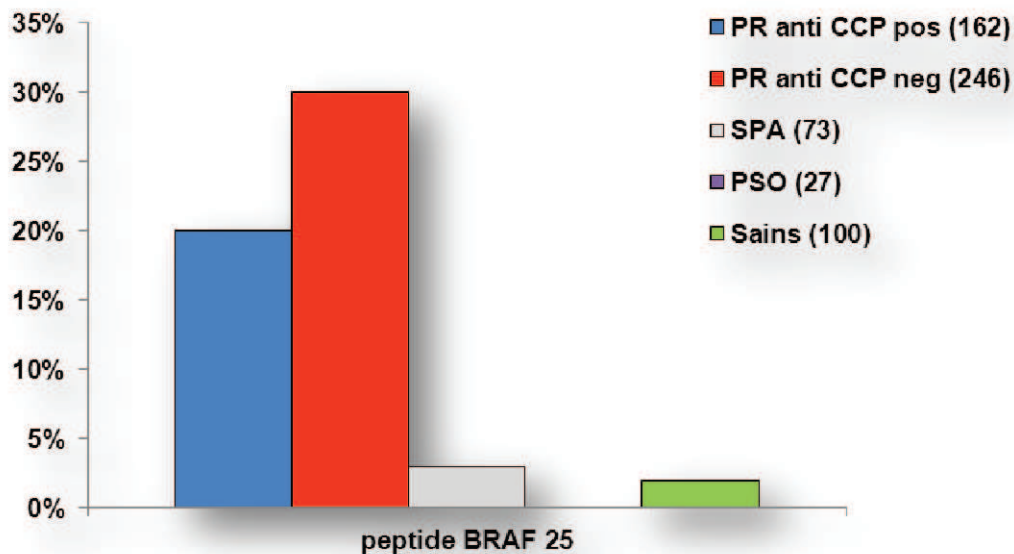


Figure 24 Pourcentage de patients avec auto-anticorps anti-p25

Nous avons donc montré que B-Raf est un auto-antigène de la PR. Le peptide p25 est spécifique des PR avec et sans anticorps anti-CCP.

Ces résultats sont d'autant plus intéressants que très peu d'équipes ont travaillé sur ces auto-anticorps dans le diagnostic des PR sans ACPA. En utilisant des bibliothèques d'ADN complémentaires extraits de la synoviale de PR, Somers a mis en évidence 5 nouveaux auto-antigènes associés aux PR sans ACPA : 2 ribonucléoprotéines (ribosomal protein 21 et 40S ribosomal protein), la vacuolar protein sorting 24, la mitotine (rôle dans l'initiation de la réplication de l'ADN), la sélénoprotéine (homostasie du sélénium). Ces auto-anticorps dirigés contre des protéines ont été testés sur 92 PR (dont 44 n'ont pas d'ACPA) et 121 contrôles. Ces auto-anticorps ont une sensibilité de 5 à 13% dans l'ensemble des 92 PR et sont mis en évidence uniquement chez les PR. Cependant ils sont aussi positifs pour les PR avec ACPA. Leur sensibilité est donc faible et leur spécificité pour les PR sans ACPA reste à valider (Somers *et al.*, 2011b).

b) Rôle fonctionnel des auto-anticorps anti-B-Raf

Les anticorps dirigés contre une enzyme peuvent modifier l'activité de cette enzyme. Par exemple, les auto-anticorps anti-PAD4 inhibent l'activité de citrullination de cette enzyme (Auger *et al.*, 2010). Pour connaître le rôle fonctionnel des auto-anticorps anti-B-Raf, nous avons réalisé des tests de phosphorylation de MEK1 en présence des auto-anticorps anti-B-Raf purifiés.

Nous avons observé *in vitro* que la phosphorylation de MEK1 est augmentée en présence des auto-anticorps anti-B-Raf. Cette observation soulève plusieurs questions :

1/ Comment les auto-anticorps anti-B-Raf peuvent-ils interagir avec B-Raf ? B-Raf est une protéine intra-cellulaire. Elle peut se retrouver à l'extérieur de la cellule car dans la PR il y a des phénomènes de mort cellulaire ou de nécrose qui libèrent le contenu intra-cellulaire. Les auto-anticorps anti-B-Raf dans le sérum des patients PR peuvent ainsi se lier à B-Raf.

2/ Comment expliquer que les auto-anticorps anti-B-Raf augmentent l'activité de B-Raf? Les auto-anticorps anti-B-Raf se fixent sur le site catalytique de B-Raf. La fixation des auto-anticorps anti-B-Raf maintiendrait B-Raf dans une conformation favorable à la phosphorylation de son substrat. Ces hypothèses doivent être confirmées *in vivo*.

3/ Quelles sont les conséquences de l'activation de B-Raf dans la PR? Les auto-anticorps anti-B-Raf pourraient activer la voie des MAP-kinases en augmentant l'activité de B-Raf. Or la voie des MAP-kinases est impliquée dans la PR. En effet la voie des MAP-kinases intervient dans la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 et IL-6) qui ont un rôle dans l'inflammation articulaire.

c) Mutations de BRAF dans la synoviale de PR

Un travail réalisé sur 9 patients PR a mis en évidence des mutations de BRAF dans les fibroblastes synoviaux chez 3 patients. Pour 2 patients, il s'agit de la mutation activatrice V600R. Pour un patient, il s'agit d'une délétion partielle du domaine N-terminal auto-inhibiteur de B-Raf. Ces mutations, associées à une sur-activation de B-Raf, expliqueraient la prolifération des fibroblastes qui détruit le cartilage articulaire et l'os sous-chondral dans la PR.

La prolifération de ces fibroblastes est inhibée par la présence de petits ARN interférents spécifiques des formes mutées de BRAF (Weisbart *et al.*, 2010).

Ce travail montre que comme dans le mélanome où B-Raf favoriserait la prolifération des mélanocytes, B-Raf interviendrait aussi dans la prolifération des synoviocytes dans la PR.

Ces mutations sont-elles à l'origine de la présence des auto-anticorps anti-B-Raf ? Actuellement nous recherchons la présence de mutations de BRAF dans les PBMC et le tissu synovial des patients PR qui ont des auto-anticorps anti-B-Raf.

d) Existe-il un lien entre PR et mélanome ?

Le mélanome et la PR sont 2 pathologies cliniquement distinctes, de pronostic bien différent. Cependant, elles ont en commun la présence de mutations de BRAF, et la présence d'auto-anticorps anti-B-Raf.

Il y a aurait un risque augmenté de mélanome au cours des PR traitées par anti-TNF α . Dans la PR, le risque de cancer et en particulier celui de la peau est augmenté par rapport à la population générale. L'incidence des tumeurs malignes dans la PR varie entre 3,8 et 9,3/1000 selon les études.

Qu'en est-il du risque de mélanome en particulier ? Trois cohortes suédoises concernant plus de 60 000 PR suivies entre 1990 et 2003 ont analysé le risque de mélanome dans la PR, tout traitement confondu. Le risque de mélanome ne semble pas augmenté contrairement aux tumeurs cutanées non mélaniques (ratio standardisé d'incidence SIR=1,19, et SIR=1,66)(Askling *et al.*, 2005). Deux études prospectives montrent un risque relatif augmenté de mélanome au cours des traitements par anti-TNF α (SIR=2,3 et 1,7) (Mariette *et al.*, 2011). Il est difficile de dire si le sur-risque de mélanome est lié au traitement de la PR ou à la maladie.

3. Recherche de nouveaux auto-anticorps dans les PR débutantes

La PR est responsable de destructions articulaires qui peuvent apparaître dès les premiers mois de la maladie. Actuellement, il existe des traitements efficaces de la PR. Il est donc nécessaire de faire un diagnostic précoce afin de débiter un traitement dans les 3 mois.

Les ACPA sont positifs dans environ 70% des PR. Pour les PR débutantes, le taux d'ACPA selon les études est un peu plus faible (entre 50 et 68%). L'objectif de ce travail était d'identifier de nouveaux auto-anticorps associés aux PR débutantes.

Nous avons analysé des PR de moins de 12 mois d'évolution répondant aux critères ACR 2010. Nous avons comparé les auto-anticorps de 20 PR débutantes, 19 PR de plus de 5 ans d'évolution et 23 contrôles.

a) Quatre nouveaux auto-anticorps spécifiques des PR débutantes

En utilisant des puces à protéines contenant 8000 protéines humaines nous avons identifié 24 protéines reconnues par 30 à 60% des PR débutantes et moins de moins de 10% des contrôles. Ces 24 protéines ont été testées sur 68 PR débutantes (46 PR suivies à Marseille et 22 PR suivies à Besançon), 40 PR de plus de 5 ans d'évolution et 141 contrôles. Nous avons ainsi validées 4 protéines reconnues par 18% à 41% des PR débutantes et moins de 5% des contrôles et des PR de plus de 5 ans d'évolution (tableau 10).

La détection des auto-anticorps dirigés contre ces 4 protéines dans le diagnostic de la PR a donné lieu au dépôt d'un brevet en 2011 (EP 11305584.2. « Method for the diagnosis of early rheumatoid arthritis »).

	PR débutantes	PR plus de 5 ans	Total des contrôles	p vs groupes contrôles
GABARAPL2	18	0	2	$P < 10^{-4}$
ZNF706	25	5	1	$P < 10^{-7}$
TPM2	32	2,5	3	$P < 10^{-7}$
WIBG	41	5	0	$P < 10^{-7}$

Tableau 10 Pourcentage de sérum contenant des auto-anticorps dirigés contre les 4 protéines

Nous avons à l'heure actuelle peu d'information sur ces protéines. Elles sont localisées dans le noyau cellulaire pour la plupart et plusieurs interviennent dans la transcription de l'ADN.

GABARAPL2 (GABA(A) receptor associated protein like 2) est impliquée dans l'autophagie, processus par lequel des protéines sont capturées par des vésicules, acheminées vers les lysosomes pour y être dégradées.

ZNF706 (zinc finger protein 706) est une protéine qui se fixe sur l'ADN.

TPM2 (tropomyosin 2) est une protéine localisée dans les filaments d'actine, qui intervient dans la contraction musculaire.

WIBG (within BGCN homolog (Drosophila)) aussi appelée PYM est une ribonucleoprotéine associée aux EJC (exon jonction complexes)

WIBG intervient dans la dégradation des ARNm. La dégradation des ARNm non-sens est un mécanisme de contrôle qualité des ARN messagers chez les eucaryotes. Il vise à éliminer les ARNm qui comportent un codon stop prématuré, résultant soit d'une erreur de transcription, soit d'une mutation, soit encore d'une erreur d'épissage. Ceci permet d'éviter la production de protéines tronquées ou mutantes. Ce mécanisme a lieu dans le cytoplasme des eucaryotes.

WIBG se lie au complexe EJC par son extrémité N-terminale. Ce complexe, constitué d'une douzaine de protéines, accompagne les ARNm dans leur transport vers le cytoplasme. Durant ce transport, l'EJC communique avec diverses machineries cellulaires impliquées dans le transport nucléocytoplasmique, la traduction, la localisation et le contrôle qualité des ARNm. Il

a été montré que la surexpression de WIBG gêne l'interaction entre le complexe EJC et l'ARNm et inhibe la dégradation des ARNm non-sens. Dans les cellules déplétées en WIBG, le complexe EJC s'accumule sur l'ARNm (Gehring *et al.*, 2009).

L'implication de WIBG en pathologie humaine a été très peu décrite. WIBG a été incriminé dans le sarcome de Kaposi qui est une tumeur cutanée induite par le virus de HHV. In vitro, WIBG augmente la transcription des ARNm viraux défectueux sans intron (Boyne *et al.*, 2010).

Il apparaît que WIBG est la protéine la plus intéressante car elle est la plus spécifique des PR débutantes. Les auto-anticorps anti-WIBG sont les plus sensibles et très spécifiques des PR débutantes : 41% des PR débutantes ont des anti-WIBG, vs 5% des PR de plus de 5 ans d'évolution, et 0% des contrôles.

De plus WIBG est reconnue à la fois par les PR avec et sans anticorps anti-CCP. WIBG identifie 30% des PR sans anticorps anti-CCP vs 45% des PR avec anticorps anti-CCP. Il faut cependant noter que dans nos PR débutantes le taux d'ACPA est très élevé (76%) donc l'effectif des PR débutantes sans ACPA est faible ce qui limite l'interprétation des résultats (tableau 11).

Ces 4 protéines pourraient être utilisées dans le diagnostic de PR débutantes car 60% des sérums reconnaissent au moins une de ces protéines. Ces protéines sont très spécifiques des PR débutantes, elles sont présentes chez 0 à 5% des PR de plus de 5 ans d'évolution.

Nous avons donc mis en évidence des auto-anticorps qui seraient spécifiques de la phase de début de la maladie. Ces auto-anticorps pourraient être un outil diagnostique pour des PR débutantes dont les symptômes sont souvent discrets.

	PR DEBUTANTES (68)	PR > 5 ans (40)
AGE moyen (ans)	51	57
ACPA+	76%	85%
FR+	91%	81%
GENOTYPE HLA-DR		
0 EP	40%	27,5%
1 EP	47%	42,5%
2 EP	13%	30%
TRAITEMENT		
DMARDs SEUL	34%	50% (dont 42% mtx)
anti-TNF α	3%	47%

Tableau 11 Caractéristiques des PR débutantes et des PR de plus de 5 ans d'évolution

Peu d'équipes ont travaillé dans le domaine des auto-anticorps spécifiques de PR débutantes.

Somers a identifié 11 auto-anticorps spécifiques des PR débutantes (sensibilité de 2-13% et spécificité de 100%). Parmi ces auto-antigènes, 6 n'étaient pas connus jusque là: HLA-DQ, HLA-A, Fat mass and Obesity protein, Myosin Light Chain 6, Talin, Chromosome 1 Clon (Somers *et al.*, 2011a).

L'équipe de Goëb a travaillé sur 110 PR débutantes de moins de 6 mois d'évolution, non traitées. Ils ont identifié 6 auto-antigènes par gel bi-dimensionnel et séquençage:

- des enzymes impliquées dans la glycolyse : l'aldolase, l'alpha-enolase, la phosphoglycerate kinase 1 (PGK1)
- des molécules chaperonnes A2/B1, la calreticuline, heat shock protein (HSP60), BiP, la phosphoprotéine stress-induced 1
- des ribonucleoprotéines:

- les FUSE-P (far upstream element-binding protein P) 1 et 2 qui sont des proto-oncogènes.

Plusieurs de ces auto-antigènes sont citrullinés : l'aldolase, l'alpha-enolase, la PGK1, la calreticuline, HSP60 et les FUSE-BP (Goëb *et al.*, 2009).

b) Diminution des 4 auto-anticorps en fonction de l'évolution de la PR

Les auto-anticorps anti-WIBG sont présents chez 41% des PR débutantes, 12% des PR entre 1 et 5 ans d'évolution, et 5% des PR de plus de 5 ans d'évolution. Comment expliquer cette différence entre les groupes de PR ?

Soit ces auto-anticorps sont spécifiquement produits à la phase de début de la maladie, dans un contexte d'inflammation très aiguë caractérisant le début de la maladie.

Soit la diminution de ces auto-anticorps est liée aux traitements de la PR. En effet les PR débutantes sont beaucoup moins traitées que les PR "plus anciennes". Les PR débutantes reçoivent dans 34% des cas un DMARD seul, et dans 3% des cas une biothérapie. Les PR de plus de 5 ans d'évolution reçoivent pour 50% un DMARD seul et dans 50% des cas une biothérapie.

Dans la PR, le taux d'anticorps anti-CCP et surtout du FR peuvent être diminués au cours de certains traitements, parallèlement avec l'amélioration clinique du patient. Le FR diminue sous methotrexate et anti-TNF α (Alarcón *et al.*, 1990; Bobbio-Pallavicini *et al.*, 2004). La diminution des anticorps anti-CCP est moins consensuelle. Elle concerne surtout les PR débutantes (Bobbio-Pallavicini *et al.*, 2004).

Pour savoir si la diminution des auto-anticorps observée est liée à l'évolution naturelle de la maladie ou aux traitements instaurés, il faudrait disposer de sérum de patients PR non traités, de plus de 1 an d'évolution. Ceci est difficile à réaliser en Europe où les patients ont un diagnostic en moyenne au bout de 6 mois d'évolution (Machold *et al.*, 2002) et où il est conseillé de débiter un traitement dans les 3 mois d'évolution.

Enfin, le taux plus élevé d'auto-anticorps dans le groupe des PR débutantes peut s'expliquer par des caractéristiques intrinsèques de cette population. Il s'agit de PR atypiques. En effet le mode de sélection des PR débutantes est particulier. Les symptômes sont souvent plus discrets au début de la maladie. Dans les critères ACR 2010 on va accorder un poids plus important à la biologie

notamment à la présence des ACPA puisque ces PR ont des arthrites cliniquement peu sévères. Les PR anciennes ont souvent un tableau clinique plus classique avec des signes radiologiques typiques. Ceci reflète des données de la littérature selon lesquelles dans 2/3 des PR, les signes cliniques sont progressifs (Machold *et al.*, 2002).

Au total, pour savoir si ces auto-anticorps sont spécifiques de PR débutantes, ou sont seulement le reflet d'un profil particulier, il faut étudier l'évolution de ces auto-anticorps dans le groupe des PR débutantes au bout de 5 ans. Nous suivons le profil de ces auto-anticorps chez ces patients actuellement.

Conclusions et perspectives

Dans la PR il y a 2 éléments critiques : le génotype HLA-DR et les ACPA. Les allèles HLA-DR de prédisposition à la PR représentent le facteur génétique le plus important dans la PR. Les ACPA sont les auto-anticorps les plus spécifiques de la PR.

L'influence du génotype HLA-DR dans la production d'ACPA est mal expliquée. Dans notre premier travail nous avons confirmé que dans notre population marseillaise les allèles HLA-DR contribuent à la production d'ACPA, et nous avons montré que l'allèle HLA-DRB1*04:04 est l'allèle le plus associé à la production d'ACPA.

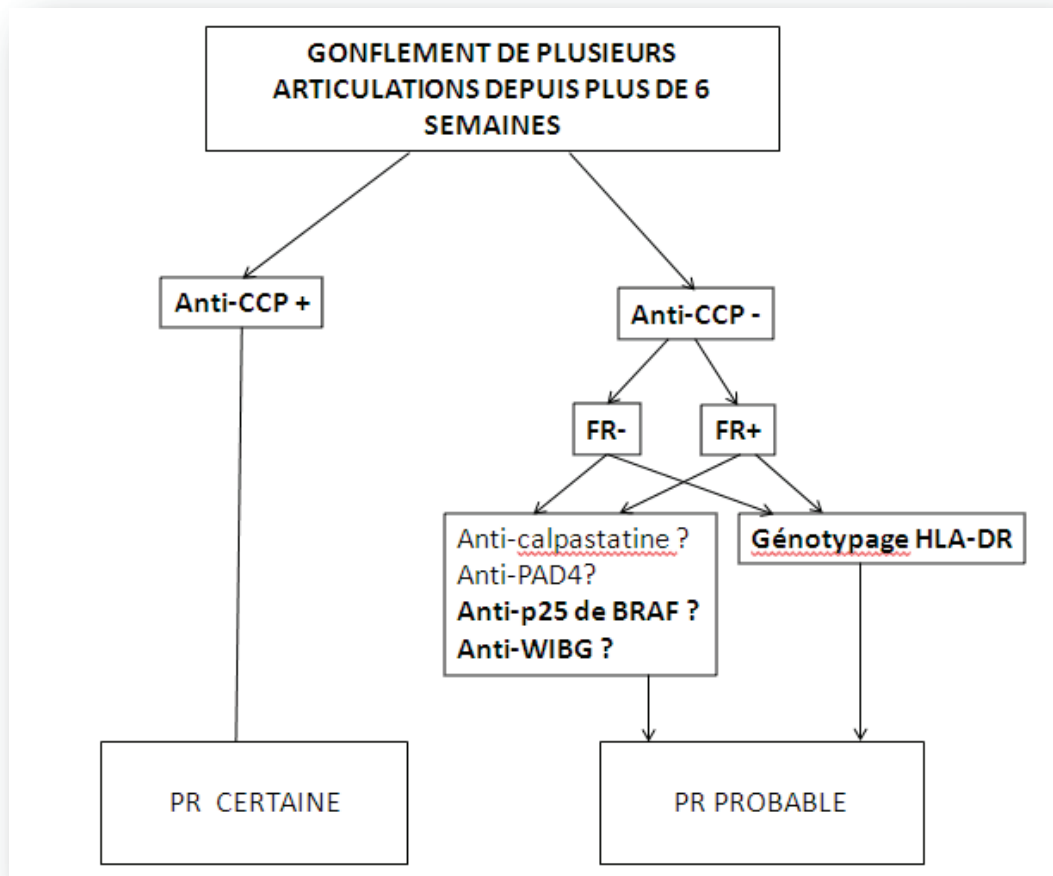
Le diagnostic de la PR reste difficile à poser dans 2 situations: la PR sans ACPA et la PR débutante.

Nous avons travaillé sur un nouvel auto-antigène de la PR identifié dans notre laboratoire : le domaine catalytique de B-Raf. Nous avons montré que le peptide p25 de B-Raf est spécifique de la PR et qu'il identifie 30% des PR sans ACPA. Nous avons montré que les auto-anticorps anti-B-Raf activent B-Raf. Les mutations de BRAF sont très fréquentes en cancérologie, notamment dans le mélanome. Nous allons maintenant rechercher les mutations de BRAF chez les patients qui ont des auto-anticorps anti-B-Raf.

