

Département de Biochimie

MEMOIRE

Présenté par : **CHENITI Wafa**

Pour obtenir le diplôme de **Magister**

Option : Biochimie et physiologie expérimentale

THEME

**Etude des autoanticorps dans des couples de sérums
et de liquides synoviaux chez des patients atteints
d'inflammations articulaires.**

Soutenu publiquement le.../.../2012

Devant le jury

Président :	Pr. MALEK Rachid	Professeur Université Ferhat Abbas, Sétif
Rapporteur :	Pr. ARRAR Lekhmici	Professeur Université Ferhat Abbas, Sétif
Examineur :	Pr. BAGHIANI Abderrahmane	Professeur Université Ferhat Abbas, Sétif
Examineur :	Pr. KHENNOUF Seddik	Professeur Université Ferhat Abbas, Sétif

Année universitaire 2011-2012

Dédicace

En guise de reconnaissance, je dédie ce modeste travail à la communauté scientifique à travers le monde et à toute personne qui croit en ce travail et le respecte.

Remerciements

Avant tout, louange à ALLAH le Tout Puissant de m'avoir aidé à réaliser ce travail.

Je remercie infiniment mon encadreur Pr. ARRAR Lekhmici pour tout ce qui a fait afin que je finisse ce travail dans le délai prévu. Je le remercie pour ses conseils, ses informations ainsi pour sa patience durant ces années de formation.

Je remercie le président du jury Pr. MALEK Rachid d'avoir accepté de présider le jury de mon mémoire.

Je remercie les membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail : Pr. BAGHIANI Abderrahmane pour sa disponibilité dans les moments où j'en avais besoin et Pr. KHENNOUF Seddik pour sa gentillesse et encouragements continus.

Je tiens à remercier Dr. BENOUAR, Dr. KRITA, Dr. ZENNOUN et Dr ARRAR Nordine de m'avoir fourni les échantillons de sérums et liquides synoviaux.

Je remercie vivement Pr. GHARZOULI Kamel qui n'a pas hésité de nous donner le maximum de savoir et de nous inspirer la passion de la recherche scientifique.

J'insiste à remercier fortement Mme. HANACHI Nadjat pour ses conseils qui m'ont été de grande utilité dans tous les domaines, ainsi que pour sa disponibilité au cours de l'année pratique.

De très précieux remerciements vont aux membres de ma promotion 2009-2010 qui étaient unis tout le long des trois ans du magister. Je les remercie pour leur soutien moral et physique. Je remercie aussi tous mes amis qui ont de près ou de loin contribué à l'élaboration de ce mémoire.

Finalement, je ne saurai remercier autant ma très chère famille spécialement mes chers parents qui m'ont facilité le chemin pour atteindre ce stade d'études, mes sœurs qui ont veillé à ce que j'accomplis ce travail avec la moindre gêne ainsi que mes frères pour leur soutien morale et physique.

Résumé

L'étude présente consiste à investiguer la corrélation entre les concentrations des anticorps anti-XOR et celle du facteur rhumatoïde (FR-IgM) dans les sérums et les liquides synoviaux des mêmes patients et la sévérité de la maladie articulaire. Les titres des anticorps anti-XOR (IgG et IgM) et du FR-IgM libres et complexes chez des patients atteints de la polyarthrite rhumatoïde (PR), de l'arthrite et de l'arthrose ont été évalués en utilisant une technique ELISA. Le test d'agglutination est utilisé pour détecter le FR-IgM. La XOR bovine a été purifiée pour servir d'antigène dans la préparation d'anticorps spécifiques chez le lapin et pour la détection des anti-XOR libres. L'antisérum obtenu par l'immunisation était riche en anticorps anti-XOR avec un titre de 102400 et a été utilisé dans la détection des complexes immunitaires XOR-anti-XOR (IgG et IgM). En comparant les concentrations des anti-XOR (IgG et IgM) et du FR-IgM dans les sérums à celles dans les liquides synoviaux chez les trois catégories de patients, aucunes différences significatives n'ont été observées. Cependant, les IgM anti-XOR soit sous forme libre ou complexe sont majoritaires. Chez les patients atteints d'arthrose, les IgM libres excèdent de 18.7 et 16 fois les IgG dans le sérum et le liquide synoviale (LS), respectivement. Tandis que chez les patients atteints de la PR, les IgM complexes dépassent les IgG 8 fois dans le sérum ainsi que dans le LS. Contrairement aux IgM, les IgG anti-XOR dominant sous forme de complexes. Les résultats montrent une corrélation entre le taux de ces complexes et la sévérité de la maladie articulaire. En effet, les patients atteints d'arthrites montrent des XOR-IgG sériques plus élevés ($p < 0.05$) que ceux des patients affectés par l'arthrose. De plus les patients atteints de la PR montrent des XOR-IgM synoviaux plus élevés ($p < 0.01$) par rapport à ceux souffrant d'une arthrose. La détection du FR-IgM par l'ELISA montre une spécificité plus élevée que celle par le test d'agglutination. Les patients atteints de la PR ayant des FR-IgM libre synoviaux (94.4 ± 69.2 µg/ml) significativement élevés que ceux des patients souffrants d'arthrites (25 ± 18.31 µg/ml) et des FR-IgM complexes synoviaux (41.66 ± 20.2 µg/ml) plus élevés que ceux des patients atteints d'arthrose (14.6 ± 2.23 µg/ml). Les sérums et les LS de la majorité des patients sont protéine C-réactive positifs confirmant l'existence d'une inflammation.

Mots clés: inflammation articulaire, PR, arthrose, XOR, FR.

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد إمكانية وجود علاقة بين تركيز الأجسام المضادة للإنزيم المؤكسد المرجع للكزانثين (XOR) و عوامل الرئوية (FR-IgM) مع حدة الأمراض المفصلية. تم استعمال تقنية ELISA لتقدير كمية الأجسام المضادة (IgG و IgM و FR-IgM الحرة و المرتبطة في الثنائيات (مصل و سائل مفصلي) عند مرضى الإلتهاب الرئوي الروماتيزمي، إلهاب المفاصل وآلام المفاصل. كما تم استعمال اختبار اللاتكس للكشف عن FR-IgM. تمت تنقية إنزيم XOR من حليب البقر و استعماله كمستضد للكشف عن الأجسام المضادة الحرة الخاصة به ولتحضير الأجسام المضادة الخاصة به عند الأرانب. المصل المضاد المحصل عليه بعد تمنيع أرانب ضد إنزيم XOR كان غنيا بالأجسام المضادة لـ XOR بمعيار 102400. أظهرت مقارنة تركيز الأجسام المضادة لـ XOR (IgG و IgM و FR-IgM) في المصل والسائل المفصلي عند الفئات الثلاث من المرضى عدم وجود أي فرق معتبر. كما أظهرت النتائج أن الأجسام المضادة المضادة لـ XOR من النوع IgM سواء الحرة أو المرتبطة هي الغالبة. كانت كمية IgM الحرة عند المصابين بآلام المفاصل أكبر من كمية IgG بحوالي 18.7 و 16 مرة في المصل والسائل المفصلي، على الترتيب، بينما تفوق كمية IgM المرتبطة عند مرضى الإلتهاب الرئوي الروماتيزمي كمية IgG بحوالي 8 مرات وذلك في كل من المصل و السائل المفصلي. على عكس IgM تظهر IgG المضادة لإنزيم XOR بصورة كبيرة على شكل معقدات مناعية. أظهرت النتائج وجود علاقة بين هذه المعقدات المناعية وحدة الأمراض المفصلية. حيث تكون XOR-CI (IgG) المصلية عند المصابين بالإلتهاب المفصلي أعلى من المصابين بآلام المفاصل ($p < 0.05$)، في حين كان تركيز XOR-CI (IgM) في السائل المفصلي عند مرضى الإلتهاب الرئوي الروماتيزمي، منه عند المصابين بآلام المفاصل ($p < 0.01$). أظهر تقدير FR-IgM بواسطة ELISA حساسية أكبر من تلك التي أظهرها اختبار الإدمصاص. أظهرت النتائج أن تركيز FR-IgM الحرة المصلية ($94.4 \pm 69.2 \mu\text{g/ml}$) عند المصابين بالتهاب المفاصل الرئوي الروماتيزمي أعلى بصورة معتبرة منه عند المصابين بآلام المفاصل ($25 \pm 18.31 \mu\text{g/ml}$)، فيما كان تركيز FR-IgM المرتبط المفصلي ($41.66 \pm 20.2 \mu\text{g/ml}$) أعلى منه عند المصابين بآلام المفاصل ($14.6 \pm 2.23 \mu\text{g/ml}$). وجد أن الأمصال و السوائل المفصلية لأغلبية المرضى موجبة من حيث CRP ما يؤكد وجود إلهاب.