Nous avons ensuite identifié 4 protéines spécifiques de PR débutantes, dont la protéine WIGB. La combinaison de ces 4 auto-antigènes identifie 60% des PR débutantes. Plusieurs travaux complémentaires sont en cours :

- La présence de ces auto-anticorps dans le sang des PR récentes va être monitorée pendant 5 ans.
- Nous allons étudier la présence de ces auto-anticorps dans une population plus importante de PR sans ACPA.
- Nous devons aussi préciser la cible épitopique de ces nouvelles protéines afin de pouvoir les utiliser dans le diagnostic des PR débutantes.

Voilà la proposition de démarche diagnostique pour une PR débutante que nous avons établi grâce aux nouveaux outils diagnostics identifiés.



Bibliographie

A

Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.-H., de Sauvage, F.J. & Gurney, A.L. (2003) Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 1910-1914.

Aho, K., Heliövaara, M., Maatela, J., Tuomi, T. & Palosuo, T. (1991) Rheumatoid factors antedating clinical rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 18, 1282-1284.

Aho, K., Kaipainen-Seppänen, O., Heliövaara, M. & Klaukka, T. (1998) Epidemiology of rheumatoid arthritis in Finland. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 27, 325-334.

Alarcón, G.S., Schrohenloher, R.E., Bartolucci, A.A., Ward, J.R., Williams, H.J. & Koopman, W.J. (1990) Suppression of rheumatoid factor production by methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. Evidence for differential influences of therapy and clinical status on IgM and IgA rheumatoid factor expression. *Arthritis and Rheumatism*, 33, 1156-1161.

al-Attia, H.M. & al-Amiri, N. (1995) HLA-B27 in healthy adults in UAE. An extremely low prevalence in Emirian Arabs. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 24, 225-227.

Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., 3rd, 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.W., Hobbs, K., Huizinga, T.W.J., Kavanaugh, A., Kay, J., et al. (2010) 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis and Rheumatism*, 62, 2569-2581.

Allaart, C.F., Goekoop-Ruiterman, Y.P.M., de Vries-Bouwstra, J.K., Breedveld, F.C. & Dijkmans, B.A.C. (2006) Aiming at low disease activity in rheumatoid arthritis with initial combination therapy or initial monotherapy strategies: the BeSt study. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 24, S-77-82.

Amari, W., Zeringue, A.L., McDonald, J.R., Caplan, L., Eisen, S.A. & Ranganathan, P. (2011) Risk of non-melanoma skin cancer in a national cohort of veterans with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*, 50, 1431-1439.

Amaria, R.N., Lewis, K.D. & Gonzalez, R. (2011) Therapeutic options in cutaneous melanoma: latest developments. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 3, 245-251.

Announ, N. & Guerne, P.A. (2007) [Calcium pyrophosphate dihydrate crystal induced arthropathy]. *Revue Médicale Suisse*, 3, 740-742, 744, 746.

Aoshiba, K., Tamaoki, J. & Nagai, A. (2001) Acute cigarette smoke exposure induces apoptosis of alveolar macrophages. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 281, L1392-1401.

Arita, K., Hashimoto, H., Shimizu, T., Nakashima, K., Yamada, M. & Sato, M. (2004) Structural basis for Ca²⁺-induced activation of human PAD4. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11, 777-783.

Arnett, F.C., Edworthy, S.M., Bloch, D.A., McShane, D.J., Fries, J.F., Cooper, N.S., Healey, L.A., Kaplan, S.R., Liang, M.H. & Luthra, H.S. (1988) The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 31, 315-324.

Asking, J., Fored, C.M., Brandt, L., Baecklund, E., Bertilsson, L., Feltelius, N., Cöster, L., Geborek, P., Jacobsson, L.T., Lindblad, S., Lysholm, J., Rantapää-Dahlqvist, S., Saxne, T. & Klareskog, L. (2005) Risks of solid cancers in patients with rheumatoid arthritis and after treatment with tumour necrosis factor antagonists. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64, 1421-1426.

Auger, I., Balandraud, N., Rak, J., Lambert, N., Martin, M. & Roudier, J. (2009) New autoantigens in rheumatoid arthritis (RA): screening 8268 protein arrays with sera from patients with RA. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 68, 591-594.

Auger, I., Martin, M., Balandraud, N. & Roudier, J. (2010) Rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to peptidyl arginine deiminase type 4 inhibit citrullination of fibrinogen. *Arthritis and Rheumatism*, 62, 126-131.

Auger, I., Roudier, C., Guis, S., Balandraud, N. & Roudier, J. (2007a) HLA-DRB1*0404 is strongly associated with anticalpastatin antibodies in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 66, 1588-1593.

Auger, I., Sebbag, M., Vincent, C., Balandraud, N., Guis, S., Nogueira, L., Svensson, B., Cantagrel, A., Serre, G. & Roudier, J. (2005a) Influence of HLA-DR genes on the production of rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated fibrinogen. *Arthritis and Rheumatism*, 52, 3424-3432.

Augustsson, J., Neovius, M., Cullinane-Carli, C., Eksborg, S. & van Vollenhoven, R.F. (2010) Patients with rheumatoid arthritis treated with tumour necrosis factor antagonists increase their participation in the workforce: potential for significant long-term indirect cost gains (data from a population-based registry). *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69, 126-131.

Avouac, J. (2005) Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 65, 845-851.

B

Baka, Z., Buzás, E. & Nagy, G. (2009) Rheumatoid arthritis and smoking: putting the pieces together. *Arthritis research & therapy*, 11, 238.

Balandraud, N., Meynard, J.B., Auger, I., Sovran, H., Mugnier, B., Reviron, D., Roudier, J. & Roudier, C. (2003) Epstein-Barr virus load in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis: Accurate quantification using real-time polymerase chain reaction. *Arthritis & Rheumatism*, 48, 1223-1228.

Bartfeld, H. (1969) Distribution of rheumatoid factor activity in nonrheumatoid states. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 168, 30-40.

Bas, S., Perneger, T.V., Mikhnevitch, E., Seitz, M., Tiercy, J.M., Roux-Lombard, P. & Guerne, P.A. (2000) Association of rheumatoid factors and anti-filaggrin antibodies with severity of erosions in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*, 39, 1082-1088.

Becker, M.A. & Ruoff, G.E. (2010) What do I need to know about gout? *The Journal of Family Practice*, 59, S1-8.

Begovich, A.B., Carlton, V.E., Honigberg, L.A., Schrodi, S.J., Chokkalingam, A.P., Alexander, H.C., Ardlie, K.G., Huang, Q., Smith, A.M., Spoerke, J.M. & others (2004) A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *The American Journal of Human Genetics*, 75, 330–337.

Bettelli, E., Korn, T. & Kuchroo, V.K. (2007) Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Current Opinion in Immunology*, 19, 652-657.

Bischof, N.A., Welch, T.R., Beischel, L.S., Carson, D. & Donnelly, P.A. (1993) DP polymorphism in HLA-A1,-B8,-DR3 extended haplotypes associated with membranoproliferative glomerulonephritis and systemic lupus erythematosus. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, 7, 243-246.

Bizzaro, N., Mazzanti, G., Tonutti, E., Villalta, D. & Tozzoli, R. (2001) Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis. *Clinical Chemistry*, 47, 1089-1093.

Bobbio-Pallavicini, F., Alpini, C., Caporali, R., Avalle, S., Bugatti, S. & Montecucco, C. (2004) Autoantibody profile in rheumatoid arthritis during long-term infliximab treatment. *Arthritis Research & Therapy*, 6, R264-272.

Bonner, T.I., Oppermann, H., Seeburg, P., Kerby, S.B., Gunnell, M.A., Young, A.C. & Rapp, U.R. (1986) The complete coding sequence of the human raf oncogene and the corresponding structure of the c-raf-1 gene. *Nucleic Acids Research*, 14, 1009-1015.

Bos, W.H., Bartelds, G.M., Wolbink, G.J., de Koning, M.H.M.T., van de Stadt, R.J., van Schaardenburg, D., Dijkmans, B.A.C. & Nurmohamed, M.T. (2008) Differential response of the rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies during adalimumab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 35, 1972-1977.

Boutry, N., Morel, M., Flipo, R.-M., Demondion, X. & Cotten, A. (2007) Early Rheumatoid Arthritis: A Review of MRI and Sonographic Findings. *American Journal of Roentgenology*, 189, 1502-1509.

Bowes, J. & Barton, A. (2008) Recent advances in the genetics of RA susceptibility. *Rheumatology (Oxford, England)*, 47, 399-402.

Boyne, J.R., Jackson, B.R., Taylor, A., Macnab, S.A. & Whitehouse, A. (2010) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 protein interacts with PYM to enhance translation of viral intronless mRNAs. *The EMBO Journal*, 29, 1851-1864.

Brahee, D.D., Pierre-Jerome, C. & Kettner, N.W. (2003) Clinical and radiological manifestations of the rheumatoid wrist. A comprehensive review. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*, 26, 323-329.

Braun, J., Bollow, M., Remlinger, G., Eggens, U., Rudwaleit, M., Distler, A. & Sieper, J. (1998) Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. *Arthritis and Rheumatism*, 41, 58-67.

Bresnihan, B. (2003) Are synovial biopsies of diagnostic value? *Arthritis Research & Therapy*, 5, 271-278.

Burr, M.L., Naseem, H., Hinks, A., Eyre, S., Gibbons, L.J., Bowes, J., Wilson, A.G., Maxwell, J., Morgan, A.W., Emery, P., Steer, S., Hocking, L., Reid, D.M., Wordsworth, P., Harrison, P., Thomson, W., Worthington, J. & Barton, A. (2010) PADI4 genotype is not associated with rheumatoid arthritis in a large UK Caucasian population. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69, 666-670.

C

Cader, M.Z., Filer, A., Hazlehurst, J., de Pablo, P., Buckley, C.D. & Raza, K. (2011) Performance of the 2010 ACR/EULAR criteria for rheumatoid arthritis: comparison with 1987 ACR criteria in a very early synovitis cohort. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70, 949-955.

Calipel, A., Lefevre, G., Pouponnot, C., Mouriaux, F., Eychène, A. & Mascarelli, F. (2003) Mutation of B-Raf in human choroidal melanoma cells mediates cell proliferation and

transformation through the MEK/ERK pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 42409-42418.

Carbonell, J., Cobo, T., Balsa, A., Descalzo, M.Á. & Carmona, L. (2008) The incidence of rheumatoid arthritis in Spain: results from a nationwide primary care registry. *Rheumatology*, 47, 1088.

Caruso, I., Santandrea, S., Sarzi Puttini, P., Boccassini, L., Montrone, F., Cazzola, M., Azzolini, V. & Segre, D. (1990) Clinical, laboratory and radiographic features in early rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 17, 1263-1267.

Cavazzana, I., Bobbio-Pallavicini, F., Franceschini, F., Bazzani, C., Ceribelli, A., Bravi, E., Zingarelli, S., Caporali, R., Cattaneo, R. & Montecucco, C.M. (2007) Anti-TNF-alpha treatment in rheumatoid arthritis with anti-Ro/SSA antibodies. Analysis of 17 cases among a cohort of 322 treated patients. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 25, 676-683.

Chang, M., Rowland, C.M., Garcia, V.E., Schrodi, S.J., Catanese, J.J., van der Helm-van Mil, A.H.M., Ardlie, K.G., Amos, C.I., Criswell, L.A., Kastner, D.L., Gregersen, P.K., Kurreeman, F.A.S., Toes, R.E.M., Huizinga, T.W.J., Seldin, M.F. & Begovich, A.B. (2008) A large-scale rheumatoid arthritis genetic study identifies association at chromosome 9q33.2. *PLoS Genetics*, 4, e1000107.

Chavanas, S., Méchin, M.-C., Takahara, H., Kawada, A., Nachat, R., Serre, G. & Simon, M. (2004) Comparative analysis of the mouse and human peptidylarginine deiminase gene clusters reveals highly conserved non-coding segments and a new human gene, PADI6. *Gene*, 330, 19-27.

Chen, H.A., Lin, K.C., Chen, C.H., Liao, H.T., Wang, H.P., Chang, H.N., Tsai, C.Y. & Chou, C.T. (2006) The effect of etanercept on anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 65, 35-39.

Choi, H.K., Hernán, M.A., Seeger, J.D., Robins, J.M. & Wolfe, F. (2002) Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *Lancet*, 359, 1173-1177.

Ciampi, R. & Nikiforov, Y.E. (2005) Alterations of the BRAF gene in thyroid tumors. *Endocrine Pathology*, 16, 163-172.

Clague, R.B. & Moore, L.J. (1984) IgG and IgM antibody to native type II collagen in rheumatoid arthritis serum and synovial fluid. Evidence for the presence of collagen-anticollagen immune complexes in synovial fluid. *Arthritis and Rheumatism*, 27, 1370-1377.

Clague, R.B., Shaw, M.J. & Holt, P.J. (1980) Incidence of serum antibodies to native type I and type II collagens in patients with inflammatory arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 39, 201-206.

Clark, J. (2005) What does tumour necrosis factor excess do to the immune system long term? *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64, iv70-iv76.

Combe, B., Benessiano, J., Berenbaum, F., Cantagrel, A., Daurès, J.-P., Dougados, M., Fardellone, P., Fautrel, B., Flipo, R.-M., Goupille, P., Guillemin, F., Le Loet, X., Logeart, I., Mariette, X., Meyer, O., Ravaud, P., Rincheval, N., Saraux, A., Schaeffer, T. & Sibilia, J. (2007) The ESPOIR cohort: a ten-year follow-up of early arthritis in France: methodology and baseline characteristics of the 813 included patients. *Joint, Bone, Spine: Revue Du Rhumatisme*, 74, 440-445.

Cook, A.D., Rowley, M.J., Wines, B.D. & Mackay, I.R. (1994) Antibodies to the collagen-like region of C1q and type II collagen are independent non-cross-reactive populations in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity*, 7, 369-378.

Crews, C.M. & Erikson, R.L. (1993) Extracellular signals and reversible protein phosphorylation: what to Mek of it all. *Cell*, 74, 215-217.

Cuchacovich, M., Catalan, D., Wainstein, E., Gatica, H., Soto, L., Aravena, O., Pesce, B., Sabugo, F. & Aguillón, J.C. (2008) Basal anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibody levels and a decrease in anti-CCP titres are associated with clinical response to adalimumab in rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 26, 1067-1073.

D

Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., et al. (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417, 949-954.

Dayer, J.M. (2003) The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 42, ii3.

Dejaco, C., Klotz, W., Larcher, H., Duftner, C., Schirmer, M. & Herold, M. (2006) Diagnostic value of antibodies against a modified citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 8, R119.

Després, N., Boire, G., Lopez-Longo, F.J. & Ménard, H.A. (1994) The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 21, 1027-1033.

Dieudé, P. & Cornélis, F. (2005) Genetic basis of rheumatoid arthritis. *Joint, Bone, Spine: Revue Du Rhumatisme*, 72, 520-526.

Dolhain, R.J., van der Heiden, A.N., ter Haar, N.T., Breedveld, F.C. & Miltenburg, A.M. (1996) Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 39, 1961-1969.

Dong, H., Strome, S.E., Matteson, E.L., Moder, K.G., Flies, D.B., Zhu, G., Tamura, H., Driscoll, C.L.W. & Chen, L. (2003) Costimulating aberrant T cell responses by B7-H1 autoantibodies in rheumatoid arthritis. *The Journal of Clinical Investigation*, 111, 363-370.

E

Edwards, J.C.W., Szczepanski, L., Szechinski, J., Filipowicz-Sosnowska, A., Emery, P., Close, D.R., Stevens, R.M. & Shaw, T. (2004) Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *The New England Journal of Medicine*, 350, 2572-2581.

Egeland, T. & Munthe, E. (1983) The role of the laboratory in rheumatology. Rheumatoid factors. *Clinics in Rheumatic Diseases*, 9, 135-160.

El Maghraoui, A., Rezqi, A., Mounach, A., Achemlal, L., Bezza, A. & Ghozani, I. (2010) Prevalence and risk factors of vertebral fractures in women with rheumatoid arthritis using vertebral fracture assessment. *Rheumatology (Oxford, England)*, 49, 1303-1310.

F

Fensterle, J., Becker, J.C., Potapenko, T., Heimbach, V., Vetter, C.S., Bröcker, E.B. & Rapp, U.R. (2004) B-Raf specific antibody responses in melanoma patients. *BMC Cancer*, 4, 62.

Ferucci, E.D., Templin, D.W. & Lanier, A.P. (2005) Rheumatoid arthritis in American Indians and Alaska Natives: a review of the literature. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 34, 662-667.

Firestein, G.S. (1996) Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis and Rheumatism*, 39, 1781-1790.

Foley-Nolan, D., Stack, J.P., Ryan, M., Redmond, U., Barry, C., Ennis, J. & Coughlan, R.J. (1991) Magnetic resonance imaging in the assessment of rheumatoid arthritis--a comparison with plain film radiographs. *British Journal of Rheumatology*, 30, 101-106.

Foulquier, C., Sebbag, M., Clavel, C., Chapuy-Regaud, S., Al Badine, R., Méchin, M.-C., Vincent, C., Nachat, R., Yamada, M., Takahara, H., Simon, M., Guerrin, M. & Serre, G. (2007) Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. *Arthritis and Rheumatism*, 56, 3541-3553.

Furuya, T., Hakoda, M., Ichikawa, N., Higami, K., Nanke, Y., Yago, T., Kobashigawa, T., Tokunaga, K., Tsuchiya, N., Kamatani, N. & Kotake, S. (2007) Differential association of HLA-

DRB1 alleles in Japanese patients with early rheumatoid arthritis in relationship to autoantibodies to cyclic citrullinated peptide. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 25, 219-224.

G

van Gaalen, F.A., van Aken, J., Huizinga, T.W.J., Schreuder, G.M.T., Breedveld, F.C., Zanelli, E., van Venrooij, W.J., Verweij, C.L., Toes, R.E.M. & de Vries, R.R.P. (2004) Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 50, 2113-2121.

Gabriel, S.E., Crowson, C.S. & O'Fallon, W.M. (1999) The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, 1955-1985. *Arthritis and Rheumatism*, 42, 415-420.

Gehring, N.H., Lamprinaki, S., Kulozik, A.E. & Hentze, M.W. (2009) Disassembly of exon junction complexes by PYM. *Cell*, 137, 536-548.

Girbal-Neuhausser, E., Durieux, J.J., Arnaud, M., Dalbon, P., Sebbag, M., Vincent, C., Simon, M., Senshu, T., Masson-Bessière, C., Jolivet-Reynaud, C., Jolivet, M. & Serre, G. (1999) The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 162, 585-594.

Goëb, V., Thomas-L'Otelier, M., Daveau, R., Charlionet, R., Fardellone, P., Le Loët, X., Tron, F., Gilbert, D. & Vittecoq, O. (2009) Candidate autoantigens identified by mass spectrometry in early rheumatoid arthritis are chaperones and citrullinated glycolytic enzymes. *Arthritis Research & Therapy*, 11, R38.

Goldbach-Mansky, R., Lee, J., McCoy, A., Hoxworth, J., Yarboro, C., Smolen, J.S., Steiner, G., Rosen, A., Zhang, C., Ménard, H.A., Zhou, Z.J., Palosuo, T., Van Venrooij, W.J., Wilder, R.L., Klippel, J.H., Schumacher, H.R., Jr & El-Gabalawy, H.S. (2000) Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Research*, 2, 236-243.

Greenberg, J.D., Kremer, J.M., Curtis, J.R., Hochberg, M.C., Reed, G., Tsao, P., Farkouh, M.E., Nasir, A., Setoguchi, S. & Solomon, D.H. (2011) Tumour necrosis factor antagonist use and associated risk reduction of cardiovascular events among patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70, 576-582.

Gregersen, P.K., Silver, J. & Winchester, R.J. (1987) The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 30, 1205-1213.

Guillemin, F., Saraux, A., Guggenbuhl, P., Roux, C.H., Fardellone, P., Le Bihan, E., Cantagrel, A., Chary-Valckenaere, I., Euller-Ziegler, L., Flipo, R.-M., Juvin, R., Behier, J.-M., Fautrel, B.,

Masson, C. & Coste, J. (2005) Prevalence of rheumatoid arthritis in France: 2001. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64, 1427-1430.

Guzian, M.-C., Carrier, N., Cossette, P., de Brum-Fernandes, A.J., Liang, P., Ménard, H.-A. & Boire, G. (2010) Outcomes in recent-onset inflammatory polyarthritis differ according to initial titers, persistence over time, and specificity of the autoantibodies. *Arthritis Care & Research*, 62, 1624-1632.

H

Halla, J.T., Hardin, J.G. & Fallahi, S. (1987) The nature of the onset of rheumatoid arthritis: a reassessment. *Rheumatology International*, 7, 169-171.

Halvorsen, E.H., Pollmann, S., Gilboe, I.-M., van der Heijde, D., Landewé, R., Ødegård, S., Kvien, T.K. & Molberg, Ø. (2008) Serum IgG antibodies to peptidylarginine deiminase 4 in rheumatoid arthritis and associations with disease severity. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 67, 414-417.