كلمات مفاتيح: إلهاب المفاصل، الإلتهاب الرئوي الروماتيزمي، آلام المفاصل، XOR، FR.

Summary

The present study is to investigate the correlation between concentrations of anti-XOR and the rheumatoid factor (IgM-RF) in sera and synovial fluids from the same patients and the severity of joint disease. The titles of anti-XOR (IgG and IgM) and IgM-RF free and complex in patients with rheumatoid arthritis (RA), arthritis and arthrosis were assessed using an ELISA technique. Agglutination test is used to detect the IgM-RF. The Bovine XOR was purified for use as antigen in the preparation of specific antibodies in rabbits and for the detection of free anti-XOR. The antiserum obtained by immunization was rich in anti-XOR with a titer of 102 400 and was used in the detection of immune complexes XOR-anti- XOR (IgG and IgM). By comparing the concentrations of anti-XOR (IgG and IgM) and IgM-RF in sera with those in synovial fluids in all three categories of patients, no significant differences were observed. However, IgM anti-XOR either in free form or complex predominated. In patients with osteoarthritis, the free IgM exceed 16 and 18.7 times IgG in serum and synovial fluid (LS), respectively. While in patients with RA, IgM complexes exceed IgG for 8 times either in serum or in the LS. Unlike IgM, IgG anti-XOR dominated as complexes. The results showed a correlation between the rate of these complexes and severity of joint disease. Indeed, patients with arthritis show serum IgG-XOR higher ($p < 0.05$) than those of patients affected by arthrosis. Furthermore, patients with RA showed synovial IgM-XOR higher ($p < 0.01$) compared to those suffering from arthrosis. The detection of IgM-RF by ELISA showed a higher specificity than the agglutination test. Patients with RA with free synovial IgM-RF (94.4 ± 69.2 mcg / ml) significantly higher than those of patients with arthritis (25 ± 18.31 mg / ml) and synovial IgM-RF complex (41.66 ± 2.20 g / ml) were higher than those of arthrosis patients (14.6 ± 2.23 g / ml). Sera and LS of the majority of patients are C-reactive protein positive confirming the existence of inflammation.

Key words : articular inflammation, PR, arthrosis, XOR, FR.

Abréviations

AAK :	anticorps anti-kératine
ACF:	adjuvant complet de freund
ACPA :	anticorps anti-peptide cyclique citrulliné
AFP :	anti-facteur périnuclaire
AIF :	adjuvant incomplet de freund
AP	arthrite psoriatique
AR :	arthrite rhumatoïde
CMH :	complexe majeur d'histocompatibilité
CRP :	protéine C-réactive
DTT :	dithiothreitol
ELISA :	enzyme linked immunosorbent assay
FR :	facteurs rhumatoïdes
HLA :	antigène leucocytaire humain
LS :	liquide synovial
LYP :	protéine tyrosine phosphatase spécifique du lymphoïde
MEC :	matrice extracellulaire
MMPase :	métalloprotéinases
OA :	ostéoarthrite
PAD :	peptidylarginine deiminase
PBS-Tw :	tampon phosphate de Na ²⁺ contenant Tween 20.
ROS :	espèces oxygénés réactifs
SA :	spondylarthrite
SDS-PAGE :	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
SE :	motif conservé « shared epitope »
SNP :	polymorphisme d'un simple nucléotide : single-nucléotide polymorphisme
Std :	sérum standard
TNFα :	tumour necrosis factor α
XOR :	xanthine oxydoréductase

Liste des figures

Figure 1. Diagramme schématique de la région des gènes codants pour l'antigène leucocytaire humain.....	06
Figure 2. Structure du motif conservé lié à l'AR.....	07
Figure 3. Histologie d'une membrane synoviale arthritique.....	13
Figure 4. Schéma d'une articulation saine et une autre enflammée dans l'AR.....	13
Figure 5. Différentes phases de la pathophysiologie de la PR.....	15
Figure 6. Conversion enzymatique de peptidylarginine en peptidylcitrulline par PAD.....	20
Figure 7. Contrôle de l'hémostase du cartilage par les cytokines.....	22
Figure 8. Dépôts des cristaux de pyrophosphate de calcium au niveau de la synoviale articulaire, responsables de l'induction de la pseudogoutte.....	27
Figure 9. Réactions catalysées par la forme XDH et XO de la XOR.....	29
Figure 10. Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène.....	30
Figure 11. Protocoles des ELISA utilisés pour le dosage des anticorps.....	39
Figure 12. Spectre d'absorption UV-VIS (250-700 nm) de la XOR purifiée.....	42
Figure 13. SDS-PAGE (10 %) de la XOR bovine purifiée	42
Figure 14. Différentes étapes de l'immunisation des lapins contre la XOR	43
Figure 15. Exemple de développement de la réponse immunitaire contre la XOR	44
Figure 16. Titration de l'antisérum de lapin immunisé avec la XOR par l'ELISA indirecte.....	44
Figure 17. Courbe d'étalonnage utilisée pour déterminer la concentration des IgG et des IgM anti-XOR, FR libre et complexe du sérum standard	46
Figure 18. (A) Comparaison entre la concentration des IgG et des IgM anti-XOR libres dans les sérums, et (B) les liquides synoviaux des patients atteints d'inflammations articulaires.....	48
Figure 19. Comparaison entre les concentrations des XORIC : (A) IgG, (B) IgM dans le sérum et dans le liquide synovial des patients atteints d'inflammations articulaires.....	53
Figure 20. (A) Comparaison entre la concentration des XOR-IC contenant les IgG et les IgM	

dans le sérum et (B) dans le liquide synovial des patients atteints d'inflammations articulaires.....	55
Figure 21. (A) Comparaison entre les concentrations des XOR-IC (IgG et IgM) sériques, (B) ainsi les XOR-IC (IgG et IgM) dans le LS chez des patients atteints d'inflammations articulaires.....	57
Figure 22. (A) comparaison des titres (mg/ml) du FR libre entre le liquide synovial, (B) ainsi que celle du FR complexe des patients atteints d'inflammations articulaires.....	60
Figure 23. (A) Comparaison entre les titres du FR libre dans le sérum et dans le LS des patients atteints d'inflammations articulaires, et (B) celle du FR complexe.....	61

Liste des Tableaux

Tableau 1. Taux des IgG et IgM anti-XOR libres et complexés avec la XOR, et le FR (IgM)	
libre et en complexe dans le sérum standard Z1.....	45
Tableau 2. Concentrations des IgG et IgM anti-XOR libres dans les couples de sérums et des	
liquides synoviaux des patients atteints d'inflammations articulaires.....	46
Tableau 3. Concentration des complexes immunitaires XOR-IgG et XOR-IgM déterminés par	
ELISA dans les couples des sérums et des liquides synoviaux des patients atteints	
d'inflammations articulaires.....	52
Tableau 4. FR libre et complexe déterminés par l'ELISA dans les couples des sérums et des	
liquides synoviaux des patients atteints d'inflammations	
articulaires.....	58

Sommaire

Introduction	11
1. Arthrite rhumatoïde	315
1.1. Structure de l'articulation normale	315
1.1.1. Le cartilage hyalin	315
1.1.2. La membrane synoviale	416
1.1.3. Le liquide synovial	517
1.2. Etiologie de l'arthrite rhumatoïde	5
1.2.1. Susceptibilité génétique	522
1.2.2. Facteurs de risques environnementaux	917
1.2.3. Influence du sexe sur l'arthrite rhumatoïde	1017
1.3. Modifications synoviales et sériques	1224
1.3.1. Modifications de la membrane synoviale	1224
1.3.2. Modifications du liquide synovial	1527
1.3.3. Modifications sériques	1628
2. Les arthrites touchant les articulations synoviales	2032
2.1. Arthrites dégénératives ou ostéoarthrite	2032
2.2. Arthrites inflammatoires	2335
2.2.1. Spondylarthrite séronégative	2436
2.2.2. Arthrites métaboliques	2638
3. Rôle de la XOR dans les maladies rhumatismales	2840
Matériel et méthodes	32
1. Matériel	3244
1.1. Animaux et échantillons biologiques	3244
1.2. Réactifs	3244
2. Méthodes	3345
2.1. Purification de la Xanthine oxydoréductase	3345
2.1.1. Obtention de l'extrait brut	3345
2.1.2. Purification de l'enzyme sur colonne d'héparine–agarose	3446
2.2. Contrôle de pureté de la XOR	3446
2.2.1. Spectre d'absorbance UV-VIS	3446

2.2.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du SDS.....	3446
2.3. Activité enzymatique de la xanthine oxydoréductase.....	3547
2.4. Préparation des anticorps anti-XOR par immunisation de lapins.....	3648
2.5. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) pour le dosage des anticorps anti-XOR.....	36.
2.6. ELISA pour le dosage des complexes XOR-anti-XOR.....	49
2.7. ELISA pour le dosage du facteur rhumatoïde.....	37.
2.8. Etude du sérum standard (sérum standard Std)	38.
2.9. Autres tests immunologiques.....	38.
2.9.1. Détection du facteur rhumatoïde par le test Latex.....	38.
2.9.2. Détermination de la concentration de la protéine C-réactive	52
2.10. Etude statistique.....	4052
Resultats et discussion	4153
1. Purification de la xanthine oxydoréductase	4153
2. Etude des anticorps de lapins anti-XOR	4355
3. Etude des anticorps anti-XOR dans des sérums et des liquides synoviaux chez des sujets atteints d'inflammations articulaires	4557
3.1. Etude des anticorps anti-XOR libres	4557
3.2. Etude des complexes immunitaires XOR-IC (IgG et IgM)	5264
4. Etude du facteur rhumatoïde libre et en complexe	5870
5. Mesure de la protéine C-réactive	75
Discussion générale.....	6577
Références bibliographiques.....	69.
Annexe 1.....	77.

Introduction

L'arthrite rhumatoïde est la plus commune des maladies inflammatoires chroniques affectant les articulations synoviales et peut toucher de 0.5 - 1 % de la population mondiale. Cette inflammation multifactorielle, d'une étiologie inconnue, conduit à la destruction irréversible de l'os et du cartilage articulaires contribuant de ce fait à une impotence fonctionnelle. Parfois, l'arthrite rhumatoïde ne se limite pas à la destruction de l'articulation mais peut toucher d'autres organes donnant naissance à des complications ayant comme résultat la diminution de l'espérance de vie d'environ de trois à dix ans. D'autre part, les spondylarthrites séronégatives, les arthrites métaboliques et les maladies dégénératives constituent, en plus de l'arthrite rhumatoïde, les maladies articulaires contemporaines qui menacent le jeune et le vieil individu. Ces maladies se différencient par la localisation anatomique des lésions inflammatoires mais partagent presque les mêmes modifications sériques et synoviales qui vont aboutir à la génération des auto-anticorps variés et qui peuvent servir comme des marqueurs utiles facilitant le diagnostic. Parmi ces anticorps, les anti-collagène, les facteurs rhumatoïdes, les anti-xanthine oxydase, ...

Toutes ces maladies articulaires se caractérisent par un processus inflammatoire qui semble être la conséquence d'une auto-immunité ou d'une libération de composants articulaires et d'enzymes au sein de l'articulation suite aux lésions tissulaires.

Il a été démontré que la xanthine oxydoréductase libérée lors de la destruction de la synoviale arthritique joue un rôle important dans les maladies rhumatismales *via* la production des espèces oxygénées réactives qui sont associées à plusieurs maladies dégénératives et inflammatoires. Cette libération induit la production d'anticorps spécifiques pouvant conduire à la formation de complexes immunitaires au niveau de l'articulation et favoriser le maintien de l'inflammation articulaire *via* l'activation du complément.

Le but de notre étude est d'une part, de chercher la présence d'une corrélation entre les taux des anticorps produits lors des arthrites inflammatoires dans les sérums et les liquides synoviaux des mêmes patients. D'autre part, les différences qui peuvent exister vont nous renseigner sur le site de leur synthèse et/ou la nature des échanges entre le compartiment sanguin et l'articulation à travers la synoviale enflammée. Pour traiter cette problématique, les objectifs suivants ont été fixés :

- Recherche des anticorps anti-XOR libres et complexes dans des couples de sérums et liquides synoviaux de patients atteints d'inflammations articulaires (polyarthrite rhumatoïde, arthrites et arthrose).
- Détection et dosage du facteur rhumatoïde (IgM) dans les mêmes couples de sérums et liquides synoviaux.
- Recherche d'une relation entre le taux de ces anticorps et leur localisation, et la sévérité de l'inflammation articulaire.

1. Arthrite rhumatoïde

L'arthrite rhumatoïde (AR) ou polyarthrite (PR) est une maladie auto-immune caractérisée par une inflammation chronique qui affecte les articulations (Caspi *et al.*, 2006) conduisant à une dégradation irréversible de l'os et du cartilage (Pullerits *et al.*, 2007) et par conséquent à une déformation de l'articulation donnant naissance à un handicap sévère (Bernard Combe, 2004).

L'AR ne se limite pas à la destruction des articulations. En effet, des effets systémiques peuvent se manifester notamment la fatigue, la perte de poids et l'anémie. En plus, des anomalies immunologiques extra-articulaires peuvent se répandre pour toucher d'autres systèmes d'organe, la raison pour laquelle l'espérance de vie chez les patients d'AR diminue d'environ de trois à dix. En effet, la cause principale de mortalité chez les atteints de l'AR provient des complications cardiovasculaires, infectieuses, hématologiques, gastro-intestinales et pulmonaires (El Desoky, 2001 ; Tobon *et al.*, 2010).

L'AR est une maladie complexe multifactorielle d'une étiologie inconnue et qui peut affecter 0,5 - 1 % de la population mondiale dont les femmes sont de trois à quatre fois plus touchées que les hommes et la maladie peut apparaître à n'importe quel âge de l'adulte sachant que l'incidence augmente avec l'âge (Witten *et al.*, 2000 ; Engdahl *et al.*, 2010).

1. 1. Structure de l'articulation normale

1.1. 1. Le cartilage hyalin

Le cartilage articulaire représente un type de tissu unique d'une épaisseur de quelques millimètres, constitué par un seul type de cellules nommées les chondrocytes (Lorenz et Richter, 2006). Il est non vascularisé et ne contient pas de fibres nerveuses, les nutriments et les composants cellulaires de réparation sont transportés aux chondrocytes par diffusion à partir du liquide synovial (LS) (Lorenz et Richter, 2006). A l'état normal, le cartilage est

composé de plus de 70 % d'eau, et puisque les chondrocytes constituent moins de 5 % de tout le volume, le cartilage articulaire se compose principalement de matrice extracellulaire (MEC) (Pool, 2003). Les constituants macromoléculaires principaux de la MEC semblent être le collagène de type II et les protéoglycanes (Holland et Mikos, 2003). Selon Pool (2003), les fonctions principales du cartilage articulaire sont liées aux propriétés mécaniques de la MEC. En effet, Les fibres de collagène sont organisées sous forme de réseau complexe où se baignent les protéoglycanes chargés négativement imbibant de l'eau (Holland et Mikos, 2003). Un équilibre est créé entre les forces générées par la pression du gonflement des protéoglycanes et la force de tension du réseau de collagène (Ostergaard et Salter, 1998). Quand une articulation synoviale est en charge, le cartilage articulaire se déforme et comme la charge des protéoglycanes sera introduite dans une proximité plus étroite, l'eau est donc expulsée du cartilage articulaire (Ostergaard et Salter, 1998). Quand la charge est éliminée, les protéoglycanes imbibent de l'eau de nouveau jusqu'à un équilibre chargé est atteint (Ostergaard et Salter, 1998). De ce fait, la pression du gonflement est augmentée et équilibre, par la suite, la charge appliquée empêchant tout mal dont il peut se produire dans l'articulation (Ostergaard et Salter, 1998).