Harrison, B. & Symmons, D. (2000) Early inflammatory polyarthritis: results from the Norfolk Arthritis Register with a review of the literature. II. Outcome at three years. *Rheumatology (Oxford, England)*, 39, 939-949.

Hassfeld, W., Steiner, G., Graninger, W., Witzmann, G., Schweitzer, H. & Smolen, J.S. (1993) Autoantibody to the nuclear antigen RA33: a marker for early rheumatoid arthritis. *British Journal of Rheumatology*, 32, 199-203.

Hazes, J.M.W. & Luime, J.J. (2011) The epidemiology of early inflammatory arthritis. *Nature Reviews. Rheumatology*, 7, 381-390.

van der Helm-van Mil, A.H.M., Verpoort, K.N., Breedveld, F.C., Toes, R.E.M. & Huizinga, T.W.J. (2005) Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 7, R949-958.

van der Helm-van Mil, A.H.M., Verpoort, K.N., le Cessie, S., Huizinga, T.W.J., de Vries, R.R.P. & Toes, R.E.M. (2007) The HLA-DRB1 shared epitope alleles differ in the interaction with smoking and predisposition to antibodies to cyclic citrullinated peptide. *Arthritis and Rheumatism*, 56, 425-432.

Hernández-Cruz, B., García-Arias, M., Ariza Ariza, R. & Martín Mola, E. (2011) [Rituximab in rheumatoid arthritis: a systematic review of efficacy and safety]. *Reumatología Clínica*, 7, 314-322.

Hill, J.A., Southwood, S., Sette, A., Jevnikar, A.M., Bell, D.A. & Cairns, E. (2003) Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the

rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 171, 538-541.

Hitchon, C.A., Chandad, F., Ferucci, E.D., Willemze, A., Ioan-Facsinay, A., van der Woude, D., Markland, J., Robinson, D., Elias, B., Newkirk, M., Toes, R.M., Huizinga, T.W.J. & El-Gabalawy, H.S. (2010) Antibodies to porphyromonas gingivalis are associated with anticitrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis and their relatives. *The Journal of Rheumatology*, 37, 1105-1112.

Hmitou, I., Druillennec, S., Valluet, A., Peyssonnaud, C. & Eychène, A. (2007) Differential regulation of B-raf isoforms by phosphorylation and autoinhibitory mechanisms. *Molecular and Cellular Biology*, 27, 31-43.

Hughes, L.B., Morrison, D., Kelley, J.M., Padilla, M.A., Vaughan, L.K., Westfall, A.O., Dwivedi, H., Mikuls, T.R., Holers, V.M., Parrish, L.A., Alarcón, G.S., Conn, D.L., Jonas, B.L., Callahan, L.F., Smith, E.A., Gilkeson, G.S., Howard, G., Moreland, L.W., Patterson, N., Reich, D., et al. (2008) The HLA-DRB1 shared epitope is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in African Americans through European genetic admixture. *Arthritis & Rheumatism*, 58, 349-358.

Huizinga, T.W.J., Amos, C.I., van der Helm-van Mil, A.H.M., Chen, W., van Gaalen, F.A., Jawaheer, D., Schreuder, G.M.T., Wener, M., Breedveld, F.C., Ahmad, N., Lum, R.F., de Vries, R.R.P., Gregersen, P.K., Toes, R.E.M. & Criswell, L.A. (2005a) Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis and Rheumatism*, 52, 3433-3438.

I

Ikawa, S., Fukui, M., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Yamamoto, T. & Toyoshima, K. (1988) B-raf, a new member of the raf family, is activated by DNA rearrangement. *Molecular and Cellular Biology*, 8, 2651-2654.

Imboden, J.B. (2009) The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annual Review of Pathology*, 4, 417-434.

Inanc, N., Dalkilic, E., Kamali, S., Kasapoglu-Günel, E., Elbir, Y., Direskeneli, H. & Inanc, M. (2007) Anti-CCP antibodies in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. *Clinical Rheumatology*, 26, 17-23.

Inoue, N., Harada, S., Miyasaka, N., Oya, A. & Yanagi, K. (1991) Analysis of antibody titers to Epstein-Barr virus nuclear antigens in sera of patients with Sjögren's syndrome and with rheumatoid arthritis. *The Journal of Infectious Diseases*, 164, 22-28.

Irigoyen, P., Lee, A.T., Wener, M.H., Li, W., Kern, M., Batliwalla, F., Lum, R.F., Massarotti, E., Weisman, M., Bombardier, C., Remmers, E.F., Kastner, D.L., Seldin, M.F., Criswell, L.A. &

Gregersen, P.K. (2005) Regulation of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis: contrasting effects of HLA-DR3 and the shared epitope alleles. *Arthritis and Rheumatism*, 52, 3813-3818.

J

Jacobson, C.C., Kumar, S. & Kimball, A.B. (2011) Latitude and psoriasis prevalence. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 65, 870-873.

Jawaheer, D., Thomson, W., MacGregor, A.J., Carthy, D., Davidson, J., Dyer, P.A., Silman, A.J. & Ollier, W.E. (1994) « Homozygosity » for the HLA-DR shared epitope contributes the highest risk for rheumatoid arthritis concordance in identical twins. *Arthritis and Rheumatism*, 37, 681-686.

Jouen, F., Vittecoq, O., Leguillou, F., Tabti-Titon, I., Menard, J.F., Mejjad, O., Pouplin, S., Boumier, P., Fardellone, P., Gayet, A., Gilbert, D., Tron, F. & Le Loët, X. (2004) Diagnostic and prognostic values of anti glucose-6-phosphate isomerase antibodies in community-recruited patients with very early arthritis. *Clinical and Experimental Immunology*, 137, 606-611.

K

Källberg, H., Ding, B., Padyukov, L., Bengtsson, C., Rönnelid, J., Klareskog, L. & Alfredsson, L. (2011) Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: estimations of risks after various exposures to cigarette smoke. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70, 508-511.

Keane, J., Gershon, S., Wise, R.P., Mirabile-Levens, E., Kasznica, J., Schwieterman, W.D., Siegel, J.N. & Braun, M.M. (2001) Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *The New England Journal of Medicine*, 345, 1098-1104.

Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslaris, E., Kioussis, D. & Kollias, G. (1991) Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *The EMBO Journal*, 10, 4025.

Kerwar, S.S. & Oronsky, A.L. (1988) Passive collagen arthritis induced by anticollagen IgG. *International Reviews of Immunology*, 4, 17-23.

Kinne, R.W., Brauer, R., Stuhlmüller, B., Palombo-Kinne, E., Burmester, G.R. & others (2000) Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis research*, 2, 189–202.

Klaasen, R., Cantaert, T., Wijbrandts, C.A., Teitsma, C., Gerlag, D.M., Out, T.A., de Nooijer, M.J., Baeten, D. & Tak, P.P. (2011) The value of rheumatoid factor and anti-citrullinated protein antibodies as predictors of response to infliximab in rheumatoid arthritis: an exploratory study. *Rheumatology (Oxford, England)*, 50, 1487-1493.

Klareskog, L., Stolt, P., Lundberg, K., Källberg, H., Bengtsson, C., Grunewald, J., Rönnelid, J., Harris, H.E., Ulfgrén, A.-K., Rantapää-Dahlqvist, S., Eklund, A., Padyukov, L. & Alfredsson, L. (2006) A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis and Rheumatism*, 54, 38-46.

Korganow, A.S., Ji, H., Mangialaio, S., Duchatelle, V., Pelanda, R., Martin, T., Degott, C., Kikutani, H., Rajewsky, K., Pasquali, J.L., Benoist, C. & Mathis, D. (1999) From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity*, 10, 451-461.

Kosta, P.E., Voulgari, P.V., Zikou, A.K., Drosos, A.A. & Argyropoulou, M.I. (2011) The usefulness of magnetic resonance imaging of the hand and wrist in very early rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 13, R84.

Kouskoff, V., Korganow, A.S., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C. & Mathis, D. (1996) Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell*, 87, 811-822.

Kudo-Tanaka, E., Ohshima, S., Ishii, M., Mima, T., Matsushita, M., Azuma, N., Harada, Y., Katada, Y., Ikeue, H., Umeshita-Sasai, M., Miyatake, K. & Saeki, Y. (2007) Autoantibodies to cyclic citrullinated peptide 2 (CCP2) are superior to other potential diagnostic biomarkers for predicting rheumatoid arthritis in early undifferentiated arthritis. *Clinical Rheumatology*, 26, 1627-1633.

Kurreeman, F.A.S., Padyukov, L., Marques, R.B., Schrodi, S.J., Seddighzadeh, M., Stoeken-Rijsbergen, G., van der Helm-van Mil, A.H.M., Allaart, C.F., Verduyn, W., Houwing-Duistermaat, J., Alfredsson, L., Begovich, A.B., Klareskog, L., Huizinga, T.W.J. & Toes, R.E.M. (2007) A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. *PLoS Medicine*, 4, e278.

Kvien, T.K., Glennås, A., Knudsrød, O.G., Smedstad, L.M., Mowinckel, P. & Førre, O. (1997) The prevalence and severity of rheumatoid arthritis in Oslo. Results from a county register and a population survey. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 26, 412-418.

L

Landmann, T., Kehl, G. & Bergner, R. (2010) The continuous measurement of anti-CCP-antibodies does not help to evaluate the disease activity in anti-CCP-antibody-positive patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*, 29, 1449-1453.

Lawrence, R.C., Helmick, C.G., Arnett, F.C., Deyo, R.A., Felson, D.T., Giannini, E.H., Heyse, S.P., Hirsch, R., Hochberg, M.C., Hunder, G.G., Liang, M.H., Pillemer, S.R., Steen, V.D. & Wolfe, F. (1998) Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis and Rheumatism*, 41, 778-799.

Lee, H.-S., Remmers, E.F., Le, J.M., Kastner, D.L., Bae, S.-C. & Gregersen, P.K. (2007) Association of STAT4 with rheumatoid arthritis in the Korean population. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 13, 455-460.

Lee, Y.H., Bae, S.-C., Choi, S.J., Ji, J.D. & Song, G.G. (2011) The association between the PTPN22 C1858T polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis update. *Molecular Biology Reports* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21706348> [Consulté octobre 16, 2011].

Ligeiro, D., Fonseca, J.E., Abade, O., Abreu, I., Cruz, M., Nero, P., Cavaleiro, J., Teles, J., Trindade, H., Caetano, J.M. & Branco, J. (2007) Influence of human leucocyte antigen-DRB1 on the susceptibility to rheumatoid arthritis and on the production of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in a Portuguese population. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 66, 246-248.

van der Linden, M.P.M., van der Woude, D., Ioan-Facsinay, A., Levarht, E.W.N., Stoeken-Rijsbergen, G., Huizinga, T.W.J., Toes, R.E.M. & van der Helm-van Mil, A.H.M. (2009) Value of anti-modified citrullinated vimentin and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide compared with second-generation anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in predicting disease outcome in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 60, 2232-2241.

Linn-Rasker, S.P. (2006) Smoking is a risk factor for anti-CCP antibodies only in rheumatoid arthritis patients who carry HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 65, 366-371.

Lunt, M., Symmons, D.P.M. & Silman, A.J. (2005) An evaluation of the decision tree format of the American College of Rheumatology 1987 classification criteria for rheumatoid arthritis: performance over five years in a primary care-based prospective study. *Arthritis and Rheumatism*, 52, 2277-2283.

Lutteri, L., Malaise, M. & Chapelle, J.-P. (2007) Comparison of second- and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide antibodies assays for detecting rheumatoid arthritis. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 386, 76-81.

Lutzky, V., Hannawi, S. & Thomas, R. (2007) Dendritic cells. *Arthritis Research and Therapy*, 9, 219.

M

Ma, M.H.Y., Scott, I.C., Kingsley, G.H. & Scott, D.L. (2010) Remission in early rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 37, 1444-1453.

Machado, P., Castrejon, I., Katchamart, W., Koevoets, R., Kuriya, B., Schoels, M., Silva-Fernández, L., Thevissen, K., Vercoetere, W., Villeneuve, E., Aletaha, D., Carmona, L.,

Landewé, R., van der Heijde, D., Bijlsma, J.W.J., Bykerk, V., Canhã, H., Catrina, A.I., Durez, P., Edwards, C.J., et al. (2011a) Multinational evidence-based recommendations on how to investigate and follow-up undifferentiated peripheral inflammatory arthritis: integrating systematic literature research and expert opinion of a broad international panel of rheumatologists in the 3E Initiative. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70, 15-24.

Machado, P.M.M.C., Koevoets, R., Bombardier, C. & van der Heijde, D.M. (2011b) The value of magnetic resonance imaging and ultrasound in undifferentiated arthritis: a systematic review. *The Journal of Rheumatology. Supplement*, 87, 31-37.

Machold, K.P., Stamm, T.A., Eberl, G.J.M., Nell, V.K.P., Dunky, A., Uffmann, M. & Smolen, J.S. (2002) Very recent onset arthritis--clinical, laboratory, and radiological findings during the first year of disease. *The Journal of Rheumatology*, 29, 2278-2287.

Mackie, S.L., Taylor, J.C., Martin, S.G., Wordsworth, P., Steer, S., Wilson, A.G., Worthington, J., Emery, P., Barrett, J.H. & Morgan, A.W. (2011) A spectrum of susceptibility to rheumatoid arthritis within HLA-DRB1: stratification by autoantibody status in a large UK population. *Genes and Immunity* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21881596> [Consulté novembre 4, 2011].

Magnuson, N.S., Beck, T., Vahidi, H., Hahn, H., Smola, U. & Rapp, U.R. (1994) The Raf-1 serine/threonine protein kinase. *Seminars in Cancer Biology*, 5, 247-253.

Makrygiannakis, D., Hermansson, M., Ulfgren, A.-K., Nicholas, A.P., Zendman, A.J.W., Eklund, A., Grunewald, J., Skold, C.M., Klareskog, L. & Catrina, A.I. (2008) Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 67, 1488-1492.

Manzi, S. (2009) Lupus update: perspective and clinical pearls. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 76, 137-142.

Mariette, X., Matucci-Cerinic, M., Pavelka, K., Taylor, P., van Vollenhoven, R., Heatley, R., Walsh, C., Lawson, R., Reynolds, A. & Emery, P. (2011) Malignancies associated with tumour necrosis factor inhibitors in registries and prospective observational studies: a systematic review and meta-analysis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70, 1895-1904.

Marsh, S.G.E., Albert, E.D., Bodmer, W.F., Bontrop, R.E., Dupont, B., Erlich, H.A., Fernández-Viña, M., Geraghty, D.E., Holdsworth, R., Hurley, C.K., Lau, M., Lee, K.W., Mach, B., Maiers, M., Mayr, W.R., Müller, C.R., Parham, P., Petersdorf, E.W., Sasazuki, T., Strominger, J.L., et al. (2010) An update to HLA nomenclature, 2010. *Bone Marrow Transplantation*, 45, 846-848.

Marx, M., Eychène, A., Laugier, D., Béchade, C., Crisanti, P., Dezélee, P., Pessac, B. & Calothy, G. (1988) A novel oncogene related to c-mil is transduced in chicken neuroretina cells induced to proliferate by infection with an avian lymphomatosis virus. *The EMBO Journal*, 7, 3369-3373.

Masdottir, B., Jónsson, T., Manfredsdottir, V., Víkingsson, A., Brekkan, A. & Valdimarsson, H. (2000) Smoking, rheumatoid factor isotypes and severity of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*, 39, 1202-1205.

Mason, C.S., Springer, C.J., Cooper, R.G., Superti-Furga, G., Marshall, C.J. & Marais, R. (1999) Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *The EMBO Journal*, 18, 2137-2148.

Masson-Bessière, C., Sebbag, M., Durieux, J.J., Nogueira, L., Vincent, C., Girbal-Neuhauser, E., Durroux, R., Cantagrel, A. & Serre, G. (2000) In the rheumatoid pannus, anti-filaggrin autoantibodies are produced by local plasma cells and constitute a higher proportion of IgG than in synovial fluid and serum. *Clinical and Experimental Immunology*, 119, 544-552.

Masson-Bessière, C., Sebbag, M., Girbal-Neuhauser, E., Nogueira, L., Vincent, C., Senshu, T. & Serre, G. (2001) The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 166, 4177-4184.

Mathews, C.J., Weston, V.C., Jones, A., Field, M. & Coakley, G. (2010) Bacterial septic arthritis in adults. *Lancet*, 375, 846-855.

Matsumoto, I., Staub, A., Benoist, C. & Mathis, D. (1999) Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science (New York, N.Y.)*, 286, 1732-1735.

McQueen, F.M., Benton, N., Perry, D., Crabbe, J., Robinson, E., Yeoman, S., McLean, L. & Stewart, N. (2003) Bone edema scored on magnetic resonance imaging scans of the dominant carpus at presentation predicts radiographic joint damage of the hands and feet six years later in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 48, 1814-1827.

Méchin, M.-C., Nachat, R., Coudane, F., Adoue, V., Arnaud, J., Serre, G. & Simon, M. (2011) [Deimination or citrullination, a post-translational modification with many physiological and pathophysiological facets]. *Médecine Sciences: M/S*, 27, 49-54.

Ménard, H.A. & el-Amine, M. (1996) The calpain-calpastatin system in rheumatoid arthritis. *Immunology Today*, 17, 545-547.

Mewar, D., Coote, A., Moore, D.J., Marinou, I., Keyworth, J., Dickson, M.C., Montgomery, D.S., Binks, M.H. & Wilson, A.G. (2006) Independent associations of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor with radiographic severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 8, R128.

Mewar, D., Moore, D.J., Young-Min, S., Bertolaccini, M.L., Khamashta, M.A., Watson, P.F. & Wilson, A.G. (2005) Antiferritin antibodies discovered by phage display expression cloning are associated with radiographic damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 52, 3868-3872.

Meyer, O., Labarre, C., Dougados, M., Goupille, P., Cantagrel, A., Dubois, A., Nicaise-Roland, P., Sibilia, J. & Combe, B. (2003) Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 62, 120-126.

Mikuls, T.R. (2003) Co-morbidity in rheumatoid arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 17, 729–752.

Mimori, T., Suganuma, K., Tanami, Y., Nojima, T., Matsumura, M., Fujii, T., Yoshizawa, T., Suzuki, K. & Akizuki, M. (1995) Autoantibodies to calpastatin (an endogenous inhibitor for calcium-dependent neutral protease, calpain) in systemic rheumatic diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 7267-7271.

Miossec, P., Korn, T. & Kuchroo, V.K. (2009) Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *The New England Journal of Medicine*, 361, 888-898.

Mori, S., Hirose, J. & Yonemura, K. (2010) Contribution of HLA-DRB1*04 alleles and anti-cyclic citrullinated antibodies to development of resistance to disease-modifying antirheumatic drugs in early rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*, 29, 1357-1366.

Mosmann, T.R. & Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, 7, 145-173.

Musone, S.L., Taylor, K.E., Nititham, J., Chu, C., Poon, A., Liao, W., Lam, E.T., Ma, A., Kwok, P.-Y. & Criswell, L.A. (2011) Sequencing of TNFAIP3 and association of variants with multiple autoimmune diseases. *Genes and Immunity*, 12, 176-182.

N

Nachat, R., Méchin, M.-C., Charveron, M., Serre, G., Constans, J. & Simon, M. (2005a) Peptidylarginine deiminase isoforms are differentially expressed in the anagen hair follicles and other human skin appendages. *The Journal of Investigative Dermatology*, 125, 34-41.

Nachat, R., Méchin, M.-C., Takahara, H., Chavanas, S., Charveron, M., Serre, G. & Simon, M. (2005b) Peptidylarginine deiminase isoforms 1-3 are expressed in the epidermis and involved in the deimination of K1 and filaggrin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 124, 384-393.

Nakashima, K., Hagiwara, T. & Yamada, M. (2002) Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 49562-49568.

Nell, V.P.K., Machold, K.P., Stamm, T.A., Eberl, G., Heinzl, H., Uffmann, M., Smolen, J.S. & Steiner, G. (2005) Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64, 1731-1736.

Nienhuis, R.L. & Mandema, E. (1964) A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis: the antiperinuclear factor. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 23, 302-305.

Nilsson, E. & Biberfeld, G. (1980) Demonstration of antibodies to double-stranded DNA by the *Crithidia luciliae* immunofluorescence test. *Journal of Clinical & Laboratory Immunology*, 3, 197-201.

Nishikawa, M., Myoui, A., Tomita, T., Takahi, K., Nampei, A. & Yoshikawa, H. (2003) Prevention of the onset and progression of collagen-induced arthritis in rats by the potent p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor FR167653. *Arthritis and Rheumatism*, 48, 2670-2681.

Nishimura, K., Sugiyama, D., Kogata, Y., Tsuji, G., Nakazawa, T., Kawano, S., Saigo, K., Morinobu, A., Koshiba, M., Kuntz, K.M., Kamae, I. & Kumagai, S. (2007) Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Annals of Internal Medicine*, 146, 797-808.

O

Ohmura, K., Terao, C., Maruya, E., Katayama, M., Matoba, K., Shimada, K., Murasawa, A., Honjo, S., Takasugi, K., Tohma, S., Matsuo, K., Tajima, K., Yukawa, N., Kawabata, D., Nojima, T., Fujii, T., Yamada, R., Saji, H., Matsuda, F. & Mimori, T. (2010) Anti-citrullinated peptide antibody-negative RA is a genetically distinct subset: a definitive study using only bone-erosive ACPA-negative rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*, 49, 2298-2304.