1.1.2. La membrane synoviale

La synoviale est un tissu conjonctif recouvrant les surfaces articulaires et les ligaments intra-articulaires. Elle est composée d'une couche fine bordante "intima ou lining layer" non vascularisée qui sépare la cavité articulaire d'un tissu connectif plus profond de la capsule articulaire (Colantuoni *et al.*, 2005). La membrane synoviale contient au moins deux types de cellules : les cellules de type macrophage qui ont des activités de phagocytose, et les cellules de type fibroblastes qui synthétisent les protéines matricielles et l'acide hyaluronique constitutifs du LS (Colantuoni *et al.*, 2005 ; Mor *et al.*, 2005).

1.1.3. Le liquide synovial

Le liquide synovial est le liquide qui se trouve dans l'articulation, peu abondant, très visqueux, transparent et difficile à aspirer (Damiano et Bardin, 2004). Il est synthétisé principalement par les synoviocytes de la couche bordante de la membrane synoviale " lining layer " où sa fonction principale est de lubrifier l'articulation, minimiser l'adhésion et aider de fournir les mouvements de l'articulation presque sans frictions (Poole, 2003). Le LS constitue aussi une source de nutriments biochimiques pour les surfaces articulaires peu vascularisées (Macmullan *et al.*, 2011). Sa composition est schématiquement celle d'un infiltrat du plasma, pauvre en cellules mais enrichi en acide hyaluronique avec une composition ionique identique. En cas d'inflammation de la membrane synovial, la production de l'acide hyaluronique sera augmentée sous l'action des molécules proinflammatoires (Poole, 2003 ; Damiano et Bardin, 2004). D'autre part, l'inflammation articulaire augmente la perméabilité vasculaire synoviale permettant donc le passage des protéines du sang vers le LS (Damiano et Bardin, 2004). Inversement, les protéines du liquide synovial peuvent passer dans la circulation générale par drainage lymphatique (Damiano et Bardin, 2004).

1.2. Étiologie de l'arthrite rhumatoïde

L'AR est une maladie hétérogène complexe qui semble être le résultat d'une combinaison entre la prédisposition génétique, l'âge et l'exposition à un déclenchement environnementale approprié tel que les agents infectieux. Le tabagisme, l'obésité (régime alimentaire) et la transfusion sanguine sont également considérés comme facteurs de risque (Ollier *et al.*, 2001).

1.2.1. Susceptibilité génétique

L'AR est un désordre multi-systémique d'une étiologie complexe dont le risque de développement chez les enfants des individus affectés de cette maladie est 2 à 17 fois plus élevé que ceux des individus non affectés. Cette différence significative indique qu'ils

existent des gènes qui constituent le terrain prédisposant à l'atteinte par cette maladie (van Gaalen *et al.*, 2004). Des études génétiques ont démontrées que la région des gènes codants pour le complexe HLA de la classe II, connu aussi comme le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), localisée au niveau du chromosome 6 est fortement associée à l'AR (**Figure 1**), en particulier le locus HLA-DRB1 (Gladman *et al.*, 2001). Les chercheurs ont été curieux de connaître la caractéristique menée par les allèles HLA-DRB1 (HLA-DRB1*0401, *0404, *405, *0101, *0102, *01001, *01402) dont leur présence est impliquée dans la maladie. Ils ont trouvé que ces multiples allèles codent pour une séquence conservée d'acides aminés (QK /RAA : Gln Lys/Arg Ala Ala), nommée le motif conservé (The shared epitope ; SE), en position 70-74 dans la troisième région hypervariable de la chaîne β du HLA-DR (de Rycke *et al.*, 2004 ; Wakitani *et al.*, 1997).

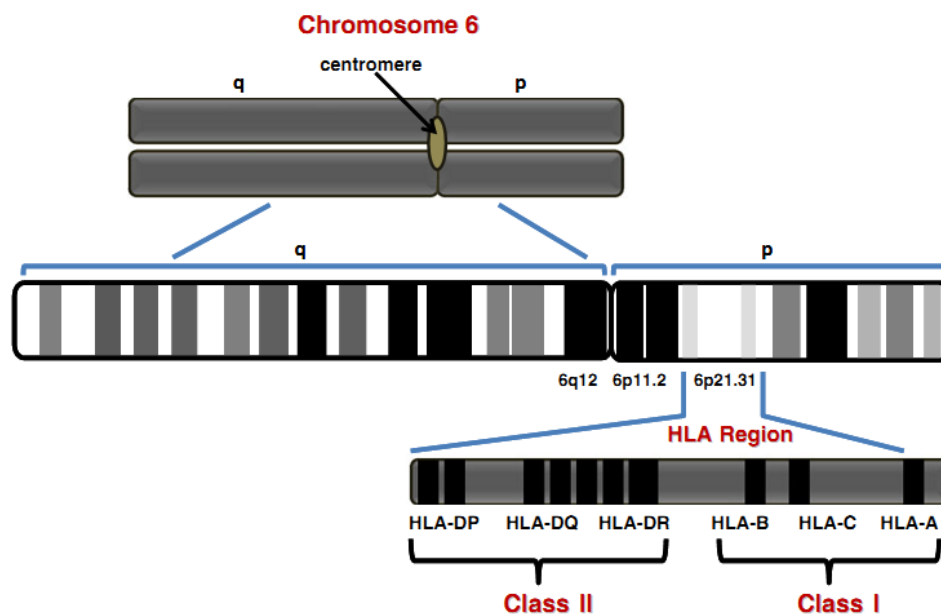


Figure 1. Diagramme schématisique de la région des gènes codants pour l'antigène leucocytaire humain sur le chromosome 6. La région HLA est localisée sur le petit bras du chromosome 6, en 6p21, 31 (McCarty *et al.*, 2010).

En se basant sur le rôle connu des molécules HLA de la classe II dans la présentation de l'antigène, Hill *et al.*, (2003) ont prédit que le SE chargé positivement prédispose à l'AR en contribuant à la formation de l'une des poches de la chaîne β qui servent à ancrer le peptide "arthritogénique" (**Figure 2**) et à le présenter aux lymphocytes T qui constituent les cellules actrices dans l'initiation de la réponse auto-immune de la pathogénèse de l'AR. Néanmoins, de Almeida *et al.* (2011) ont rapporté que les auto-antigènes dans le cas d'AR n'ont pas été définis clairement jusqu'à l'an 2011.

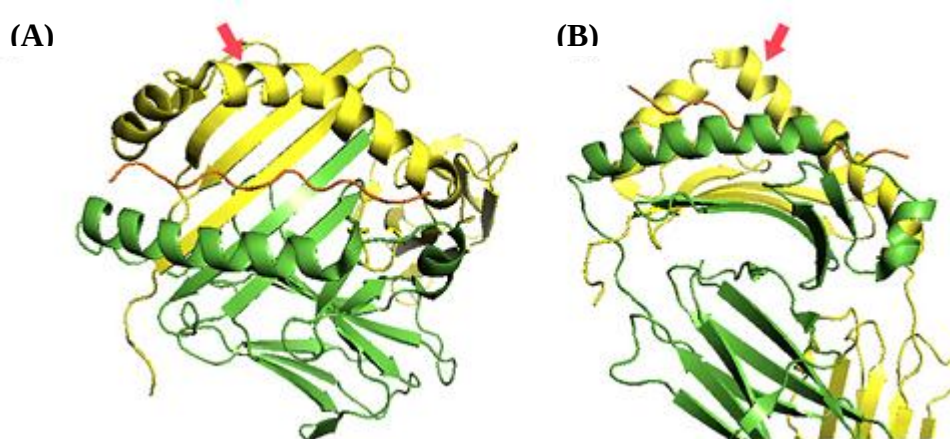


Figure 2. Structure du motif conservé lié à l'AR. **(A)** vue supérieure d'une molécule HLA-DRB1 montre le SE (motif conservé). La chaîne α est montrée en vert, la chaîne β en jaune et le peptide cannelure en marron. La flèche rouge se dirige vers une boucle hélicoïdale α contenue dans le SE. **(B)** Vue de coté de la même molécule. Noter la localisation du SE près du repli de la chaîne β (de Almeida *et al.*, 2011).

L'association de l'AR à l'HLA-DR4 n'est pas universelle du fait qu'une étude de l'expression clinique de la maladie réalisée par Massardo *et al.* (1995) sur des patients Chiliens n'a pas montrée une forte relation. D'autre part, plusieurs études ont suggéré que le SE est associé à la sévérité de la maladie beaucoup plus qu'à la susceptibilité, particulièrement le risque d'être séropositif en facteurs rhumatoïdes (FR), en anticorps anti-peptide /protéine citrulliné(e) (ACPA) et la fréquence des manifestations extra-articulaires

(Ollier *et al.*, 2001; Auger *et al.*, 2005). Cependant, il y a une tendance où le patient avec deux doses de SE (SE est présent deux fois) souffre plus d'agressivité (Dixon et Symmons, 2005), la théorie qui est confirmée par les travaux de Rojas-Villarraga *et al.* (2009) où ils ont remarqué que les patients ayant deux SE manifestent un dommage radiographique au niveau des articulations plus précoce que ceux ayant un seul SE, la même constatation est faite en comparant les patients ayant un seul SE avec ceux qui ne l'ont pas.

Indépendamment du HLA, les études récentes sont focalisées sur la recherche d'une association d'autres types de gènes avec le développement de l'AR, parce que le système HLA représente approximativement 37 % de l'influence génétique (Zanelli *et al.*, 2001). Étant donné l'importance des cytokines dans l'AR, il n'est pas étonnant que beaucoup de ces études soient focalisées sur leurs gènes. Dans ce contexte, les polymorphismes d'un simple nucléotide (SNPs) au niveau de la région 'promoteur' ou la région codante de plusieurs gènes, ont été intensivement étudiés (Firestein, 2008). Le SNP du gène TNF α en position -308 a fourni l'association génétique des cytokines la plus intéressante. En fait, une mutation qui affecte la région 'promoteur' du gène de TNF α sur le chromosome 6 et qui peut altérer la transcription du gène en définissant deux allèles : TNF α 1 dans lequel une guanine est présente et TNF α 2 où la guanine est substituée par une adénine, ces dernières déterminent un taux bas ou élevé d'expression de TNF α , respectivement (Aguillon *et al.*, 2006).

Le SNP du gène PTPN22 (Protéine tyrosine phosphatase non récepteur type 22) localisé sur le chromosome 1 p13 est l'un des associations génétiques non-HLA et non-cytokine décrite pour l'AR. Ce gène code pour une protéine tyrosine phosphatase spécifique du lymphoïde "LYP" qui agit comme un régulateur négatif puissant de l'activation des cellules T. La substitution de la base cytosine par une thymine en position 1856 de ce gène code pour un tryptophane au lieu d'une arginine en position 620 de 'LYP' (Pratt *et al.*, 2009). Cette substitution se trouve dans l'exon codant pour le premier domaine riche en proline de 'LYP' qui est impliqué dans

l'association de cette enzyme avec le domaine SH3 d'une autre enzyme, la kinase Cs (CsK) qui est responsable de l'activation de 'LYP'. Par conséquence, le variant tryptophane rompt l'interaction entre 'LYP' et CsK entraînant une diminution de l'activation de 'LYP', ce qui conduit à la stimulation des cellules T et la prédisposition à l'auto-immunité chez les porteurs de tryptophane 620 (Majorczyk *et al.*, 2010).

Peptidylarginine deiminase (PAD) est l'enzyme responsable de la citrullination de plusieurs protéines (Filaggrine, vimentine, fibrine, fibrinogène et le collagène type II), le phénomène qui est remarqué au niveau des articulations des patients atteints de l'AR où l'analyse de leur ponction articulaire montre un taux élevé d'ACPA. Tous les gènes de PAD sont localisés sur le chromosome 1p36 (Stenberg *et al.*, 2009).

1.2.2. Facteurs de risque environnementaux

La contribution génétique à l'AR ne compte pas plus de 60 %, ce qui indique fortement que les facteurs environnementaux jouent un rôle majeur dans l'étiologie de la maladie. Les facteurs environnementaux peuvent être classés en deux catégories : facteurs environnementaux régionaux incluant la géographie, le climat et les microbes endémiques, et facteurs environnementaux socioculturels tel que le style de vie, le tabagisme et les habitudes diététiques (Perricone *et al.*, 2011). Il a été noté que le tabagisme est associé à la production des ACPA et des FR (Tobon *et al.*, 2010) mais uniquement quand l'AR est caractérisée par un allèle HLA-DRB1 portant l'épitope de susceptibilité à l'AR (Fabien *et al.*, 2008). D'autre part, Tobon *et al.* (2010) ont attribué le développement de l'AR aux plusieurs micro-organismes en se basant sur les titres élevés d'anticorps appropriés chez les patients. Cependant, il n'existe pas un micro-organisme particulier responsable du développement de cette maladie. Parmi les agents infectieux, le virus Epstein-Barr (EBV), un candidat puissant qui peut agir aux plusieurs niveaux dans la pathophysiologie de l'AR. L'organisme hôte contrôle alors l'infection par EBV via une réponse immunitaire à médiation cellulaire

notamment les Lymphocytes CD8⁺ et une réponse humorale par la production des anticorps dirigés contre les antigènes viraux (Toussiro et Roudier, 2007). *Staphylococcus aureus* est aussi la bactérie responsable de plus de 80 % des infections articulaires chez les patients d'AR en plus des bactéries Gram-positives qui sont des inducteurs potentiels de la sécrétion des TNF α par les macrophages (Favero *et al.*, 2008). Le régime alimentaire riche en poissons, l'huile d'olive et les légumes cuits montrent un effet protecteur contre l'AR, un effet attribué au contenu élevé en acides gras ω 3 (Tobon *et al.*, 2010).

1.2. 3. Influence du sexe sur l'arthrite rhumatoïde

L'AR est l'une des nombreuses maladies auto-immunes chroniques prédominantes chez les femmes dont le rapport des patients femelles aux ceux masculins (2-4 : 1) est significatif (Khurana et Berney, 2005). Le mécanisme par lequel le sexe peut influencer la susceptibilité à la maladie est inconnu, mais la déférence d'hormones sexuelles entre les deux sexes peut être impliquée. En effet, l'âge maximal d'un début d'AR chez les femmes est la cinquième décennie, ce qui convient au moment des changements hormonaux durant la ménopause (Tobon *et al.*, 2010). En plus, les hormones sexuelles semblent avoir un effet significatif sur les cellules connues être impliquées dans l'AR (Firestein, 2008), en particulier l'œstrogène qui stimule le système immunitaire (Tobon *et al.*, 2010). Plusieurs études ont montrées que l'exposition des cellules B productrices des auto-anticorps à l'estradiol rend ces cellules plus résistantes à l'apoptose suggérant que les clones des cellules B auto-réactive échappent à la tolérance (Firestein, 2008). Ainsi, l'œstrogène stimule, d'une part, ses récepteurs à la surface cellulaire des synoviocytes (fibroblaste-like) augmentant donc la production des métalloprotéinases (MMPase) dans la membrane synoviale (Firestein, 2008), et d'une autre part, elle agit sur les macrophages en augmentant la production du TNF α . Ostensen et Villiger (2002), prenant compte les résultats de plusieurs études, rapportent que la grossesse induit une amélioration ou même la remise de l'activité de la maladie chez 75 % des patients

de l'AR. Alors qu'au cours des premiers six mois après l'accouchement, la réactivation de la maladie se produit chez 90 % des patients. Le mécanisme de protection chez les femmes enceintes n'est pas défini mais Ostensen et Villiger (2002) ont attribué cette amélioration à deux hypothèses :

- La polarisation des cellules T de type H2 (Th2) conduisant l'inhibition des cytokines pro-inflammatoires au niveau des articulations enflammées par les récepteurs solubles des cytokines, par les cytokines anti-inflammatoires l'IL-4 et IL-10 ou par les facteurs de croissance comme TGF- β .
- L'induction des cellules T régulateurs (Population de cellules T qui suppriment la réponse des cellules T par la production des IL-10 et TGF- β) ce qui conduit à une diminution des auto-anticorps.