Ohuri, M., Takeuchi, M., Maruki, R., Nakajima, H. & Miyake, H. (2007) FR180204, a novel and selective inhibitor of extracellular signal-regulated kinase, ameliorates collagen-induced arthritis in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 374, 311-316.

Ollier, W., Venables, P.J., Mumford, P.A., Maini, R.N., Awad, J., Jaraquemada, D., D'Amaro, J. & Festenstein, H. (1984) HLA antigen associations with extra-articular rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*, 24, 279-291.

van Oosterhout, M., Bajema, I., Levarht, E.W.N., Toes, R.E.M., Huizinga, T.W.J. & van Laar, J.M. (2008) Differences in synovial tissue infiltrates between anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 58, 53-60.

Østensen, M., Fuhrer, L., Mathieu, R., Seitz, M. & Villiger, P.M. (2004) A prospective study of pregnant patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis using validated clinical instruments. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 63, 1212-1217.

P

Päi, S., Päi, L. & Birkenfeldt, R. (1998) Correlation of serum IgA rheumatoid factor levels with disease severity in rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 27, 252-256.

de Pablo, P., Dietrich, T. & McAlindon, T.E. (2008) Association of periodontal disease and tooth loss with rheumatoid arthritis in the US population. *The Journal of rheumatology*, 35, 70.

Papadopoulos, N.G., Tsiaousis, G.Z., Pavlitou-Tsiontsi, A., Giannakou, A. & Galanopoulou, V.K. (2008) Does the presence of anti-CCP autoantibodies and their serum levels influence the severity and activity in rheumatoid arthritis patients? *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 34, 11-15.

Park, J.Y. & Pillinger, M.H. (2007) Interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*, 65 Suppl 1, S4-10.

Pincus, T., Callahan, L.F., Sale, W.G., Brooks, A.L., Payne, L.E. & Vaughn, W.K. (1984) Severe functional declines, work disability, and increased mortality in seventy-five rheumatoid arthritis patients studied over nine years. *Arthritis and Rheumatism*, 27, 864-872.

Plotz, C.M. & Singer, J.M. (1956) The latex fixation test. I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. *The American Journal of Medicine*, 21, 888-892.

Pobirci, O., Bogdan, F., Pobirci, D.D., Roşca, E. & Petcu, C.A. (2011) The study of synovities with articular inflammatory liquid, through clinical-statistical, histological and immunohistochemical methods. *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie*, 52, 333-338.

del Puente, A., Knowler, W.C., Pettitt, D.J. & Bennett, P.H. (1988) The incidence of rheumatoid arthritis is predicted by rheumatoid factor titer in a longitudinal population study. *Arthritis and Rheumatism*, 31, 1239-1244.

Punzi, L., Ramonda, R. & Sfriso, P. (2004) Erosive osteoarthritis. *Best Practice & Research. Clinical Rheumatology*, 18, 739-758.

Q

Qing, Y.-F., Zhang, Q.-B., Zhou, J.-G., Yuan, G.-H., Wei, J., Xing, Y., Liu, J.-P., Jiang, L. & Chen, J.-P. (2009) The detecting and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 18, 713-717.

R

Reddy, M.M., Wilson, R., Wilson, J., Connell, S., Gocke, A., Hynan, L., German, D. & Kodadek, T. (2011) Identification of candidate IgG biomarkers for Alzheimer's disease via combinatorial library screening. *Cell*, 144, 132-142.

Remmers, E.F., Plenge, R.M., Lee, A.T., Graham, R.R., Hom, G., Behrens, T.W., de Bakker, P.I., Le, J.M., Lee, H.S., Batliwalla, F. & others (2007a) STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *The new england journal of medicine*, 357, 977.

Reviron, D., Perdriger, A., Toussiot, E., Wendling, D., Balandraud, N., Guis, S., Semana, G., Tiberghien, P., Mercier, P. & Roudier, J. (2001) Influence of shared epitope-negative HLA-DRB1 alleles on genetic susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 44, 535-540.

Ries, S., Biederer, C., Woods, D., Shifman, O., Shirasawa, S., Sasazuki, T., McMahon, M., Oren, M. & McCormick, F. (2000) Opposing effects of Ras on p53: transcriptional activation of mdm2 and induction of p19ARF. *Cell*, 103, 321-330.

Roberts, T.M. (1992) Cell biology. A signal chain of events. *Nature*, 360, 534-535.

Rogers, G.E. & Taylor, L.D. (1977) The enzymic derivation of citrulline residues from arginine residues in situ during the biosynthesis of hair proteins that are cross-linked by isopeptide bonds. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 86A, 283-294.

Rönnelid, J., Lysholm, J., Engström-Laurent, A., Klareskog, L. & Heyman, B. (1994) Local anti-type II collagen antibody production in rheumatoid arthritis synovial fluid. Evidence for an HLA-DR4-restricted IgG response. *Arthritis and Rheumatism*, 37, 1023-1029.

Rosenstein, E.D., Greenwald, R.A., Kushner, L.J. & Weissmann, G. (2004) Hypothesis: the humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis. *Inflammation*, 28, 311-318.

Roudier, J. (1995) HLA-DR genotyping, diagnosis and prognosis of inflammatory arthritis. *Revue Du Rhumatisme (English Ed.)*, 62, 733-735.

Roux, C.H. (2007) Rheumatoid arthritis and spondyloarthropathies: geographical variations in prevalence in France. *Journal of Rheumatology*, 117-22.

De Rycke, L., Verhelst, X., Kruithof, E., Van den Bosch, F., Hoffman, I.E.A., Veys, E.M. & De Keyser, F. (2005) Rheumatoid factor, but not anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, is modulated by infliximab treatment in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64, 299-302.

S

Saag, K.G., Cerhan, J.R., Kolluri, S., Ohashi, K., Hunninghake, G.W. & Schwartz, D.A. (1997) Cigarette smoking and rheumatoid arthritis severity. *Annals of the rheumatic diseases*, 56, 463.

Sander, O. (2010) [The safety of biologics : a risk-benefit assessment of treating rheumatoid arthritis with biologics based on registry data on mortality]. *Zeitschrift Für Rheumatologie*, 69, 788-794.

Sauerland, U., Becker, H., Seidel, M., Schotte, H., Willeke, P., Schorat, A., Schlüter, B., Domschke, W. & Gaubitz, M. (2005) Clinical utility of the anti-CCP assay: experiences with 700 patients. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1050, 314-318.

Saulot, V., Vittecoq, O., Salle, V., Drouot, L., Legoedec, J., Le Loët, X., Godin, M., Ducroix, J.-P., Ménard, J.-F., Tron, F. & Gilbert, D. (2002) Autoantibodies directed against the amino-terminal domain I of human calpastatin (ACAST-DI Ab) in connective tissue diseases. High levels of ACAST-DI Ab are associated with vasculitis in lupus. *Journal of Autoimmunity*, 19, 55-61.

Schaller, M., Burton, D.R. & Ditzel, H.J. (2001) Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease. *Nature Immunology*, 2, 746-753.

Schellekens, G.A., Visser, H., de Jong, B.A., van den Hoogen, F.H., Hazes, J.M., Breedveld, F.C. & van Venrooij, W.J. (2000) The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis and Rheumatism*, 43, 155-163.

Schmidt, D., Goronzy, J.J. & Weyand, C.M. (1996) CD4⁺ CD7-CD28-T cells are expanded in rheumatoid arthritis and are characterized by autoreactivity. *Journal of Clinical Investigation*, 97, 2027.

Sebbag, M., Moinard, N., Auger, I., Clavel, C., Arnaud, J., Nogueira, L., Roudier, J. & Serre, G. (2006) Epitopes of human fibrin recognized by the rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins. *European Journal of Immunology*, 36, 2250-2263.

Senkpiehl, I., Marget, M., Wedler, M., Jenisch, S., Georgi, J., Kabelitz, D. & Steinmann, J. (2005) HLA-DRB1 and anti-cyclic citrullinated peptide antibody production in rheumatoid arthritis. *International Archives of Allergy and Immunology*, 137, 315-318.

Senshu, T., Kan, S., Ogawa, H., Manabe, M. & Asaga, H. (1996) Preferential deimination of keratin K1 and filaggrin during the terminal differentiation of human epidermis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 225, 712-719.

Sewing, A., Wiseman, B., Lloyd, A.C. & Land, H. (1997) High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Molecular and Cellular Biology*, 17, 5588-5597.

Shmerling, R.H. & Delbanco, T.L. (1991) The rheumatoid factor: an analysis of clinical utility. *The American Journal of Medicine*, 91, 528-534.

Silman, A.J., Newman, J. & MacGregor, A.J. (1996) Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from a nationwide study of disease-discordant twins. *Arthritis and Rheumatism*, 39, 732-735.

Simon, M., Girbal, E., Sebbag, M., Gomes-Daudrix, V., Vincent, C., Salama, G. & Serre, G. (1993) The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called « antikeratin antibodies, » autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Investigation*, 92, 1387.

Slobodin, G., Rosner, I., Rozenbaum, M., Boulman, N., Kessel, A. & Toubi, E. (2009) Psoriatic arthropathy: where now? *The Israel Medical Association Journal: IMAJ*, 11, 430-434.

Somers, K., Geusens, P., Elewaut, D., De Keyser, F., Rummens, J.-L., Coenen, M., Blom, M., Stinissen, P. & Somers, V. (2011a) Novel autoantibody markers for early and seronegative rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity*, 36, 33-46.

Staerz, U.D., Karasuyama, H. & Garner, A.M. (1987) Cytotoxic T lymphocytes against a soluble protein. *Nature*, 329, 449-451.

Stastny, P. (1978) Association of the B-Cell Alloantigen DRw4 with Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine*, 298, 869-871.

Steffen C (1969) Tissue antibodies in rheumatoid arthritis and other connective tissue diseases. *Ann Immunol*, 1, 47-58.

Steiner, G., Hartmuth, K., Skriner, K., Maurer-Fogy, I., Sinski, A., Thalmann, E., Hassfeld, W., Barta, A. & Smolen, J.S. (1992) Purification and partial sequencing of the nuclear autoantigen RA33 shows that it is indistinguishable from the A2 protein of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex. *The Journal of Clinical Investigation*, 90, 1061-1066.

Stern, L.J., Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Urban, R.G., Strominger, J.L. & Wiley, D.C. (1994) Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*, 368, 215-221.

Steven, M.M., Teh, L.G., Teh, L.S., Pullar, T., Belch, J.J., Lewis, D., Parker, J. & Zoma, A. (1984) Value of test for antinuclear antibodies in rheumatic diseases. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, 288, 1724-1725.

Stolt, P. (2003) Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 62, 835-841.

Suzuki, A., Yamada, R., Chang, X., Tokuhira, S., Sawada, T., Suzuki, M., Nagasaki, M., Nakayama-Hamada, M., Kawaida, R., Ono, M., Ohtsuki, M., Furukawa, H., Yoshino, S., Yukioka, M., Tohma, S., Matsubara, T., Wakitani, S., Teshima, R., Nishioka, Y., Sekine, A., et al. (2003) Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nature Genetics*, 34, 395-402.

Szekanecz, Z., Besenyei, T., Paragh, G. & Koch, A.E. (2009) Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*, 42, 563-573.

T

Takizawa, Y., Sawada, T., Suzuki, A., Yamada, R., Inoue, T. & Yamamoto, K. (2005) Peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) identified as a conformation-dependent autoantigen in rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 34, 212-215.

Taylor, P., Gartemann, J., Hsieh, J. & Creeden, J. (2011) A systematic review of serum biomarkers anti-cyclic citrullinated Peptide and rheumatoid factor as tests for rheumatoid arthritis. *Autoimmune Diseases*, 2011, 815038.

Terakawa, H., Takahara, H. & Sugawara, K. (1991) Three types of mouse peptidylarginine deiminase: characterization and tissue distribution. *Journal of Biochemistry*, 110, 661-666.

Terao, C., Ohmura, K., Kochi, Y., Ikari, K., Maruya, E., Katayama, M., Shimada, K., Murasawa, A., Honjo, S., Takasugi, K., Matsuo, K., Tajima, K., Suzuki, A., Yamamoto, K., Momohara, S., Yamanaka, H., Yamada, R., Saji, H., Matsuda, F. & Mimori, T. (2011a) A large-scale association study identified multiple HLA-DRB1 alleles associated with ACPA-negative rheumatoid arthritis in Japanese subjects. *Annals of the Rheumatic Diseases* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21873689> [Consulté novembre 4, 2011].

Thalhamer, T., McGrath, M.A. & Harnett, M.M. (2008) MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology (Oxford, England)*, 47, 409-414.

Thevissen, K., Vercoetere, W., Bombardier, C. & Landewé, R.B.M. (2011) Diagnostic and prognostic value of synovial biopsy in adult undifferentiated peripheral inflammatory arthritis: a systematic review. *The Journal of Rheumatology. Supplement*, 87, 45-47.

Thiel, M.J., Schaefer, C.J., Lesch, M.E., Mobley, J.L., Dudley, D.T., Tecle, H., Barrett, S.D., Schrier, D.J. & Flory, C.M. (2007) Central role of the MEK/ERK MAP kinase pathway in a mouse model of rheumatoid arthritis: potential proinflammatory mechanisms. *Arthritis and Rheumatism*, 56, 3347-3357.

Thomson, W., Barton, A., Ke, X., Eyre, S., Hinks, A., Bowes, J., Donn, R., Symmons, D., Hider, S., Bruce, I.N., Wilson, A.G., Marinou, I., Morgan, A., Emery, P., Carter, A., Steer, S., Hocking, L., Reid, D.M., Wordsworth, P., Harrison, P., et al. (2007) Rheumatoid arthritis association at 6q23. *Nature Genetics*, 39, 1431-1433.

Tiacci, E., Trifonov, V., Schiavoni, G., Holmes, A., Kern, W., Martelli, M.P., Pucciarini, A., Bigerna, B., Pacini, R., Wells, V.A., Sportoletti, P., Pettirossi, V., Mannucci, R., Elliott, O., Liso, A., Ambrosetti, A., Pulsoni, A., Forconi, F., Trentin, L., Semenzato, G., et al. (2011) BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 364, 2305-2315.

Tishler, M., Caspi, D. & Yaron, M. (1985) C-reactive protein levels in patients with rheumatoid arthritis: the impact of therapy. *Clinical Rheumatology*, 4, 321-324.

Tosato, G., Steinberg, A.D. & Blaese, R.M. (1981) Defective EBV-specific suppressor T-cell function in rheumatoid arthritis. *The New England Journal of Medicine*, 305, 1238-1243.

Tosato, G., Steinberg, A.D., Yarchoan, R., Heilman, C.A., Pike, S.E., De Seau, V. & Blaese, R.M. (1984) Abnormally elevated frequency of Epstein-Barr virus-infected B cells in the blood of patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Clinical Investigation*, 73, 1789-1795.

Toussiro, E. & Roudier, J. (2007) Pathophysiological links between rheumatoid arthritis and the Epstein-Barr virus: an update. *Joint Bone Spine*, 74, 418–426.

Toussiro, E., Auger, I., Roudier, C., Luka, J., Wendling, D., Tiberghien, P. & Roudier, J. (1999) HLA-DR polymorphism influences T-cell precursor frequencies to Epstein-Barr virus (EBV) gp110: implications for the association of HLA-DR antigens with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*, 54, 146-152.

Tran, N.H., Wu, X. & Frost, J.A. (2005) B-Raf and Raf-1 are regulated by distinct autoregulatory mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 16244-16253.

Tsai, J., Lee, J.T., Wang, W., Zhang, J., Cho, H., Mamo, S., Bremer, R., Gillette, S., Kong, J., Haass, N.K., Sproesser, K., Li, L., Smalley, K.S.M., Fong, D., Zhu, Y.-L., Marimuthu, A., Nguyen, H., Lam, B., Liu, J., Cheung, I., et al. (2008) Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 3041-3046.

Tur, B.S., Süldür, N., Ataman, S., Tutkak, H., Atay, M.B. & Düzgün, N. (2004) Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in patients with rheumatoid arthritis: clinical, biological, and radiological correlations. *Joint, Bone, Spine: Revue Du Rhumatisme*, 71, 198-202.

Tureson, C., McClelland, R.L., Christianson, T. & Matteson, E. (2008) Clustering of extraarticular manifestations in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*, 35, 179.

Turkcapar, N., Demir, O., Atli, T., Kopuk, M., Turgay, M., Kinikli, G. & Duman, M. (2006) Late onset rheumatoid arthritis: clinical and laboratory comparisons with younger onset patients. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 42, 225-231.

U

Ueda-Hayakawa, I., Hasegawa, M., Kumada, S., Tanaka, C., Komura, K., Hamaguchi, Y., Takehara, K. & Fujimoto, M. (2010) Usefulness of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor to detect rheumatoid arthritis in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford, England)*, 49, 2135-2139.

Uhlig, T. (2005) Is rheumatoid arthritis disappearing? *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64, 7-10.

Valkenburg (1963) Dans The epidemiology of chronic rheumatism p 330-6 Vol. 2. Oxford: Blackwell.

V

Vander Cruyssen, B., Cantaert, T., Nogueira, L., Clavel, C., De Rycke, L., Dendoven, A., Sebag, M., Deforce, D., Vincent, C., Elewaut, D., Serre, G. & De Keyser, F. (2006) Diagnostic value of anti-human citrullinated fibrinogen ELISA and comparison with four other anti-citrullinated protein assays. *Arthritis Research & Therapy*, 8, R122.

van Venrooij, W.J., van Beers, J.J.B.C. & Pruijn, G.J.M. (2008a) Anti-CCP Antibody, a Marker for the Early Detection of Rheumatoid Arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1143, 268-285.

Verpoort, K.N., Jol-van der Zijde, C.M., Papendrecht-van der Voort, E.A.M., Ioan-Facsinay, A., Drijfhout, J.W., van Tol, M.J.D., Breedveld, F.C., Huizinga, T.W.J. & Toes, R.E.M. (2006) Isotype distribution of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis reflects an ongoing immune response. *Arthritis and Rheumatism*, 54, 3799-3808.

Vessey, M.P., Villard-Mackintosh, L. & Yeates, D. (1987) Oral contraceptives, cigarette smoking and other factors in relation to arthritis. *Contraception*, 35, 457-464.

Vincent, C., de Keyser, F., Masson-Bessière, C., Sebbag, M., Veys, E.M. & Serre, G. (1999) Anti-perinuclear factor compared with the so called « antikeratin » antibodies and antibodies to human epidermis filaggrin, in the diagnosis of arthritides. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 58, 42-48.

Vincent, C., Nogueira, L., Clavel, C., Sebbag, M. & Serre, G. (2005) Autoantibodies to citrullinated proteins: ACPA. *Autoimmunity*, 38, 17-24.

Voigt, L.F., Koepsell, T.D., Nelson, J.L., Dugowson, C.E. & Daling, J.R. (1994) Smoking, obesity, alcohol consumption, and the risk of rheumatoid arthritis. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 5, 525-532.

Vossenaar, E.R., Després, N., Lapointe, E., van der Heijden, A., Lora, M., Senshu, T., van Venrooij, W.J. & Ménard, H.A. (2004) Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Research & Therapy*, 6, R142-150.

W

Waler, E. (2007) On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. 1939. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica*, 115, 422-438; discussion 439.

Wan, P.T.C., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., Barford, D. & Marais, R. (2004) Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, 116, 855-867.

Weisbart, R.H., Chan, G., Heinze, E., Mory, R., Nishimura, R.N. & Colburn, K. (2010) BRAF drives synovial fibroblast transformation in rheumatoid arthritis. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 34299-34303.

Wernick, R.M., Lipsky, P.E., Marban-Arcos, E., Maliakkal, J.J., Edelbaum, D. & Ziff, M. (1985) IgG and IgM rheumatoid factor synthesis in rheumatoid synovial membrane cell cultures. *Arthritis and Rheumatism*, 28, 742-752.

Weyand, C.M., McCarthy, T.G. & Goronzy, J.J. (1995) Correlation between disease phenotype and genetic heterogeneity in rheumatoid arthritis. *The Journal of Clinical Investigation*, 95, 2120-2126.

Willemze, A., van der Woude, D., Ghiddey, W., Levarht, E.W.N., Stoeken-Rijsbergen, G., Verduyn, W., de Vries, R.R.P., Houwing-Duistermaat, J.J., Huizinga, T.W.J., Trouw, L.A. & Toes, R.E.M. (2011) The interaction between HLA shared epitope alleles and smoking and its contribution to autoimmunity against several citrullinated antigens. *Arthritis and Rheumatism*, 63, 1823-1832.

Wolfe, F. & Michaud, K. (2007) The effect of methotrexate and anti-tumor necrosis factor therapy on the risk of lymphoma in rheumatoid arthritis in 19,562 patients during 89,710 person-years of observation. *Arthritis and Rheumatism*, 56, 1433-1439.

Wooley, P.H., Seibold, J.R., Whalen, J.D. & Chapdelaine, J.M. (1989) Pristane-induced arthritis. The immunologic and genetic features of an experimental murine model of autoimmune disease. *Arthritis and Rheumatism*, 32, 1022-1030.

Wordsworth, P., Pile, K.D., Buckely, J.D., Lanchbury, J.S., Ollier, B., Lathrop, M. & Bell, J.I. (1992) HLA heterozygosity contributes to susceptibility to rheumatoid arthritis. *American journal of human genetics*, 51, 585.

van der Woude, D., Lie, B.A., Lundström, E., Balsa, A., Feitsma, A.L., Houwing-Duistermaat, J.J., Verduyn, W., Nordang, G.B.N., Alfredsson, L., Klareskog, L., Pascual-Salcedo, D., Gonzalez-Gay, M.A., Lopez-Nevot, M.A., Valero, F., Roep, B.O., Huizinga, T.W.J., Kvien, T.K., Martín, J., Padyukov, L., de Vries, R.R.P., et al. (2010) Protection from ACPA-positive rheumatoid arthritis (RA) is predominantly associated with HLA-DRB1*1301. *Arthritis & Rheumatism*, NA-NA.

Y

Yamagiwa, T., Fukunishi, S., Tachibana, T., Okamura, H., Yoshiya, S. & Kashiwamura, S.-ichiro (2011) Abrogation of Treg function deteriorates rheumatoid arthritis. *Modern Rheumatology*

Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10165-011-0476-x> [Consulté juillet 10, 2011].

You, X., Boyle, D.L., Hammaker, D. & Firestein, G.S. (2006) PUMA-mediated apoptosis in fibroblast-like synoviocytes does not require p53. *Arthritis Research and Therapy*, 8, 157.

Young, B.J., Mallya, R.K., Leslie, R.D., Clark, C.J. & Hamblin, T.J. (1979) Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *British Medical Journal*, 2, 97.

Z

Zhao, J., Zhao, Y., He, J., Jia, R. & Li, Z. (2008) Prevalence and significance of anti-peptidylarginine deiminase 4 antibodies in rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 35, 969-974.

HLA-DRB1*0404 is strongly associated with high titers of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis

C. Charpin¹, N. Balandraud¹, S. Guis¹, C. Roudier¹, E. Toussiro², J. Rak¹, N. Lambert¹, M. Martin¹, D. Revirion³, J. Roudier¹, I. Auger¹

¹INSERM UMR 639, Université de la Méditerranée and Rheumatology, APHM, Marseille, France;

²Department of Rheumatology, University Hospital Jean Minjoz, Besancon Cedex, France;

³EFS, Marseille, France.

Abstract

Objective

To test whether the presence of RA associated HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401 and HLA-DRB1*0404 alleles individually influences anti-cyclic citrullinated peptide antibodies (anti-CCP) production.

Methods

The frequency of anti-CCP antibodies was calculated in the sera of 260 RA patients expressing either two (double dose genotypes SE+/SE+), one (single dose genotypes SE+/SE-) or no RA associated HLA-DR alleles (SE-/SE-). Anti-CCP antibodies titers were also determined.

Results

RA associated HLA-DR alleles are not mandatory for production of anti-CCP. We found that 68% of SE-/SE- patients were anti-CCP positive. There was no significant difference in anti-CCP between SE negative patient (SE-/SE-) and patients expressing at least one SE (SE+/SE+ and SE+/SE-) ($p=0.140$). We observed no statistical difference in anti-CCP between RA patients expressing one or two SE (82% vs. 77%, $p=0.577$). Among SE+/SE- patients, HLA-DRB1*0404 was associated with anti-CCP with a statistically significant difference compared with SE negative patients (90% anti-CCP positive, $p=0.02$). HLA-DRB1*0404 was also associated with high titers of anti CCP with a statistically significant difference compared with HLA-DRB1*0401 and HLA-DRB1*0101 patients ($p=0.025$).

Conclusions

The RA-associated HLA-DRB1*0404 allele was the most strongly associated with the presence of anti-CCP in RA sera. Moreover, HLA-DRB1*0404 patients had higher titers of anti CCP than patients with other RA associated HLA-DR alleles.

Key words

Rheumatoid arthritis, HLA-DRB1*0404, anti-CCP.

Caroline Charpin, MD;
 Nathalie Balandraud, MD, PhD;
 Sandrine Guis, MD, PhD;
 Chantal Roudier, MD, PhD;
 Eric Toussiot, MD, PhD;
 Justyna Rak, PhD student;
 Nathalie Lambert, PhD;
 Marielle Martin, technician;
 Denis Reviron, MD, PhD;
 Jean Roudier, MD, PhD;
 Isabelle Auger, PhD.

Supported by grants from INSERM, Association pour la Recherche contre la Polyarthrite, Société Française de Rhumatologie and APHM.

Please address correspondence and reprints requests to: Isabelle Auger, INSERM UMR 639, Parc Scientifique de Luminy, 163 avenue de Luminy, case 939, 13009 Marseille, France.

E-mail:

isabelle.auger@medecine.univ-mrs.fr

Received on September 10, 2007; accepted in revised form on December 14, 2007.

© Copyright CLINICAL AND

EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2008.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory joint disease with a prevalence of 0.5% worldwide. The etiology of RA is unknown, however a genetic predisposition to RA is well established (1). HLA-DR genes are the strongest genetic component in RA (2). HLA-DR alleles whose B1 chain contains the "shared epitope" (SE), a conserved 5 amino acid motif, carry susceptibility to develop RA. This motif is (according to the one letter amino acid code) QKRAA/ QRRRA/ RRRRA. RA associated HLA-DR alleles include HLA-DRB1*0401, DRB1*0404, DRB1*0405, DRB1*0408, and HLA-DR1 (3). These alleles are not equally associated with risk to develop RA. Indeed, HLA-DR genotypes containing two susceptibility alleles (SE+/SE+) confer a higher risk than genotypes containing only one susceptibility allele (SE+/SE-) which confer a higher risk than DR genotypes containing no susceptibility allele (SE-/SE-) (4). The maximal risk to develop RA is observed in individuals expressing both HLA-DRB1*0401 and HLA-DRB1*0404 (5). However, how these HLA-DRB1 alleles influence the development of RA is unknown.

In this study, we focused on HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0404 and HLA-DRB1*0101. Because these alleles are associated with different risks to develop RA, we supposed that they act by different mechanisms, helping autoantigen processing or autoantibody production. Among the various autoantibodies known in RA, autoantibodies to citrullinated proteins (ACPA) are highly specific (6). ACPA recognize citrullin (a posttranslationally modified form of arginin) on different proteins like filaggrin, vimentin or fibrin (7, 8). ACPAs are detected by a commercial enzyme-linked immunoabsorbent assay containing a synthetic cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) (9). Recent studies have described the association of SE positive alleles with anti-CCP production in different populations of patients with RA (10- 14). Among RA associated alleles, the strongest association was observed with HLA-DR4 and the lowest was with HLA-DR1 (15, 16).

To evaluate the influence of HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0404 and HLA-DRB1*0101 on anti-CCP production, we quantified anti-CCP in RA patients from Southern France expressing either two, one or no RA associated HLA-DR alleles. Our most striking finding is that HLA-DRB1*0404 is strongly associated with anti-CCP in RA.

Methods

Patients and controls

We studied 260 patients with RA from the rheumatology unit at La Conception Hospital in Marseille (mean age 55.1 years, mean disease duration 11.5 years, 78% female, 91% receiving disease modifying anti rheumatic drugs (DMARDs) and 64% anti-TNF- α). All RA patients fulfilled the American College of Rheumatology 1987 revised criteria (17). The control groups were composed of 126 patients with other type of arthritides: 53 patients with spondyloarthritis (AS) from the rheumatology unit at La Conception Hospital in Marseille, 73 patients with systemic sclerosis (SSc) (from a national cohort elaborated in collaboration with Hospital Cochin, Saint Antoine, Saint Louis, Paris, Hospital Claude Huriez, Lille and Hospital La Conception, Marseille) and 56 healthy controls. Healthy controls were recruited among laboratory staff volunteers and volunteer bone marrow donors after health evaluation to discard autoimmune pathologies. All participants had given informed consent.

HLA-DRB1 typing

HLA-DR typing was performed by PCR/sequence specific oligonucleotide analysis (18). The following alleles were classified as SE positive: HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0102, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0404, HLA-DRB1*0405, HLA-DRB1*0408 and HLA-DRB1*1001. In our cohort, 25% of RA patients expressed two SE (SE+/SE+), 54% carried one SE (SE+/SE-) and 20% were SE negative (SE-/SE-).

Anti-CCP2 antibodies

Anti-cyclic citrullinated peptide IgG antibodies were detected by a second-generation ELISA (Immunoscan RA Mark 2, Eurodiagnostica, Sweden). All

Competing interests: none declared.

Table I. Distribution of shared epitope and anti-CCP positivity in RA patients and controls*.

	RA patients Number (%)	Spondylarthropathy Number (%)	Systemic sclerosis Number (%)	Healthy controls Number (%)
SE+/SE+	54/66 (82)	1/3 (33)	0/0	0/0
SE+/SE-	109/141 (77)	0/12	1/15 (7)	0/18
SE-/SE-	36/53 (68)	1/38 (3)	3/58 (5)	0/38
Total	199/260 (77)	2/53 (4)	4/73 (5)	0/56

*anti-CCP: anti-cyclic citrullinated peptide; RA: rheumatoid arthritis; SE: shared epitope.

Table II. Frequency of RA patients whose sera were positive for anti-CCP by number of SE*.

	Number of patients	Anti-CCP>25 U/ml Number (%)	p versus SE-/SE- group
SE+/SE+	66	54 (82)	0.124
HLA-DRB1*0401/ HLA-DRB1*0404	22	19 (86)	0.175
HLA-DRB1*0101/ HLA-DRB1*0401	13	10 (77)	0.767
HLA-DRB1*0101/ HLA-DRB1*0101	8	6 (75)	0.995
HLA-DRB1*0404/ HLA-DRB1*0404	4	3 (75)	0.792
HLA-DRB1*0401/ HLA-DRB1*0401	5	3 (60)	0.891
HLA-DRB1*0101/ HLA-DRB1*0404	3	3 (100)	-
other SE+/SE+	11	10 (91)	0.240
SE+/SE-	141	109 (77)	0.248
HLA-DRB1*0404/SE-	41	37 (90)	0.02§
HLA-DRB1*0401/SE-	50	36 (72)	0.814
HLA-DRB1*0101/SE-	50	36 (72)	0.814
SE-/SE-	53	36 (68)	
Total	260	199 (77)	

*anti-CCP: anti-cyclic citrullinated peptide; RA: rheumatoid arthritis; SE: shared epitope.

§ p=0.056 versus HLA-DRB1*0401/SE- group and HLA-DRB1*0101/SE- group.

Table III. Frequency of RA patients whose sera were positive for high titer of anti-CCP*.

	Number of patients	Anti-CCP>200 U/ml Number (%)	p versus SE-/SE- group
SE+/SE+	66	36 (55)	0.999
HLA-DRB1*0401/ HLA-DRB1*0404	22	13 (59)	0.809
HLA-DRB1*0101/ HLA-DRB1*0401	13	8 (62)	0.799
HLA-DRB1*0101/ HLA-DRB1*0101	8	3 (38)	0.668
HLA-DRB1*0404/ HLA-DRB1*0404	4	2 (50)	0.635
HLA-DRB1*0401/ HLA-DRB1*0401	5	3 (60)	0.872
HLA-DRB1*0101/ HLA-DRB1*0404	3	1 (33)	0.949
other SE+/SE+	11	6 (54)	0.819
SE+/SE-	141	67 (48)	0.618
HLA-DRB1*0404/SE-	41	27 (66)	0.289 §
HLA-DRB1*0401/SE-	50	20 (40)	0.268
HLA-DRB1*0101/SE-	50	20 (40)	0.268
SE-/SE-	53	28 (53)	
Total	260	131 (50)	

*anti-CCP: anti-cyclic citrullinated peptide; RA: rheumatoid arthritis; SE: shared epitope.

§ p=0.025 versus HLA-DRB1*0401/SE- group and HLA-DRB1*0101/SE- group.

the assays were performed in duplicate. A test result above 25 U/ml was considered positive. A test result above 200 U/ml was considered as a high titer of anti-CCP (10).

Statistical analysis

Chi-square test, Fisher exact test were used to compare anti-CCP status between genotypic groups. Kruskal-Wallis test was used to compare the medians of anti-CCP titers from the different groups of patients. $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Sensitivity and specificity of anti-CCP in RA patients

The sera of 260 patients with rheumatoid arthritis (RA), 73 patients with systemic sclerosis (SSc), 53 patients with spondylarthropathy (AS) and 56 healthy controls were tested for the presence of anti-CCP2 antibodies. A test result above 25 U/ml was considered positive (Table I). The percentage of patients whose sera were positive for anti-CCP was calculated in groups of patients expressing either two SE (SE+/SE+), one SE (SE+/SE-) or no RA associated allele (SE-/SE-).

We found that 77% of RA patients were positive for anti-CCP. Among control groups, 5% of SSc patients, 4% of AS patients and 0% of healthy controls were positive. Thus, in our RA population, anti-CCP have a sensitivity of 77% and specificity of 97%.

HLA-DRB1*0404 is associated with anti-CCP antibodies

To evaluate the influence of RA associated HLA-DR alleles on anti-CCP production, we compared the frequency of anti-CCP positive sera among groups of patients expressing either two (SE+/SE+), one (SE+/SE-) or no RA associated HLA-DR alleles (SE-/SE-) (Table II). We found that RA associated HLA-DR alleles are not mandatory for production of anti-CCP. Indeed 68% of SE-/SE- patients had anti-CCP. There was no significant difference in anti-CCP between SE negative patient (SE-/SE-) and patients expressing at least one SE (SE+/SE+ and SE+/SE-) ($p = 0.140$ by Chi square test). We observed no statis-

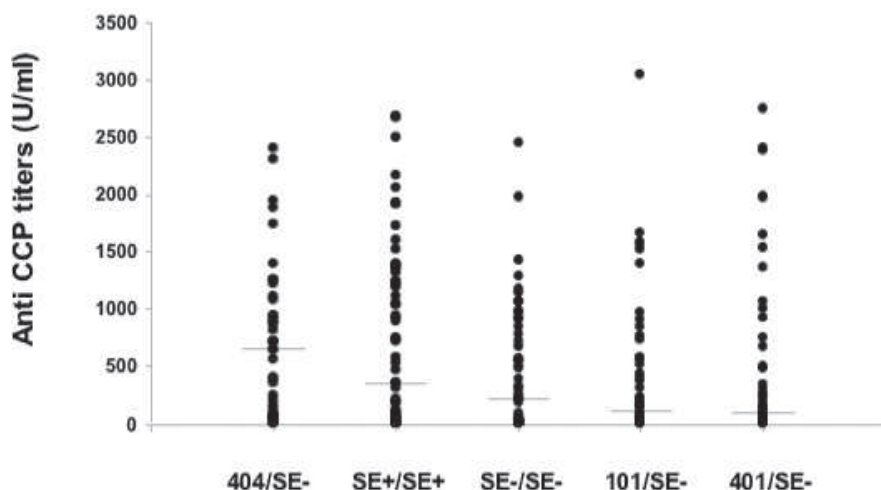


Fig. 1. Anti-CCP titers in 260 RA patients. Serum samples with a test result above 25 U/ml were considered positive. Horizontal bars indicate median titers of anti CCP antibodies for each group: 660, 362, 227, 115 and 87 U/ml respectively. HLA-DRB1*0404 is associated with a significantly higher median of anti CCP using a Kruskal Wallis test ($p=0.017$).

tical difference between RA patients expressing one or two SE (82% vs. 77%, $p=0.577$ by Chi square test). Among SE+/SE+ patients, there was only a trend towards association between anti-CCP and the HLA-DRB1*0401/HLA-DRB1*0404 genotype (86% anti-CCP positive, $p=0.175$ by Chi square test). Among SE+/SE- patients, we found that HLA-DRB1*0404 was associated with anti-CCP with a statistically significant difference compared with SE-/SE- patients (90% anti-CCP positive, $p=0.02$ by Chi square test).

*HLA-DRB1*0404 is associated with higher titers of anti-CCP*

To assess whether anti-CCP titers correlated with presence of particular SE alleles, we made a quantitative analysis of anti-CCP. A test result above 200 U/ml was considered as a high titer of anti-CCP (Table III).

We observed that 55% of SE+/SE+ patients, 48% of SE+/SE- patients and 53% of SE-/SE- patients were high anti-CCP positive. Among SE+/SE- patients, we found that HLA-DRB1*0404 was associated with high titers of anti-CCP with a statistically significant difference compared with HLA-DRB1*0401 and HLA-DRB1*0101 patients ($p=0.025$ by Chi square test). HLA-DRB1*0404 was also associated with the highest median titers of anti-CCP and this result is significant using a Kruskal Wallis test ($p=0.017$) (Fig. 1).

Discussion

Most patients with RA express particular HLA-DR alleles whose DRB1 chains share a highly conserved amino acid motif called shared epitope (SE). HLA-DRB1*0404 and HLA-DRB1*0401 confer high risk while others like HLA-DRB1*0101 carry lower risks of RA (19). Moreover, a dose effect has been observed in SE positive HLA-DRB1 genotypes. In particular, individuals expressing both HLA-DRB1*0401 and HLA-DRB1*0404 are exposed to maximal risk to develop RA. This synergic effect is still unexplained and respective contribution of each allele to the pathogenesis of RA is not understood. In addition, RA associated alleles are not associated with the same degree of disease severity. Several studies have shown an association between HLA-DR4 alleles and extra-articular disease manifestations (20). In particular, HLA-DRB1*0401 predisposes to more severe disease (21). These data suggest that RA associated HLA-DR alleles can contribute to the development of RA by different mechanisms.

RA sera contain a family of autoantibodies directed against various citrullinated proteins. They can be detected by anti-CCP assay. Anti-CCP are highly specific for RA and are reported to be a good predictor for the development of RA. In this work, we studied the association between anti-CCP production

and HLA-DRB1*0101, 0401 and 0404 in single or double dose genotypes. To that, we quantified anti-CCP in sera of RA patients from Southern France expressing different HLA-DRB1 genotypes.

We found that the presence of RA associated HLA-DR alleles is not mandatory for production of anti-CCP. In a previous study, we observed a similar result when we compared the frequency of sera positive for anti-citrullinated fibrinogen (AFIBA) among the groups of patients expressing two, one or no RA associated HLA-DR alleles. Fifty five percent of the SE negative patients had antibodies to citrullinated fibrinogen (22).

We could find a higher percentage of anti-CCP in patients expressing at least one SE allele compared to SE negative patients, but the difference was not statistically significant (79%, $p=0.140$). This is different from the Leiden early arthritis cohort in which anti-CCP were positive in 61% of patients expressing at least one SE allele compared to 36% of SE negative patients (10). In the North American RA consortium, SE alleles are also strongly associated with anti-CCP (11). The relatively small sample available could explain this discrepancy.

In addition, we expected higher anti-CCP positivity in patients expressing two SE alleles compared to patients expressing one SE allele. The association of two SE alleles with anti-CCP positivity has been described in the Leiden early arthritis cohort (by comparing with the healthy control group without SE as the referent) (13). In our cohort, a similar percent of RA patients expressing either two or one SE were anti-CCP positive. Moreover, there was no difference in anti-CCP titer between patients expressing two or one SE alleles. The same result was observed in the Leiden early arthritis cohort. Patients carrying two SE alleles did not have a significantly higher anti-CCP titer compared with patients carrying one SE allele (10).

Among single dose SE patients, we tested whether anti-CCP antibodies were associated with a particular HLA-DR allele. We observed that HLA-

DRB1*0404 was strongly associated with anti-CCP production in RA. Moreover, HLA-DRB1*0404 was also associated with high titers of anti-CCP (the highest median anti-CCP titer and the most important percentage of sera with anti-CCP above 200 U/ml). These data are consistent with studies which revealed a highly significant association between anti-CCP and HLA-DR4 (15). HLA-DRB1*0401 is associated with anti-CCP in Northern European and Portuguese populations (12, 15, 16, 23). This is the first description of association between HLA-DRB1*0404 and anti-CCP production in RA.

How HLA-DRB1*0404 can contribute to the production of anti-CCP antibodies remains to be explained. We recently observed that HLA-DRB1*0404 is also associated with anti-citrullinated fibrinogen in RA sera. Indeed, 83% of RA patients expressing HLA-DRB1*0404 have autoantibodies to citrullinated fibrinogen (22). Moreover, by screening synovial proteins with sera of RA patients homozygous for HLA-DR alleles, we observed that sera of RA patients homozygous for HLA-DRB1*0404 recognized a 100 kD synovial protein identified as calpastatin, the natural inhibitor of calpains (proteases involved in cartilage destruction). Indeed, 50% of RA patients expressing HLA-DRB1*0404 have autoantibodies to synovial calpastatin (24).

Our data support the idea that HLA-DRB1*0404 carries an original function allowing its association with many autoantibody responses in RA.

Acknowledgements

We particularly thank Pr. J. Cabane, Dr. K.P. Tiev, Dr. Y. Allanore, Dr. N. Assous, Pr. A. Kahan, Dr. D. Farge Bancel, Dr. E. Hachulla and Pr. J.R. Harlé for the recruitment of the scleroderma patients. We thank Dr. A. Loundou for the statistical analysis.