Selon Zrour *et al.* (2010), la réactivation de l'AR après l'accouchement est due aux taux élevés de la prolactine, l'hormone de l'allaitement, qui induit l'initiation et l'augmentation du processus inflammatoire ainsi que la chute rapide des hormones stéroïdiennes anti-inflammatoire.

Il y a certaines évidences que les femmes prenant la pilule contraceptive orale dans le passé, peuvent être protégées contre le développement d'une AR sévère ou dans le moindre l'apparition de la maladie sera retardée. Cette théorie est confirmée par le fait que l'âge maximale de l'apparition de l'AR chez les femmes est plus haut que chez les hommes (Ollier *et al.*, 2001).

1.3. Modifications synoviales et sériques

1.3.1. Modifications de la membrane synoviale

L'AR se caractérise par une inflammation de la membrane synoviale ou synovite. Ce processus inflammatoire implique de nombreux acteurs cellulaires et extracellulaires. Les cellules qui tiennent le rôle vedette dans la physiopathologie de l'AR sont présentées par les cellules présentatrices de l'antigène, les lymphocytes T, les lymphocytes B et les synoviocytes (Morel *et al.*, 2004). Dans un premier temps, les cellules dendritiques qui expriment à leur surface des molécules de CMH II (Cellules présentatrices professionnelles du système immunitaire) présentent l'antigène "arthritogène" d'une manière anormalement prolongée aux lymphocytes T auto-réactives (Morel *et al.*, 2004) qui seront recrutées à partir du sang périphérique et infiltrées à travers la membrane synoviale (Vega *et al.*, 2007). Ces lymphocytes T, nouvellement arrivées dans la synoviale, produisent IL-1 et TNF α qui activent les cellules résidentes (macrophages et fibroblastes) et les lymphocytes B infiltrés à travers la membrane synoviale (Morel *et al.*, 2004 ; Panayi, 2005). L'activation des lymphocytes B joue un rôle crucial dans l'amplification de la réaction inflammatoire par la production de certains auto-anticorps, tels que les FR, les anticorps anti-collagène et les anticorps dirigés contre les protéines citrullinées (Morel *et al.*, 2004 ; Westman *et al.*, 2006) et qui vont à leurs tour amplifier le développement de la maladie en formant des complexes immunitaires avec les auto-antigène (Firestein, 2003). Ces complexes immunitaires fixent et activent le complément permettant donc la libération des facteurs chimiotactiques (Daha *et al.*, 2011), qui déclenchent plutard, l'accumulation des cellules inflammatoires en particulier les neutrophiles libérant des enzymes protéolytiques (Morel *et al.*, 2004). Tous ces événements conduisent à la formation d'un pannus invasif ou l'hyperplasie synoviale (**Figure 3 et 4**) qui est à l'origine de la destruction du cartilage et de l'os adjacent (Mor *et al.*, 2005).

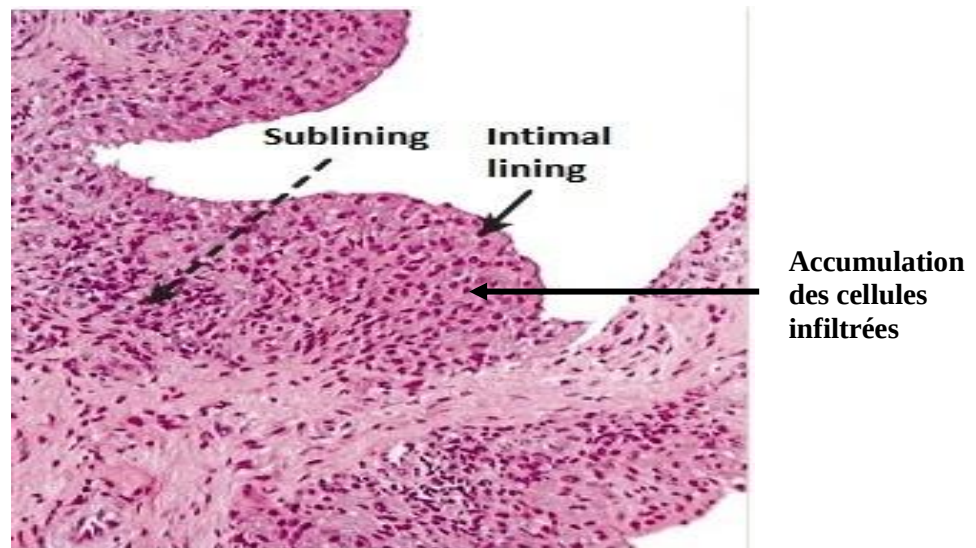


Figure 3. Histologie d'une membrane synoviale arthritique. La flèche continu indique l'hyperplasie de la couche bordante (intimal lining) de la membrane synoviale, la flèche discontinue indique l'infiltration de la couche fondamentale (sublining) de la membrane synoviale (Firesein, 2003).

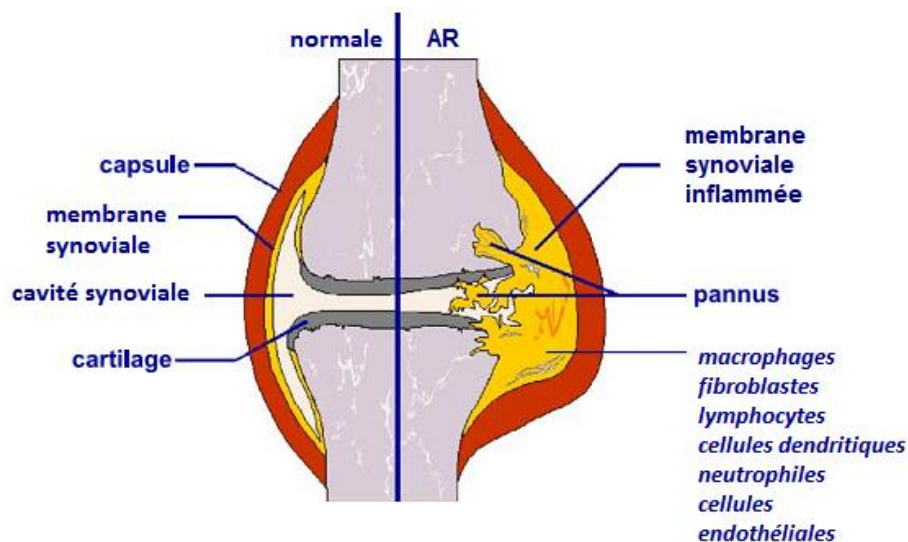


Figure 4. Schéma d'une articulation saine (gauche) et d'une autre enflammée (droit) dans l'AR. Au cours de la progression de l'AR, la membrane synoviale forme un tissu prolifératif "pannus " qui détruit l'articulation (Nijenhuis *et al.*, 2004).

D'autre part, la néo-angiogenèse caractérisée par la croissance et la prolifération d'un nouveau réseau vasculaire au sein du pannus synovial est impliquée dans de nombreux

aspects de la physiopathologie de la synovite rhumatoïde (Ozgocmen *et al.*, 2004). Elle favorise la croissance du pannus synovial et augmente les phénomènes inflammatoires qui aboutissent à la destruction ostéo-cartilagineuse (Ozgocmen *et al.*, 2004). De même les lymphocytes T activées entretiennent l'inflammation *via* la sécrétion de médiateurs solubles comme l'IL-17 et l'interféron γ (IFN γ). L'IL-17 est impliqué dans l'activation des ostéoclastes et par conséquent l'érosion de l'os, alors que l'IFN γ stimule les macrophages pour sécréter un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6 et TNF α (Panayi, 2005). Ces cytokines contrôlent la production de nombreuses cytokines (facteurs de croissance des fibroblastes et de l'endothélium vasculaire) qui favorisent l'angiogenèse, le recrutement des cellules inflammatoires et la stimulation des fibroblastes synoviaux (Mor *et al.*, 2005). La sécrétion des enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire par les fibroblastes stimulés est une des conséquences de l'inflammation chronique, ces enzymes ont pour cible les fibres de collagène qui constituent le cartilage articulaire (Panayi, 2005). La **figure 5** représente les différentes étapes de l'inflammation articulaire.