References

- OLLIER W, THOMSON W: Population genetics of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18: 741-59.
- DEIGHTON CM, WALKER DJ, GRIFFITHS ID, ROBERTS DF: The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. *Clin Genet* 1989; 36: 178-82.
- GREGENSEN PK, SILVER J, WINCHESTER RJ: The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 1205-13.
- REVIRON D, PERDRIGER A, TOUSSIROT E *et al.*: Influence of shared epitope-negative HLA-DRB1 alleles on genetic susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 535-40.
- WORDSWORTH P, PILE KD, BUCKELY JD *et al.*: HLA heterozygosity contributes to susceptibility to rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 585-91.
- SCHELLEKENS GA, DE JONG BA, VAN DEN HOOGEN FH, VAN DE PUTTE LB, VAN VENROOIJ WJ: Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998; 101: 273-81.
- VAN VENROOIJ WJ, PRUIJN GJ: Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000; 2: 249-51.
- GIRBAL-NEUHAUSER E, DURIEUX JJ, ARNAUD M *et al.*: The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol* 1999; 162: 585-94.
- SCHELLEKENS GA, VISSER H, DE JONG BA *et al.*: The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 155-63.
- VAN DER HELM-VAN MIL AH, VERPOORT KN, BREEDVELD FC, HUIZINGA TW, TOES RE, DE VRIES RR: The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1117-21.
- IRIGOYEN P, LEE AT, WENER MH *et al.*: Regulation of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis: contrasting effects of HLA-DR3 and the shared epitope alleles. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3813-8.
- VAN GAALEN FA, VAN AKEN J, HUIZINGA TW *et al.*: Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2113-21.
- HUIZINGA TW, AMOS CI, VAN DER HELM-VAN MIL AH *et al.*: Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3433-8.
- FURUYA T, HAKODA M, ICHIKAWA N *et al.*: Differential association of HLA-DRB1 alleles in Japanese patients with early rheumatoid arthritis in relationship to autoantibodies to cyclic citrullinated peptide. *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25: 219-24.
- SENKPIEHL I, MARGET M, WEDLER M *et al.*: HLA-DRB1 and anti-cyclic citrullinated peptide antibody production in rheumatoid arthritis. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 137: 315-8.
- VAN DER HELM-VAN MIL AH, VERPOORT KN, LE CESSIE S, HUIZINGA TW, DE VRIES RR, TOES RE: The HLA-DRB1 shared epitope alleles differ in the interaction with smoking and predisposition to antibodies to cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2007; 2: 425-32.
- ARNETT FC, EDWORTHY SM, BLOCH DA *et al.*: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24.
- OLLERUP O, ZETTERQUIST H: HLA-DR typing PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in two hours; an alternative to DR serological typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992; 39: 225-35.
- THOMSON W, HARRISON B, OLLIER B *et al.*: Quantifying the exact role of HLA-DRB1 alleles in susceptibility to inflammatory polyarthritis: results from a large, population-based study. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 757-62.
- ROUDIER J: HLA-DRB1 genes and extra-articular rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: 103.
- WEYAND CM, XIE C, GORONZY JJ: Homozygosity for the HLA-DRB1 allele selects for extraarticular manifestations in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1992; 89: 2033-9.
- AUGER I, SEBBAG M, VINCENT C *et al.*: Influence of HLA-DR genes on the production of rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated fibrinogen. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3424-32.
- LIGEIRO D, FONSECA JE, ABADE O *et al.*: Influence of Human Leukocyte Antigen-DRB1 on the susceptibility to rheumatoid arthritis and on the production of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in a Portuguese population. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 246-8.
- AUGER I, ROUDIER C, GUISS S, BALANDRAUD N, ROUDIER J: HLA-DRB1*0404 is strongly associated with anti-calpastatin antibodies in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 1588-93.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Autoantibodies to BRAF, a new family of autoantibodies associated with rheumatoid arthritis

Caroline Charpin^{1,2}, Marielle Martin¹, Nathalie Balandraud^{1,2}, Jean Roudier^{1,2}, Isabelle Auger^{1*}

Abstract

Introduction: BRAF (v raf murine sarcoma viral oncogene homologue B1) is a serine-threonine kinase involved in the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathway, known to be implicated in the production of pro-inflammatory cytokines.

We have observed that sera from rheumatoid arthritis (RA) patients recognize the BRAF's catalytic domain, which encompasses amino acids 416 to 766. Here, we identify peptide targets of anti-BRAF autoantibodies and test whether anti-BRAF autoantibodies may interfere with BRAF kinase activity.

Methods: Anti-BRAF autoantibodies were detected by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) in the serum of RA patients and controls, using 40 overlapping 20mer peptides encompassing the catalytic domain of BRAF as immunosorbents. To test whether autoantibodies to BRAF influence BRAF kinase activity, we developed an *in vitro* phosphorylation assay of MEK1 (mitogen extracellular regulated kinase), a major BRAF substrate. MEK1 phosphorylation by BRAF was tested in the presence of purified anti-BRAF autoantibodies from RA patients or control antibody.

Results: We found that one BRAF peptide, P25 (656 to 675), is specifically recognized by autoantibodies from RA patients. Of interest, anti-P25 autoantibodies are detected in 21% of anti-CCP (cyclic citrullinated peptides) negative RA patients. Anti-BRAF autoantibodies activate the *in vitro* phosphorylation of MEK1 mediated by BRAF.

Conclusions: Anti-BRAF autoantibodies from RA patients preferentially recognize one BRAF peptide: P25. Autoantibody responses to P25 are detected in 21% of anti-CCP negative RA patients. Most anti-BRAF autoantibodies activate BRAF kinase activity.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory joint disease with a prevalence of 0.5% worldwide [1]. The mechanisms leading to RA are unknown. The sera of RA patients contain many autoantibodies. The most characteristic are directed at citrullinated proteins (ACPA) [2]. ACPA recognize citrulline (a posttranslationally modified form of arginin) containing epitopes on various proteins, such as filaggrin, vimentin, and fibrinogen [3-6]. ACPAs can be detected by commercially available enzyme-linked immunoabsorbent assays using synthetic cyclic citrullinated peptides (CCP). Anti-

CCP antibodies are detected in 60% of RA patients. Non-citrullinated proteins can also be the target of autoantibodies in RA [7,8].

By screening protein arrays, we found that BRAF (v raf murine sarcoma viral oncogene homologue B1) is a major non-citrullinated autoantigen recognized by 35% of RA patients' sera [8]. BRAF encodes a 766 amino acid serine-threonine kinase that contains a Raf-like Ras-binding domain (RBD encompassing amino acids 156 to 227), a protein kinase C-conserved region 1 domain (C1, amino acids 235 to 280) and a serine threonine protein kinase catalytic domain (amino acids 456 to 712) [9]. BRAF is involved in the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathway, which regulates cell growth [10]. This pathway is also implicated in the production of proinflammatory cytokines

* Correspondence: isabelle.auger@inserm.fr

¹INSERM UMR 639, Parc scientifique et technologique de Luminy, 163 avenue de Luminy, 13288 Marseille cedex 09, France

Full list of author information is available at the end of the article

leading to joint inflammation and destruction [11]. Activation of BRAF leads to activation of MEK1 and/or MEK2. These kinases are the major substrates of BRAF in mammalian cells [12].

We have observed that sera from RA patients recognize the BRAF's catalytic domain which encompasses amino acids 416 to 766. To identify peptide targets of anti-BRAF autoantibodies, we used 40 overlapping 20mers encompassing the entire catalytic domain of BRAF to analyze RA sera. We found that one BRAF peptide, P25 (656 to 675), is specifically recognized by autoantibodies from RA patients. Of interest, anti-P25 autoantibodies are detected in 21% of anti-CCP negative RA patients.

To test whether autoantibodies to BRAF influence BRAF kinase activity, we developed a phosphorylation assay with BRAF, its substrate MEK1 and purified anti-BRAF autoantibodies from RA patients. We found that anti-BRAF autoantibodies activate the *in vitro* phosphorylation of MEK1 mediated by BRAF.

Materials and methods

RA patients

A total of 180 RA patients were chosen from the Rheumatology Ward at Hospital La Conception, Marseille, France. These patients fulfilled the 1987 American College of Rheumatology criteria for RA [13]. In every patient, HLA-DR genotyping and anti-CCP titration was obtained. One hundred, five RA patients were anti-CCP positive and 75 RA patients were anti-CCP negative. Ethical approval was obtained for this study; all participants gave their informed consent.

Controls

Sixty-five patients with ankylosing spondylitis (AS) and 27 patients with psoriasis arthritis (PsA) from the Rheumatology Ward at Hospital La Conception, Marseille, 60 volunteers from the staffs of INSERM UMR 639 and the Marseille Blood Transfusion Center were tested. Ethical approval was obtained for this study; all participants gave their informed consent.

Synthetic peptides

Forty 20-mer peptides, overlapping by 10 aminoacids and encompassing residues 416 to 766 of BRAF (locus NP_004324.1) were synthesized using the solid phase system and purified (Neosystem, Strasbourg, France). This segment from BRAF is polymorphic at position 599 where the usual valine residue can be replaced by a glutamate residue, a polymorphism associated with increased kinase activity and observed in human cancers [14,15].

Peptides P18 and P19 contain position 598 threonine and a position 601 serine residues which are the targets

of phosphorylation during BRAF activation. Therefore, we synthesized both their native and phosphorylated forms, that is, P18 and its phosphorylated variants P35 (phosphorylated threonine 598), P36 (phosphorylated serine 601), P37 (both phosphorylated threonine 598 and serine 601), P19 and its phosphorylated variants P38 (phosphorylated threonine 598), P39 (phosphorylated serine 601) and P40 (both phosphorylated threonine 598 and serine 601). Phosphorylated residues are indicated in red in Figure 1.

Detection of autoantibodies by ELISA

Plates were coated overnight with 10 µg peptide per well diluted in phosphate buffer saline (PBS), pH7.4. Plates were blocked with PBS containing 5% milk. Sera diluted to 1:100 in PBS were incubated for two hours on plates. After washing with 0.1% Tween 20, peroxidase conjugated anti-human IgG (Sigma Aldrich, ST Quentin Fallavier, France) was added. Optical density was read at 405 nm. Background OD was obtained by adding each serum to a well without protein. A positive serum was defined by an OD value more than twice background OD [7,8,16].

Purification of autoantibodies to BRAF

Cyanogen bromide activated Sepharose 4B (Sigma Aldrich) was washed with 1 mM HCl and incubated with BRAF catalytic domain (amino acid 416-766, NP_004324, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) in 0.1 M NaHCO₃ and 0.5 M NaCl pH8 buffer overnight at 4° C. Free Sepharose groups were then blocked with 0.2 M Glycin pH8 for two hours at room temperature. Columns were washed at 4°C with the following buffers: 0.1 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl (pH8), then 0.5 M CH₃COONa (pH4) buffer and finally with phosphate buffer pH7.

We selected 20 sera from RA patients, already known to contain autoantibodies to BRAF. Sera were incubated with 1 µg BRAF catalytic domain immobilized on sepharose. After washing, autoantibodies to BRAF were eluted in PBS pH2, neutralized in 1 M Tris and quantified.

BRAF kinase assay

BRAF dependent phosphotransferase activity was measured in a kinase reaction using inactive recombinant MEK1 as a BRAF substrate (BRAF kinase assay Kit, chemiluminescence detection, Millipore Upstate Temecula, CA, USA). Briefly, MEK1 was incubated for 30 minutes at 30°C with 0.1 µg BRAF in working buffer in presence of 0.1 µg purified autoantibodies to BRAF.

For each patient, we included one positive phosphorylation control (incubation of inactive MEK1 with BRAF in working buffer) and one negative control (incubation

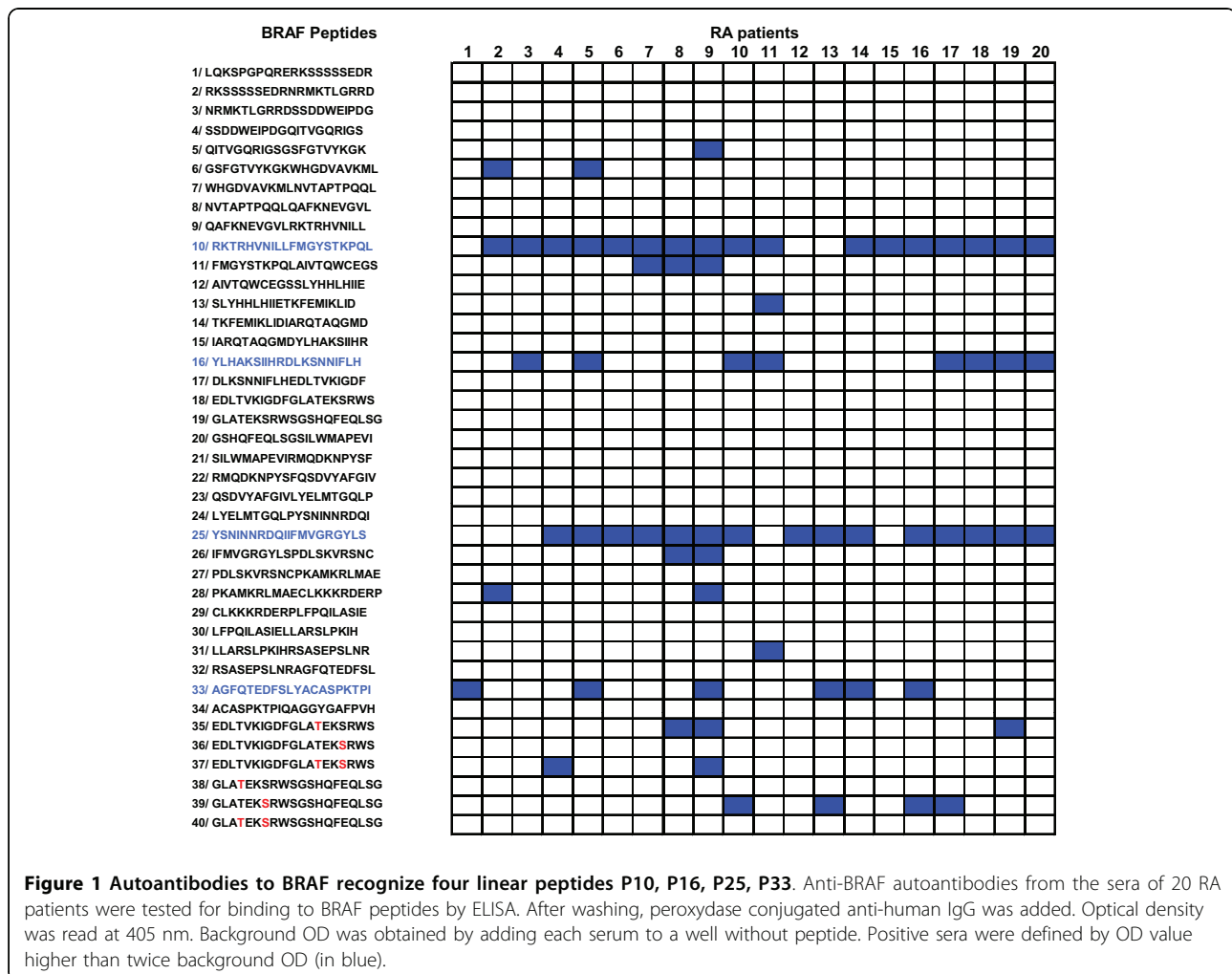


Figure 1 Autoantibodies to BRAF recognize four linear peptides P10, P16, P25, P33. Anti-BRAF autoantibodies from the sera of 20 RA patients were tested for binding to BRAF peptides by ELISA. After washing, peroxidase conjugated anti-human IgG was added. Optical density was read at 405 nm. Background OD was obtained by adding each serum to a well without peptide. Positive sera were defined by OD value higher than twice background OD (in blue).

of inactive MEK1 with BRAF in working buffer in presence of 0.1 µg control antibody C1). Control antibody C1 is an anti-human PAD4 autoantibody purified from RA patients' sera by the same technique as anti-BRAF.

Proteins were then separated on 8% SDS page and transferred onto PVDF membranes. Membranes were blocked, incubated with anti-phospho MEK1 antibody and revealed by chemiluminescence. Membranes were scanned with a Gene Flash (Syngene Europe, Cambridge, United Kingdom). Data were acquired with Gene Tools software (Syngene Europe, Cambridge, United Kingdom). Activation or inhibition of phosphorylation was evaluated by measuring the ratio test OD/positive control OD. A ratio of > 1 indicated activation while a ratio of < 1 indicated inhibition. Three kinase assays were performed separately for each patient and control.

Statistical analysis

P-values were calculated using the Chi square Test. *P* < 0.01 was considered significant.

Results

Autoantibodies to BRAF recognize four linear epitopes on BRAF

To identify B cell epitopes on BRAF, we synthesized 40 overlapping 20 mer peptides encompassing the entire catalytic domain of BRAF. We screened these 40 peptides with the sera of 20 RA patients known to contain autoantibodies to BRAF. Among the 40 peptides, 14 were recognized by at least one of the tested sera. Four peptides, P10, P16, P25 and P33 were preferentially recognized by the sera of RA patients. Indeed, 17 sera recognized P10, 8 recognized P16, 15 recognized P25, and 6 recognized P33 (Figure 1).

Peptide P25 on BRAF is specifically recognized by RA patients

To confirm these reactivities, we tested, using ELISA, the sera of 180 RA patients, 65 AS patients, 27 PsA patients and 60 healthy individuals on P10, P16, P25 and P33.

Autoantibodies to p10 and p25 were found in RA patients more often than in controls (Figure 2). Autoantibodies to P10 were more sensitive but less specific for RA than P25. Indeed, 35% of RA patients' sera recognized P10 versus 18% of AS patients ($P = 0.01$), 4% of PsA patients ($P = 0.001$) and 7% of healthy individuals ($P = 0.00002$).

Autoantibodies to P25 were very specific for RA. Indeed, 19% of RA patients' sera recognized P25 versus 1.5% of AS patients ($P = 0.0006$), 0% of PsA patients ($P = 0.01$) and 0% of healthy individuals ($P = 0.0003$).

Autoantibodies to P16 were not commonly detected in RA. Indeed, only 4% of RA patients' sera recognized P16 versus 0% of AS patients, 0% of PsA patients and 0% of healthy individuals ($P = 0.008$ 180 RA patients versus 152 controls). Finally, autoantibodies to P33 were less specific for RA. Indeed, 17% of RA patients, but also 14% of AS patients, 11% of PsA patients and 22% of healthy individuals recognized P33 ($P = 0.85$, 180 RA patients versus 152 controls).

Peptide P25 on BRAF identifies RA in 21% of anti-CCP negative RA patients

Autoantibodies to P25 were analyzed by ELISA in 105 anti-CCP positive and 75 anti-CCP negative patients. Among anti-CCP positive patients, 17% recognized P25. Among anti-CCP negative patients, 21% recognized P25 (Figure 2).

Autoantibodies to BRAF activate the phosphorylation of MEK1 by BRAF

To test whether autoantibodies directed to BRAF interfere with its enzymatic activity, we analyzed the

phosphorylation of MEK1 in presence of BRAF and autoantibodies to BRAF purified from 20 RA patients.

Autoantibodies to BRAF were purified from RA patient's sera and their presence was confirmed by dot blot (data not shown). After quantification of purified autoantibodies to BRAF, we tested the phosphorylation of MEK1 in presence of BRAF and autoantibodies to BRAF purified from 20 RA patients. Phosphorylation of MEK1 by BRAF was detected by Western blotting and quantified. A mean ratio was obtained from three separate assays. A ratio of > 1 indicated activation, a ratio of < 1 indicated inhibition.

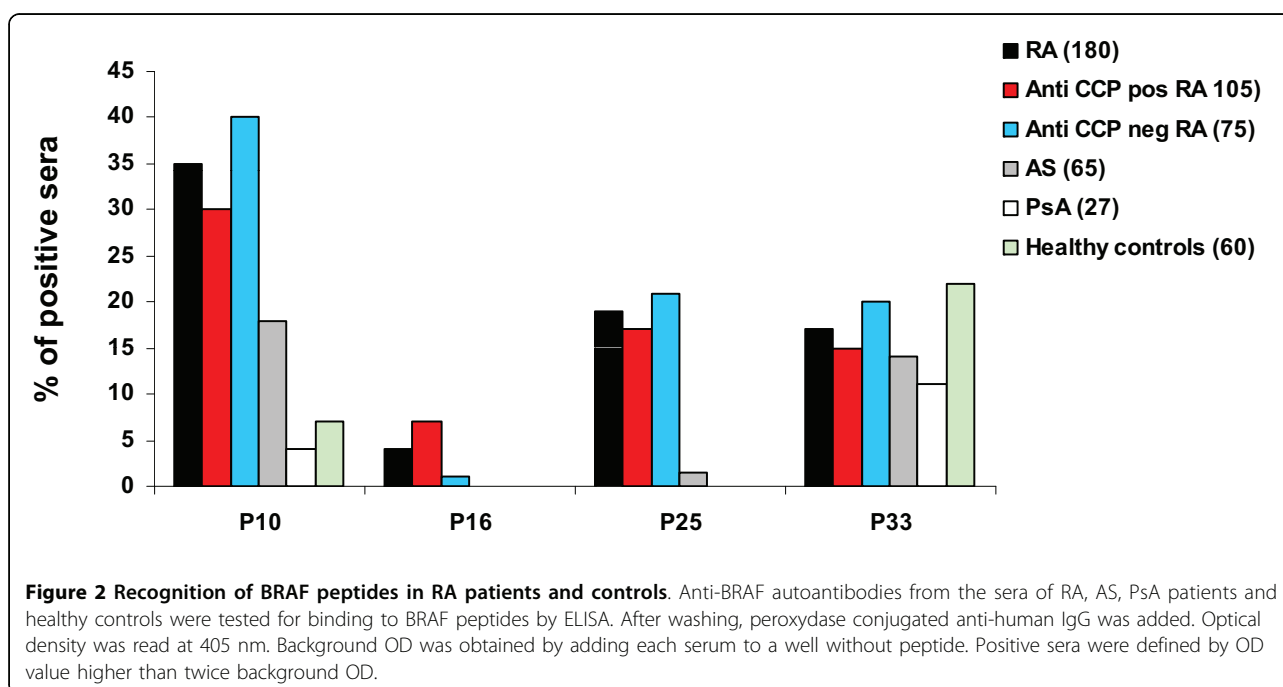
Among 20 purified autoantibodies to BRAF, 1 inhibited and 13 activated MEK1 phosphorylation (Figure 3). We can't conclude for six autoantibodies to BRAF (RA4, RA2, RA17, RA13, RA15, and RA16). Indeed, a ratio of ≥ 1 was obtained but with a strong variability.

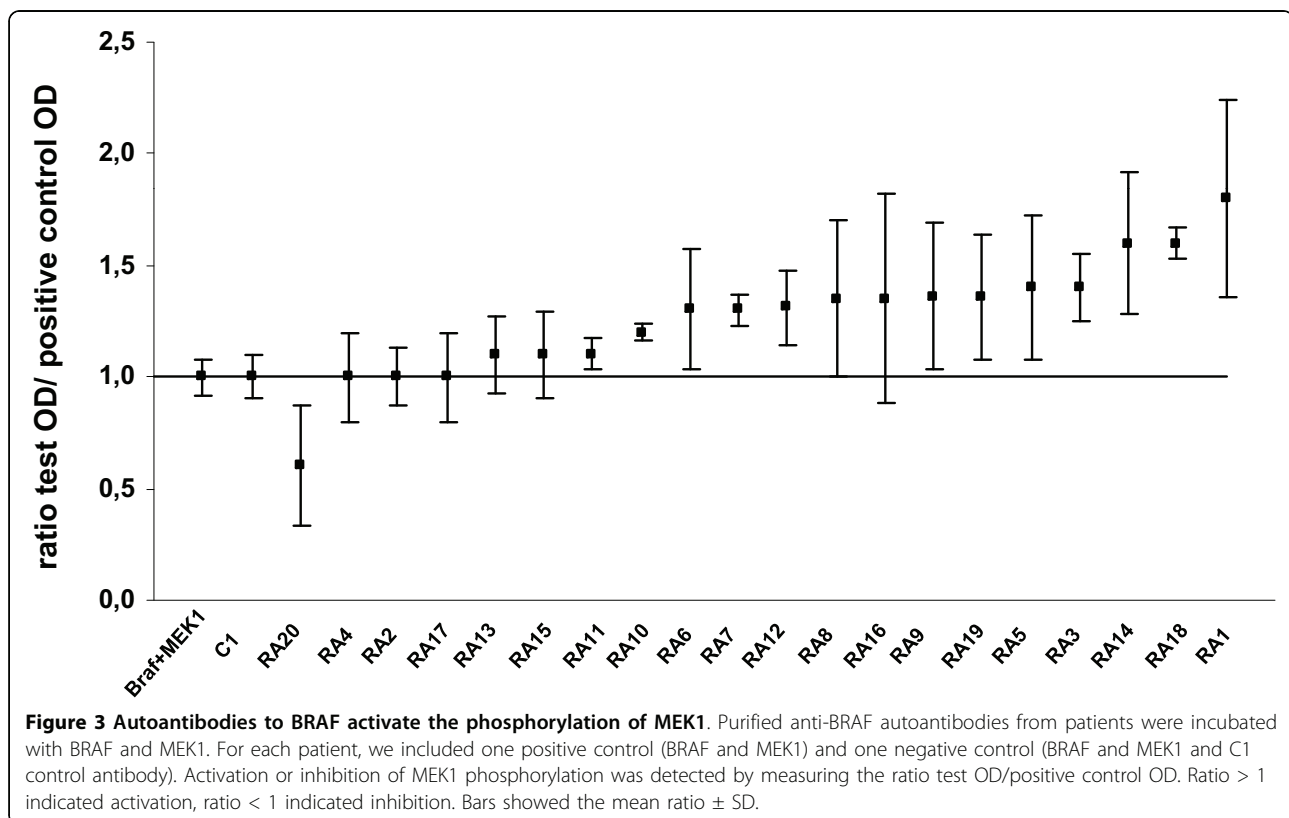
Among autoantibodies to BRAF that activated MEK1 phosphorylation, 10/13 were weak activators ($1 < \text{ratio} < 1.5$) and 3/13 were strong activators (ratio > 1.5).

No difference was observed in the recognition of BRAF peptides between autoantibodies to BRAF that inhibited or activated MEK1 phosphorylation (data not shown).

Discussion

RA is an autoantibody mediated disease. The sera of patients with RA contain a family of highly disease-specific autoantibodies termed ACPA which recognize citrulline-centered peptidic epitopes on many proteins, like filaggrin, vimentin, and fibrin. Citrullyls are arginyl





residues that have been converted from their native basic form into a neutral variant by a posttranslational modification called deimination, mediated by peptidylarginine deiminases. ACPAs can be detected by a commercial ELISA assay containing a synthetic cyclic citrullinated peptide and identify 60% of RA patients. However, non-citrullinated proteins can also be the target of autoantibodies in RA. For instance RA-associated HLA-DR alleles are associated with presence of autoantibodies to synovial calpastatin in RA patients' sera [7]. We also identified peptidyl arginine deiminase 4 (PAD4) as an RA specific autoantigen [8,16].

By using protein arrays, we recently found that BRAF is a major non-citrullinated autoantigen in RA. Indeed, 35% of RA patients' sera contain autoantibodies to BRAF's catalytic domain versus 4% of ankylosing spondylitis patients' and 6% of healthy individuals'. In this study, we mapped epitopes in the BRAF's catalytic domain and analysed the function of anti-BRAF autoantibodies.

To identify peptides targets of anti-BRAF autoantibodies, we used a direct ELISA using a set of synthetic peptides and the sera of RA patients. We identified two linear peptides on BRAF, P10 and P25, recognized preferentially by RA patients. Peptides P10 (506 to 525) and P25 (656 to 675) are located in the catalytic domain of BRAF.

P10 is more sensitive but less specific than P25. P10 is recognized by 35% of RA patients versus 11% of controls ($P < 10^{-7}$, 180 RA patients versus 152 controls).

P25 might have diagnostic interest. Indeed, P25 is recognized by 19% of RA patients versus 0.7% of controls ($P < 10^{-7}$, 180 RA patients versus 152 controls). Of higher interest, P25 is recognized by 21% of anti-CCP negative patients. Therefore, P25 could be used to diagnose RA in anti-CCP negative patients.

We then analysed the effects of anti-BRAF autoantibodies isolated from RA patients on the kinase activity of BRAF. Indeed, autoantibodies directed to an enzyme may interfere with its function. For example, we have recently shown that RA specific autoantibodies to PAD4 inhibit PAD4 mediated citrullination *in vitro* [16]. BRAF is also an interesting target for autoantibodies. Indeed, BRAF is a serine-threonine kinase involved in the transduction of mitogenic signals from the cell membrane to the nucleus. BRAF regulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling cascade. A simplified and linear representation of this cascade comprises RAS, BRAF, MEK and ERK [17]. RAS activation is the first step in the activation of the MAPK cascade. Following RAS activation, BRAF is recruited to the cell membrane and then phosphorylates MEK in the cytoplasm. Activated MEK subsequently phosphorylates ERK, which

translocates to the nucleus where it activates multiple transcription factors.

MAPKs are involved in signalling via the B cell antigen receptor, T cell receptor, Toll-like receptor and IL-1, IL-17 and TNF α receptors. MAPKs also play key roles in the production of pro-inflammatory cytokines (TNF α , IL-1, IL-6). In particular, p38 MAPK is expressed in the RA synovium and regulates the production of pro-inflammatory cytokines [18,19]. Inhibitors of p38 MAPK reduce osteoclast activation and prevent the development of collagen-induced arthritis in the mouse [20,21]. However, so far, p38 MAPK inhibition showed modest clinical efficacy in patients with RA [22].

To test whether autoantibodies to BRAF may influence BRAF activity as a kinase, we developed a phosphorylation assay using BRAF, MEK1 (its major substrate) and autoantibodies to BRAF purified from RA patients' sera. We observed that 65% of anti-BRAF autoantibodies activate phosphorylation of MEK1 by BRAF *in vitro*. Thus, we suggest that anti-BRAF autoantibodies could activate the MAP kinase pathway through BRAF, leading to pro-inflammatory cytokine production and joint inflammation.

We propose a model to explain how autoantibodies to BRAF may activate BRAF (Figure 4). Although BRAF is an intracellular protein, it could be recognized by autoantibodies outside the cell, because in RA, cell death may release BRAF from cells. Autoantibodies to BRAF

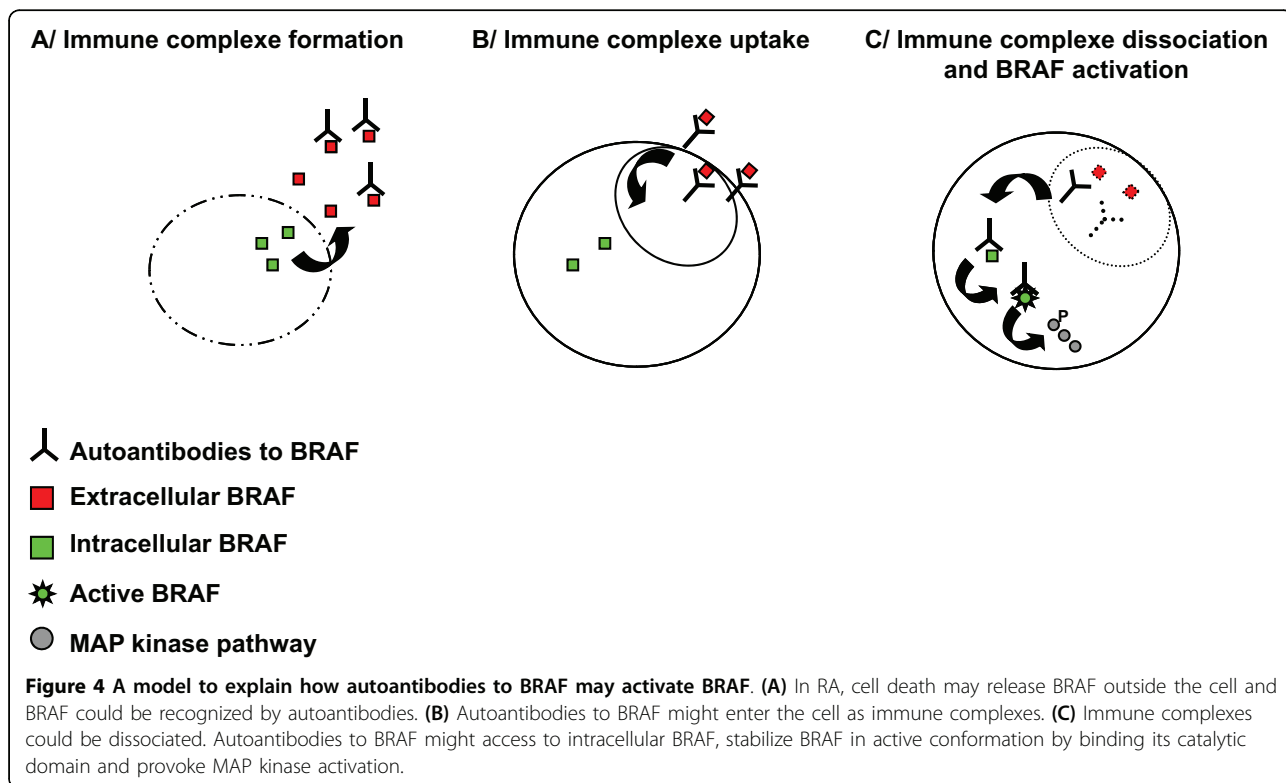
might enter the cell later as immune complexes. After immune complex dissociation, autoantibodies to BRAF become accessible to intracellular BRAF. BRAF activation is regulated by both its N and C terminal domains. The N terminal domain is responsible for the fixation of BRAF to RAS. The C terminal domain contains the substrate recognition sequence allowing MEK's phosphorylation [23,24]. The binding of autoantibodies to BRAF's catalytic domain may result in a change in BRAF conformation and stabilise BRAF in an active conformation allowing the kinase domain to contact its activators and substrates. Testing this model *in vivo* will be our next goal.

Conclusions

We have described a new family of autoantibodies associated with RA. We have demonstrated here that these autoantibodies activate BRAF, which is the first step in MAP kinase activation. Fine epitope mapping on BRAF enabled us to identify one peptide epitope, P25 which may prove interesting in the diagnostic of RA, especially in anti-CCP negative patients.

Abbreviations

ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies; AS: ankylosing spondylitis; BRAF: v raf murine sarcoma viral oncogene homologue B1; CCP: cyclic citrullinated peptides; MAPKs: mitogen-activated protein kinases; MEK1: mitogen extracellular regulated kinase; PAD4: peptidyl arginine deiminase 4; PBS:



phosphate buffer saline; PsA: psoriasis arthritis; RA: rheumatoid arthritis; SD: standard deviation.

Acknowledgements

This research was supported by grants from INSERM, Arthritis Fondation Courtin and Société Française de Rhumatologie.

Author details

¹INSERM UMR 639, Parc scientifique et technologique de Luminy, 163 avenue de Luminy, 13288 Marseille cedex 09, France. ²APHM La Conception, 264 rue Saint Pierre, 13385 Marseille, France.

Authors' contributions

All authors were involved in drafting the article, and revising it critically for important intellectual content. IA and JR contributed to study conception and design. IA, CC, MM and NB contributed to acquisition of data. IA, CC and JR contributed to analysis and interpretation of data. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests. A patent was submitted in March 2010. Submission number: 788471. PCT application number PCT/EP2010/054087. Receiving Office European Patent Office, The Hague: BCT100057BA.

Received: 26 May 2010 Revised: 8 September 2010

Accepted: 18 October 2010 Published: 18 October 2010

References

1. Symmons DPM: What is rheumatoid arthritis? *Br Med Bull* 1995, **51**:243-248.
2. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ: Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998, **101**:273-281.
3. van Venrooij WJ, Puijck GJ: Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000, **2**:249-251.
4. Girbal-Neuhauser E, Durieux JJ, Arnaud M, Dalbon P, Sebbag M, Vincent C, Simon M, Senshu T, Masson-Bessière C, Jolivet-Reynaud C, Jolivet M, Serre G: The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol* 1999, **162**:585-594.
5. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, van Venrooij WJ: The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000, **43**:155-163.
6. Masson-Bessière C, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T, Serre G: The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol* 2001, **166**:4177-4184.
7. Auger I, Roudier C, Guis S, Balandraud N, Roudier J: HLA-DRB1*0404 is strongly associated with anticalpastatin antibodies in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007, **66**:1588-1593.
8. Auger I, Balandraud N, Rak J, Lambert N, Martin M, Roudier J: New autoantigens in rheumatoid arthritis (RA): screening 8268 protein arrays with sera from patients with RA. *Ann Rheum Dis* 2009, **68**:591-594.
9. Roberts TM: Cell biology: a signal chain of events. *Nature* 1992, **360**:534-535.
10. Crews CM, Erikson RL: Extracellular signals and reversible protein phosphorylation: what to Mek of it all. *Cell* 1993, **74**:215-217.
11. Thalhamer T, McGrath MA, Harnett MM: MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)* 2008, **47**:409-414.
12. Reuter CW, Catling AD, Jelinek T, Weber MJ: Biochemical analysis of MEK activation in NIH3T3 fibroblasts. Identification of B-Raf and other activators. *J Biol Chem* 1995, **270**:7644-7655.
13. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988, **31**:315-324.
14. Andersen MH, Fensterle J, Ugurel S, Reker S, Houben R, Guldborg P, Berger TG, Schadendorf D, Trefzer U, Bröcker EB, Straten P, Rapp UR, Becker JC: Immunogenicity of constitutively active V599E Braf. *Cancer Res* 2004, **64**:5456-5460.
15. Fensterle J, Becker JC, Potapenko T, Heimbach V, Vetter CS, Bröcker EB, Rapp UR: B-Raf specific antibody responses in melanoma patients. *BMC Cancer* 2004, **4**:62.
16. Auger I, Martin M, Balandraud N, Roudier J: Rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to peptidyl arginine deiminase type 4 inhibit citrullination of fibrinogen. *Arthritis Rheum* 2010, **62**:126-131.
17. Peyssonnaud C, Eychène A: The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biology of the Cell* 2001, **93**:53-62.
18. Nishikawa M, Myoui A, Tomita T, Takahi K, Nampei A, Yoshikawa H: Prevention of the onset and progression of collagen-induced arthritis in rats by the potent p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor FR167653. *Arthritis Rheum* 2003, **48**:2670-2681.
19. Kotlyarov A, Neininger A, Schubert C, Eckert R, Birchmeier C, Volk HD, Gaestel M: MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. *Nat Cell Biol* 1999, **1**:94-97.
20. Brown DS, Belfield AJ, Brown GR, Campbell D, Foubister A, Masters DJ, Pike KG, Snelson WL, Wells SL: A novel series of p38 MAP kinase inhibitors for the potential treatment of rheumatoid arthritis. *Bioorg Med Chem Lett* 2004, **14**:5383-5387.
21. Saklatvala J: The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. *Curr Opin Pharmacol* 2004, **4**:372-377.
22. Damjanov N, Kauffman RS, Spencer-Green GT: Efficacy, pharmacodynamics, and safety of VX-702, a novel p38 MAPK inhibitor, in rheumatoid arthritis: results of two randomized, double-blind, placebo-controlled clinical studies. *Arthritis Rheum* 2009, **60**:1232-1241.
23. Morrison KD, Cutler RE Jr: The complexity of Raf-1 regulation. *Current Opinion in Cell Biology* 1997, **9**:174-179.
24. Mercer EK, Pritchard CA: Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003, **1653**:25-40.

doi:10.1186/ar3165

Cite this article as: Charpin et al.: Autoantibodies to BRAF, a new family of autoantibodies associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2010 **12**:R194.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



TITLE: New autoantibodies associated with early rheumatoid arthritis

Charpin C^{1,2}, Martin M¹, Toussirot E³, Balandraud N^{1,2}, Wendling D³, Roudier J^{1,2}, Auger I¹.

1: INSERM UMR 639, Marseille, France.

2: APHM, Marseille, France.

3: Service de Rhumatologie, CHU Hôpital Jean Minjoz, Besançon, France.

Address correspondence to

Isabelle AUGER

INSERM UMR 639, Parc Scientifique de Luminy, 163 avenue de Luminy, case 939
13009 Marseille, France

Phone: 33 4 91 82 87 70

Fax: 33 4 91 83 09 26

E-mail : isabelle.auger@inserm.fr

ABSTRACT

Objectives. Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory joint disease causing articular cartilage and bone destruction. Since irreversible joint destruction can be prevented by intervention at the early stages of the disease, early diagnosis of RA is important. In this study, we identified new autoantibodies in the sera of patients with early (less than one year) RA.

Materials and Methods. We screened the sera of 20 RA patients with disease duration less than one year, 19 RA patients with disease duration more than five years and 23 controls on 8268 human protein arrays.

Results. We identified four autoantigens (WIBG, TPM2, ZNF706 and GABARAPL2) recognized almost uniquely by sera from early RA patients. These reactivities were confirmed by ELISA on purified proteins. These early antigens are recognized by 41% to 18% of RA patients with disease duration less than 1 year, and less than 5% of controls and RA patients with disease duration more than 5 years. Of interest, autoantibodies to WIBG are very specific for early RA. Indeed, 41% of early RA patients' sera recognize WIBG versus 5% of RA patients with disease duration more than 5 years and 0% of controls.

Conclusions. We identified 4 proteins which are recognized by the sera of patients with early RA. These proteins could potentially be used as diagnosis markers in early RA patients.

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease affecting approximately 1% of the world's population (1). It is characterized by inflammation of joints that results in cartilage and bone destruction, joint deformity and loss of mobility (2). Although RA has been extensively studied, its cause is unknown. Since irreversible joint destruction can be prevented by intervention at the early stages of the disease, early diagnosis of RA is important.

However, definitive diagnosis of RA can be difficult. Immunologic tests that can be performed for the diagnosis of RA include detection of anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibodies (3). Anti CCP antibodies identify 65% of RA patients. A negative result in anti-CCP antibody testing does not exclude RA.

To identify new autoantibodies in RA, we selected sera from 20 RA patients with disease duration less than one year, 19 RA patients with disease duration more than five years and 23 controls to screen 8000 human protein arrays. We identified 24 "new autoantigens" using the sera of RA patients with disease duration less than 1 year. To confirm the validity of our protein array detection, we used purified proteins in ELISA assays. We tested the sera of 68 RA patients with disease duration less than 1 year and 40 RA patients with disease duration more than 5 years. We also tested the sera of 76 patients with ankylosing spondylitis (AS), 27 patients with psoriasis arthritis (PsA) and 38 healthy subjects.