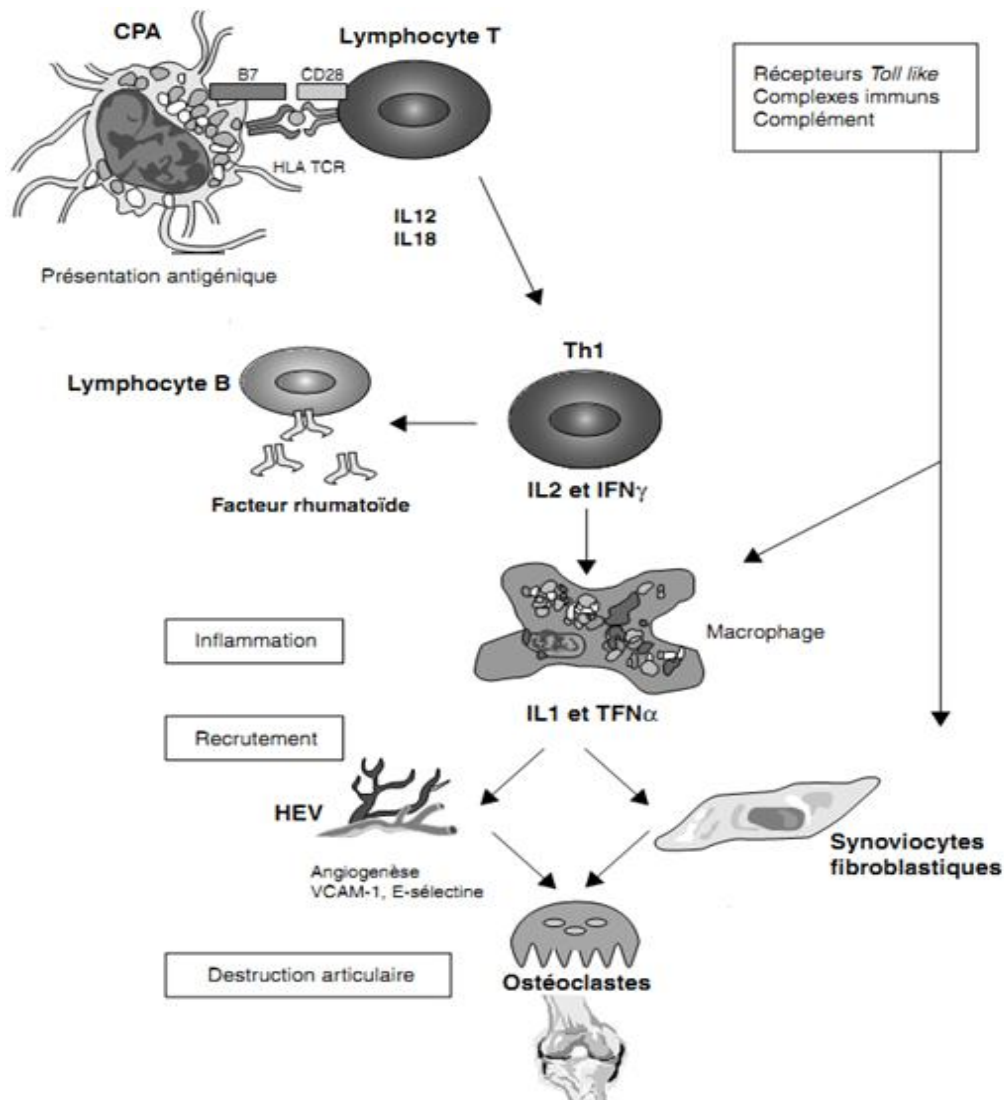


Figure 5. Différentes phases de la pathophysiologie de l'AR (Morel *et al.*, 2004). HLA : l'antigène leucocytaire humain; IL : interleukine ; IFN: interféron; TNF: tumor necrosis factor ; HEV : high endothelial veinule (veinule postcapillaire); VCAM: Vascular cell adhesion molecules; PG : prostaglandine; MMP : matrix metalloproteinases ; TCR : T cell receptor.

1.3.2. Modifications du liquide synovial

Le liquide synovial des inflammations articulaires, typiquement jaune, se caractérise par un aspect trouble ou nuageux résultant d'une infiltration des cellules inflammatoires au sein de la cavité articulaire. Le nombre des cellules blanc est > 20000 cellules/mm dont les neutrophiles sont les cellules majoritaires (Dao et cusch, 2006). L'inflammation articulaire augmente la

perméabilité vasculaire synoviale permettant aux protéines du LS de passer dans la circulation générale par drainage lymphatique. (Damiano et Bardin, 2004).

1.3.3. Modifications sériques

Le diagnostic de l'AR est avant tout clinique, mais il n'est confirmé que lors de l'apparition des arthrites chroniques parfois destructrices. L'évolution de la stratégie thérapeutique justifie de faire le diagnostic le plus vite possible car il a été démontré qu'un traitement précoce permet d'éviter le plus souvent les destructions ostéoarticulaires. Cependant, les auto-anticorps circulants tels que les FR, les anti-collagènes et les anticorps anti-peptide cyclique citrulliné (ACPA) qui apparaissent au cours de l'AR peuvent être utilisés comme des marqueurs sérologiques utiles facilitant le diagnostic de la maladie, en plus de la CRP qui constitue le meilleur marqueur pour dépister un processus inflammatoire (van Boekel *et al.*, 2002 ; Roger *et al.*, 2009).

a. La protéine C-réactive

La protéine C-réactive (CRP) est le prototype d'une série de protéines de la phase aiguë et qui est produite principalement par le foie en réponse à une stimulation par l'IL-6. Des taux sériques élevés en CRP peuvent être détectés immédiatement après quatre à six heures suite à une lésion tissulaire (Otterness, 1994 ; van Leeuwen *et al.*, 1995). La CRP se trouve sous forme de trace de 0.2 à 0.8 mg/dl chez les sujets normaux comme elle peut augmenter pour atteindre des taux supérieurs à 40 mg/l chez les patients qui souffrent d'inflammations sévères ou d'infections (Otterness, 1994 ; Sipe, 1995). Il a été démontré que des taux élevés de la CRP ont été observés dans le sérum des patients atteints de l'AR, le plus souvent pendant les deux ans qui précèdent le début des symptômes (Saleem *et al.*, 2006). La CRP remplit différentes fonctions de défense immunitaire non spécifique. Elle peut opsoniser les polysaccharides C, activer efficacement le complément par la voie classique (Falgarone *et al.*, 2005) et jouer un rôle dans l'immunité innée en activant les phagocytes *via* des récepteurs

exprimés à leur surfaces (Falgarone *et al.*, 2005). En plus, la liaison de la CRP avec les glycoprotéines n'est réalisée qu'à un pH trouvé dans les tissus enflammés ou détruits par le phénomène d'ischémie-reperfusion, sous ces conditions la CRP peut lier des glycoprotéines comme les laminines, les fibronectine et le fibrinogène qui sont trouvés dans les sites d'inflammations (Otterness, 1994).

b. Facteur rhumatoïde

Le FR est le marqueur le plus classique de l'AR, il a été découvert depuis 50 ans (Waalder, 1940) et constitue l'un des critères proposés par le collège Américain de rhumatologie pour la classification et le diagnostic de l'AR (Saleem *et al*, 2006). Les FR peuvent être présents chez 75 % des patient de l'AR mais leur spécificité reste limitée, du fait que ces auto-anticorps peuvent être rencontrés dans d'autres maladies autoimmunes (Syndrome de Sjögren) et infectieuses (Hépatite, tuberculose), comme ils peuvent être détectés dans une certaine mesure chez la population saine (3 – 5 %) et les individus vieux en bonne santé (10 – 30 %) (van Boekel *et al.*, 2002). L'usage du test sérologique en FR comme un diagnostic précoce de l'AR est de faible sensibilité puisque le FR peut être détecté quelques années avant la manifestation des symptômes de la maladie seulement chez une petite catégorie de patients (Dao et Cush, 2006).