Among the 24 proteins recognized by the sera of early RA patients, we validated 4 proteins that are preferentially recognized by autoantibodies from early RA patients. These proteins are WIBG (within BGCN homolog (*Drosophila*)), TPM2 (tropomyosin 2), ZNF706 (zinc finger protein 706), and GABARAPL2 (GABA(A) receptor associated protein like 2).

PATIENTS AND METHODS

RA patients' sera for protein array. We started from the sera of 39 RA patients from the rheumatology unit at La Conception Hospital in Marseille. Twenty RA patients had disease duration less than one year and 19 more than five years. All RA

patients fulfilled the American College of Rheumatology 1987 revised criteria (4). Ethical approval was obtained for this study (DC2008-327). All participants gave informed consent.

Controls' sera for protein array. Controls were 7 patients with ankylosing spondylitis (AS) and 2 patients with systemic lupus erythematosus (SLE) from the rheumatology unit at La Conception, 4 patients with systemic sclerosis (SSc) from a national cohort (Hospitals Cochin, Saint Antoine, Saint Louis, Paris, Hospital Claude Huriez, Lille and Hospital La Conception, Marseille). Ten healthy controls were recruited among laboratory staff volunteers and volunteer bone marrow donors. All participants gave informed consent.

Protein microarray. We used Invitrogen ProtoArrays that contain 8268 human proteins ([Protein Content list 4.0](#)). All proteins were expressed as GST fusion proteins, purified under native conditions, and spotted in duplicate on nitrocellulose-coated glass slides. (<http://orf.invitrogen.com>).

Serum profiling assays on protein arrays. Protein arrays were processed at Partnerchip, Evry, France. Briefly, slides were blocked with 1% BSA/PBST, serum samples were added to arrays. After washing, anti-human IgG conjugated to Alexa Fluor® 647 dye was added. Arrays were scanned with a GenePix® 4000B Fluorescent Scanner. Data were acquired with GenePix® Pro software and processed using ProtoArray™ Prospector 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA).

Data Analysis. A panel of values was calculated for each protein array including the Z score, the Chebyshev Inequality Precision (CIP) value and the coefficient of variation (CV) value. The Z score is the signal value for a given spot minus the mean signal value from all the human proteins on the array, divided by the standard deviation of the signal values for all the human proteins on the array. The CIP value evaluates the signal strength for a given spot relative to all the negative control spots and calculates the probability that the observed signal may come from the negative control distribution. The CV evaluates the similarity between duplicates. A Z-Score >3.0, a CIP value <0.05 and a CV < 0.5 define a positive spot (5).

RA patients and controls for ELISA analysis. RA patients were chosen from the Rheumatology Ward at Hospital La Conception, Marseille, France and from the Rheumatology Ward at Hospital Jean Minjoz, Besançon, France. These patients fulfilled the 1987 American College of Rheumatology revised criteria for RA (4). Patients with spondylarthropathy (AS) and psoriasis arthritis (PsA) were chosen from the Rheumatology Ward at Hospital La Conception, Marseille, France. Volunteers from the laboratory staff and the Marseille Blood Transfusion Center staff served as normal controls. Ethical approval was obtained for this study (DC2008-327). All participants gave informed consent.

Detection of autoantibodies by ELISA. Plates were coated overnight with each purified protein diluted in phosphate buffer saline (PBS), pH7.4. Plates were blocked with PBS containing 5% milk. Sera diluted to 1:100 in PBS were incubated for 3h. After washing with 0.1% Tween 20, peroxidase conjugated anti human IgG (Sigma, France) was added. Optical density was read at 405 nm. Background OD was obtained by adding each serum to a well without protein. Positive sera were defined by an OD value more than twice background OD (6, 7, 8).

Statistical analysis. p-values were calculated using the Chi squareTest.

RESULTS

Autoantibody pattern associated with patients with early RA

We selected 20 sera from RA patients with disease duration less than 1 year and compared their reactivity pattern on protein arrays with that of 19 sera from RA patients with disease duration more than 5 years and 23 sera from controls. The control group included 7 patients with ankylosing spondylitis (AS), 2 patients with systemic lupus erythematosus (SLE), 4 patients with systemic sclerosis (SSc) and 10 healthy subjects. Autoantibodies were detected by anti human IgG antibody.

The sera of RA patients with disease duration more than 5 years bound, on average, 101 proteins. AS sera bound 112 proteins, SLE sera bound 91 proteins, SSc sera bound 103 proteins and healthy controls' sera bound 89 proteins (Figure 1).

Sera from RA patients with disease duration less than 1 year bound, on average, 58 proteins. Among these proteins, we identified 24 proteins (P1 to P24) that were recognized by 30 to 60% of RA patients with disease duration less than 1 year and less than 10% of controls (Table 1).

Identification of specific autoantibodies associated with early RA

To confirm the validity of protein array detection, we developed ELISA assays using purified proteins as immunosorbents. We tested sera from 68 RA patients with disease duration less than 1 year, 40 RA patients with disease duration more than 5 years, 76 AS patients, 27 PsA patients and 38 healthy controls.

20 proteins targeted by autoantibodies were not specific for early RA and were also recognized by autoantibodies from controls or RA patients with disease duration more than 5 years. These proteins are P11, P16, P12, P1, P9, P15, P8, P7, P22, P24, P14, P18, P2, P10, P21, P5, P6, P20, P17 and P19 (Figure 2).

4 proteins were recognized by more than 18% of patients with early RA and less than 5% of RA patients with disease duration more than 5 years or controls. These proteins are WIBG (P13), TPM2 (P3), ZNF706 (P4) and GABARAPL2 (P23) (Table 2).

40 of 68 (60%) of early RA patients recognized at least one of these 4 proteins (Figure 3).

DISCUSSION

To get an insight in the early immunological events leading to the development of RA and to develop diagnosis tools for early RA, we screened 8000 protein arrays with sera from patients with early RA (less than one year), RA with disease duration more than 5 years, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, lupus and normal's. We identified 4 new autoantibody families associated with RA with disease duration less than one year. These autoantibodies recognize WIBG, TPM2, ZNF706 and GABARAPL2 (Table 3).

WIBG (P13) is a ribosome-associated protein involved in the disassembly of exon junction complexes (EJCs). EJCs, assembled during mRNA splicing, transport mRNAs during nuclear export into the cytoplasm and are removed during translation

(9). WIBG enhances translation of mRNAs (10). WIBG has also been shown to enhance the translation of viral genes, acting as a “chaperone” (11).

WIBG might have diagnostic interest because of high sensitivity and specificity for early RA. Indeed, we detected anti WIBG autoantibodies in 41% of early RA patients and 5% of patients with RA with disease duration more than 5 years, while these autoantibodies were not present in any control.

Anti WIBG antibodies were detected in 26 of 58 (45%) anti CCP positive early RA patients and in 3 of 10 (30%) anti CCP negative early RA patients (Figure 3). Together, these results indicate that WIBG could be used to diagnose patients with early RA.

TPM2 (P3) is a member of the actin filament binding protein family, involved in muscle contraction (12).

ZNF706 (P4) belongs to the C2H2-type zinc-finger protein family. A zinc finger protein is a DNA-binding protein whose specificity depends on its DNA-binding domain (13, 14).

GABARAPL2 (P23) is involved in autophagy, the process by which proteins and organelles are sequestered in autophagosomal vesicles and delivered to the lysosome for degradation (15).

REFERENCES

- 1- Symmons DPM. What is rheumatoid arthritis? *Br Med Bull* 1995. 51:243-248
- 2- Young A, Koduri G, Batley M, Kulinskaya E, Gough A, Norton S, Dixey J. Mortality in rheumatoid arthritis. Increased in the early course of disease, in ischaemic heart disease and in pulmonary fibrosis. *Rheumatology* 2007. 46: 350-357
- 3- Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000. 43:155-163

- 4- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2010. 69:1580–8
- 5- Auger I, et al. New autoantigens in rheumatoid arthritis: screening 8268 protein arrays with RA patients' sera. *Ann Rheum Dis* 2009. 68:591–594
- 6- Auger I, Roudier C, Guis S, Balandraud N, Roudier J. HLA-DRB1*0404 is strongly associated with anti-calpastatin antibodies in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007. 66 (12), 1588-1593
- 7- Auger I, Martin M, Balandraud N, Roudier J. RA specific autoantibodies to PAD4 inhibit citrullination of fibrinogen. *Arthritis Rheum* 2010. 62:126-131
- 8- Charpin C, Martin M, Balandraud N, Roudier J, Auger I. Autoantibodies to BRAF, a new family of autoantibodies associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2010. 12:R194
- 9- Gehring NH, Lamprinaki S, Kulozik AE, Hentze MW. Disassembly of exon junction complexes by PYM. *Cell* 2009. 137 (3):536-48
- 10 - Diem MD, Chan CC, Younis I, Dreyfuss G. PYM binds the cytoplasmic exon-junction complex and ribosomes to enhance translation of spliced mRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2007. 14 (12):1173-9
- 11- Boyne JR, Jackson BR, Taylor A, Macnab SA, Whitehouse A. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 protein interacts with PYM to enhance translation of viral intronless mRNAs. *EMBO J* 2010. 29 (11):1851-64
- 12- Lin JJ, Eppinga RD, Warren KS, McCrae KR. Human tropomyosin isoforms in the regulation of cytoskeleton functions. *Adv Exp Med Biol* 2008. 644:201-22

13- Luchi S. Three classes of C2H2 zinc finger proteins. *Cell Mol Life Sci* 2001. 58 (4):625-35

14- Laity JH, Lee BM, Wright PE. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol* 2001. 11 (1):39-46

15- Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW. Network organization of the human autophagy system. *Nature* 2010. 466 (7302):68-76

FIGURE LEGEND

Figure 1. The mean number of proteins recognized by each group of patients and healthy controls in protein arrays.

Figure 2. The percentage of patients and healthy controls positive for P1 to P24 determined by ELISA.

Figure 3. Binding of autoantibodies from early RA patients to WIBG (P13), TPM2 (P3), ZNF706 (P4), GABARAPL2 (P23) proteins determined by ELISA. Green Boxes indicate a positive binding.

Table1: Protein arrays analysis

Table 2: Autoantigen Validation

Table 3: Characteristics of the early RA autoantigens

Figure 1

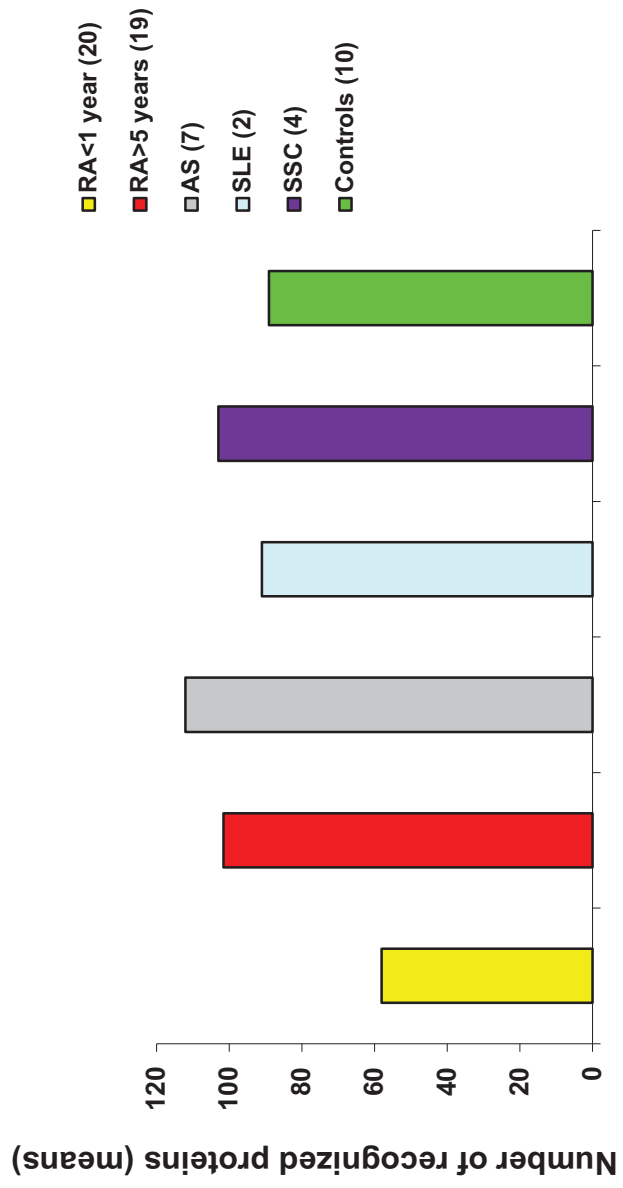


Table 1: Protein arrays analysis

protein	protein name	protein abbreviation	reference	Percentage of positive sera		
				RA< 1 year (20)	RA> 5 years (19)	Controls (23)
P1	IMMUNOGLOBULIN (CD79A) BINDING PROTEIN 1	IGBP1	NM_001551.1	60	0	0
P2	FK506 binding protein	FKBP3	NM_002013.2	45	5	10
P3	TROPOMYOSIN 2 (BETA)	TPM2	NM_003289.3	45	0	0
P4	ZINC FINGER PROTEIN 706	ZNF706	NM_016096.1	45	2	10
P5	COILED-COIL DOMAIN CONTAINING 72	CCDC72	NM_015933.1	40	0	0
P6	Hypothetical protein MGC17403 (MGC17403), Transcription elongation factor A (SII) N-terminal and central domain containing (TCEANC)	MGC17403				
P7	ELG PROTEIN	C17orf85	NM_152634.1	40	0	0
P8	HYPOTHETICAL PROTEIN MGC11257	C7orf50	NM_018553.1	40	0	0
P9	T complex mouse like	TCP10L	NM_032350.3	40	0	0
P10	ELONGATION FACTOR 1 HOMOLOG (S. CEREVISIAE)	ELOF1	NM_144659.1	40	5	5
P11	FGF12	FGF12	NM_032377.2	40	5	0
P12	SYNAPTOTAGMIN I	SYT1	NM_004113.3	40	0	0
P13	WITHIN BGCN HOMOLOG (DROSOPHILA)	WIBG	NM_005639.1	40	0	0
P14	YY1 TRANSCRIPTION FACTOR	YY1	NM_032345.1	40	10	0
P15	eucaryotic transl factor1A (DOUBLECORTEX LISSENCEPHALY, X-LINKED)	EIF1AX	NM_003403.3	40	0	0
P16	LAMIN A/C	DCX	NM_001412.2	40	5	5
P17	TROPOMYOSIN 4	LMNA	NM_178151.1	35	0	0
P18	ACIDIC (LEUCINE-RICH) NUCLEAR PHOSPHOPROTEIN 32 FAMILY, MEMBER E	TPM4	BC033088.1	35	0	0
P19	HYPOTHETICAL PROTEIN MGC20255	ANP32E	BC002827.1	30	0	0
P20	SPANX-N3 PROTEIN	CCDC97	NM_030920.1	30	0	0
P21	THYMIC STROMAL LYMPHOPOIETIN	SPANXN3	NM_052848.1	30	5	0
P22	GABA(A) RECEPTOR-ASSOCIATED PROTEIN-LIKE 2	TSLP	NM_001009609.1	30	0	0
P23	SCY1like	GABARAPL2	NM_138551.1	30	0	0
P24		SCYL1	NM_007285.5	30	0	0
			BC009967.1	30	0	5

Figure 2

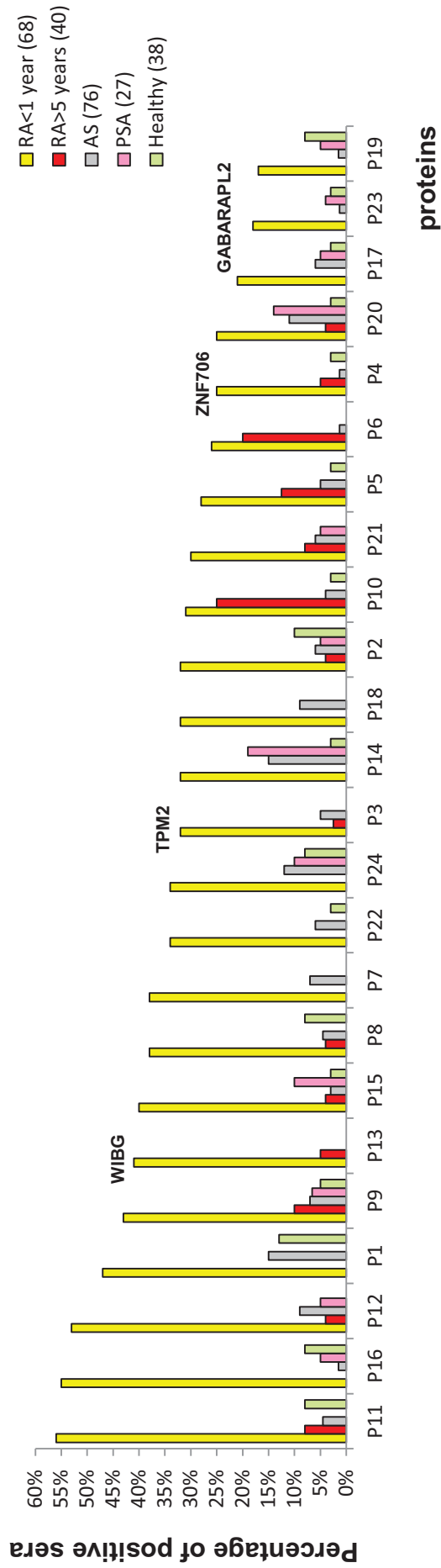


Table 2: Autoantigen validation

		Percentage of positive sera				Healthy (38)	p
		RA < 1 year (68)	RA > 5 years (40)	AS (76)	PSA (27)		
WIBG	NM_032345.1	P13	41%	5%	0%	0%	$p < 10^{-7}$
TPM2	NM_0032893	P3	32%	2.5%	5%	0%	$p < 10^{-7}$
ZNF706	NM_016096.1	P4	25%	5%	1.3%	0%	$p < 10^{-7}$
GABARAPL2	NM_007285.5	P23	18%	0%	1.3%	4%	$p < 10^{-4}$

p value: early RA versus control groups (AS, PsA and Healthy)

Figure 3

	CCP2	WIBG (P13)	TPM2 (P3)	ZNF706 (P4)	GABARAPL2 (P23)
RA1	pos				
RA2	pos				
RA3	pos				
RA4	pos				
RA5	pos				
RA6	pos				
RA7	pos				
RA8	pos				
RA9	pos				
RA10	pos				
RA11	pos				
RA12	pos				
RA13	neg				
RA14	pos				
RA15	pos				
RA16	pos				
RA17	pos				
RA18	pos				
RA19	pos				
RA20	pos				
RA21	pos				
RA22	pos				
RA23	pos				
RA24	pos				
RA25	neg				
RA26	pos				
RA27	pos				
RA28	pos				
RA29	pos				
RA30	pos				
RA31	neg				
RA32	pos				
RA33	pos				
RA34	pos				
RA35	pos				
RA36	pos				
RA37	pos				
RA38	neg				
RA39	pos				
RA40	pos				
RA41	pos				
RA42	pos				
RA43	pos				
RA44	pos				
RA45	neg				
RA46	pos				
RA47	pos				
RA48	pos				
RA49	pos				
RA50	pos				
RA51	neg				
RA52	pos				
RA53	pos				
RA54	neg				
RA55	neg				
RA56	pos				
RA57	pos				
RA58	pos				
RA59	pos				
RA60	pos				
RA61	neg				
RA62	pos				
RA63	pos				
RA64	pos				
RA65	pos				
RA66	pos				
RA67	pos				
RA68	neg				

Table 3: Characteristics of the early RA autoantigens

Protein names		Gene names		Functions		Biological process		Subcellular location		Domain		Sequence similarities	
P13	WIBG NM_032345.1	WITHNBGN homolog (Drosophila) Partner of Y14 and mago Protein wibg homolog	WIBG PYM	Ribonucleoprotein	Disassembly of exon junction complexes Translation regulation Nuclear cytoplasmic shuttle	Cytoplasm Nucleus	EIF2A-like region Coiled coil	Wibg family					
P3	TPM2 NM_0032893	Tropomyosin beta chain Tropomyosin-2 Beta-tropomyosin	TPM2 TMSB	Actin binding Structural constituent of muscle	Muscle contraction Regulation of ATPase activity	Cytoplasm Cytoskeleton	Coiled coil	Tropomyosin family					
P4	ZNF706 NM_016096.1	Zinc finger protein 706	ZNF706 HSPC038 PNAS-113	Zinc ion binding	Transcriptional activation or inhibition	Intracellular	C2H2-type zinc finger DNA binding domain						
P23	GABARAPL2 NM_007285.5	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like GABA(A) receptor-associated protein-like 2 Ganglioside expression factor 2 Short name=GEF-2 General protein transport factor p16 Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa Short name=GATE-16 MAP1 light chain 3-related protein	GABARAPL2 FLC3A GEF2	ATPase binding GABA receptor binding SNARE binding Beta-tubulin binding Microtubule binding	Autophagy Intra-Golgi vesicle-mediated transport Positive regulation of ATPase activity Protein transport	Golgi apparatus		MAP1 LC3 family					