Les FR constituent une famille hétérogène d'auto-anticorps dont l'IgM, l'IgG et l'IgA dirigées contre les IgG sont les plus communs, malgré que les essais d'agglutination tendent à favoriser la détection d'IgM. Ces FR ont en commun la spécificité de reconnaître la région Fc des IgG1, IgG2 et IgG4 mais pas IgG3 (Graham *et al*, 1998 ; Saleem *et al*, 2006). Ces auto-anticorps ont été traditionnellement détectés par l'agglutinement des globules rouges de moutons (Rose, 1948 ; Firestein, 2003), tandis que les tests d'agglutination moderne tendent à utiliser les billes de latex (Arrar *et al.*, 1995 ; Saleem *et al*, 2006). Les patients d'AR, dont le test de détection du FR a montré des résultats positifs, sont considérés comme séropositifs.

Cependant, ceux qui ont des résultats négatifs en FR ne sont pas exclus d'avoir un AR en cas de présence d'autres critères et sont considérées comme des séronégatifs (Saleem *et al.*, 2006). Environ 80 % de patients qui ont une AR stable sont séropositifs pour le FR, et sa présence avec un titre plus élevé prédit un développement plus agressif et plus destructif de la maladie (Firestein, 2003).

c. Les anticorps anti-peptide cyclique citrulliné

Les anticorps anti-peptide cyclique citrulliné sont les auto-anticorps les plus spécifiques de l'AR constituant de ce fait une avancée majeure pour le diagnostic de cette maladie (Nijenhuis *et al.*, 2004). Ils peuvent être présents chez plus de 80 % des patients de l'AR mais d'une manière primordiale sont présents seulement chez 0 – 1 % des sujets sains et chez 2 – 5 % des sujets malades (Saleem *et al.*, 2006). Les ACPA peuvent être détectés très précocement, des années avant la manifestation des premiers symptômes cliniques de la maladie (Nijenhuis *et al.*, 2004). Chez les patients avec des arthrites non différenciés, 93 % parmi ceux qui sont positifs en ACPA sont diagnostiqués d'avoir un AR au bout d'une année (Saleem *et al.*, 2006).

L'histoire des ACPA est déjà longue ; en 1964, un système d'anticorps hautement spécifique de l'AR dirigé contre un composant protéique présent dans les granules cytoplasmiques des cellules différenciées de la muqueuse buccale a été observé (Syed *et al.*, 2008). L'antigène est désigné sous le nom de facteur périnucléaire alors que l'activité d'anticorps est devenue notoire en tant qu'anti-facteur périnucléaire (AFP), ces AFP combine entre une haute sensibilité (selon les patients étudiée, ils peuvent être présentes chez 49 % - 91 % des patients d'AR) et une forte spécificité qui peut aller de 73 % jusqu'à 99 % (van Boekel *et al.*, 2002). L'essai des AFP n'est jamais devenu populaire à cause de plusieurs inconvénients parmi eux la difficulté d'interprétation des résultats obtenus par la mesure des anticorps par l'utilisation de l'immunofluorescence indirecte (van Boekel *et al.*, 2002). En suite, en 1979 (Fabien *et al.*,

2008), un groupe d'anticorps spécifique à l'AR nommés les anticorps anti-kératine (AAK) ont été décrit. Ces auto-anticorps marquent des structures kératine-like sur des coupes d'œsophage de rat mais ne reconnaissent pas des cytokératines comme il est suggéré par leur nom, et ils peuvent être détectés par immunofluorescence indirecte dans 36-59 % des sérums d'AR avec une sensibilité de 88 – 99 % (Fabien *et al.*, 2008 ; van Boekel *et al.*, 2002).

Au début des années 1990, des études immunohistochimiques ont démontré que les AFP et les AAK sont identiques et que l'auto-antigène ciblé par ces auto-anticorps est la filagrine (Saleem *et al.*, 2006). Cette dernière est une protéine impliquée dans l'organisation de la structure du cytosquelette dans les cellules épithéliales, synthétisée sous forme de précurseur phosphorylé, la profilagrine (van Boekel *et al.*, 2002). Au cours de la différenciation des cellules épithéliales, la profilagrine est partiellement déphosphorylée et clivée en 10-12 sous unités de filagrine (van Boekel *et al.*, 2002), et qui devient antigénique une fois déiminé (**Figure 6**). Ces modifications post-traductionnelles (Fréquentes au cours d'inflammations) touchent un résidu argininy l par peptidylarginine diéminase produisant alors un résidu citrullyl (Nijenhuis *et al.*, 2004 ; Syed *et al.*, 2008). La détection des ACPA dans le LS des patients d'AR a été réalisée plutard par la technique d'ELISA en employant des peptides cycliques citrullinés comme un antigène.

Plusieurs études ont trouvés que la filagrine citrullinée ciblée par les AFP et les AAK n'est pas exprimée dans la synoviale articulaire. Néanmoins, des investigations additionnelles ont démontrées la production locale des anticorps dirigés contre des protéines ou peptides citrullinés dans l'articulation au niveau du site enflammé (Nijenhuis *et al.*, 2004). Ces données indiquent qu'il existe des protéines autres que la filagrine et qui ont subi une citrullination au niveau de l'articulation (Nijenhuis *et al.*, 2004).

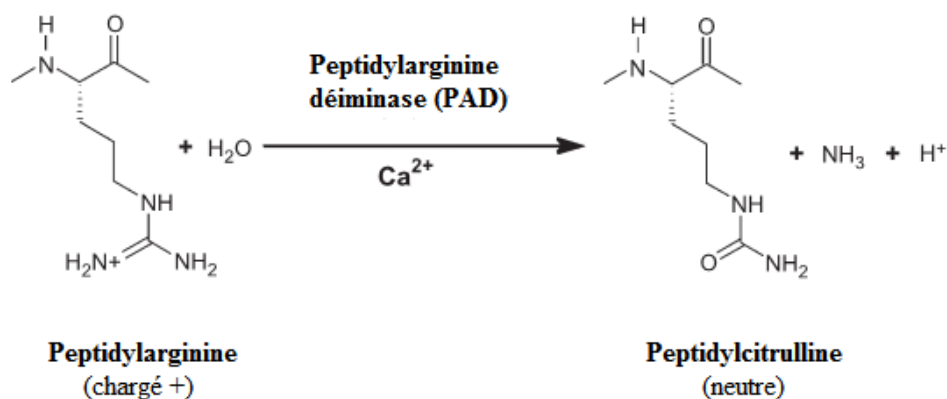


Figure 6. Conversion enzymatique de peptidylarginine en peptidylcitrulline par PAD. La conversion de l'acide aminé basique arginine en acide aminé neutre la citrulline est essentielle pour l'autogénéité de la filagrine (Nijenhuis *et al.*, 2004).

2. Les arthrites touchant les articulations synoviales

Les arthrites sont des inflammations qui touchent les articulations synoviales de milliers de gens entraînant une douleur, une incapacité et dans certaines conditions la mortalité. Il est très difficile de comprendre les arthrites parce qu'ils existent sous une centaine de formes reliées à diverses conditions dont les mécanismes et la réussite du traitement dépendent de leur bonne compréhension et classification (Hughes, 2008).

2.1. Arthrites dégénératives ou ostéoarthrite

L'ostéoarthrite (OA) est l'une des maladies les plus importantes dans le domaine des orthopédistes. C'est une maladie dégénérative plutôt qu'arthropathie inflammatoire, qui touche tous les tissus de l'articulation en particulier le cartilage et l'os sous-adjacent entraînant de ce fait une perte progressive du cartilage articulaire et une formation des ostéophytes résultant en des douleurs chroniques et des restrictions fonctionnelles de l'articulation affectée (Hughes, 2008). Plusieurs facteurs peuvent être impliqués dans le

développement de l'OA qui, dans la plus part du temps, sont les événements traumatiques causatifs, ainsi que d'autres facteurs comme la prédisposition génétique, les positions défectueuses de l'articulation, le vieillissement et la malnutrition (Lorenz et richter, 2006).

Du point de vue clinique on distingue :

- OA nodale de la main : qui affecte les articulations interphalangiennes proximales et distales de la main et selon Punzi *et al.* (2010), c'est la seule OA classifiée et proposée comme inflammatoire. Plusieurs signes cliniques peuvent apparaître incluant la douleur, le gonflement des tissus mous comme la membrane synoviale, la rigidité et des taux élevés en CRP.
- OA généralisée : terme utilisé pour décrire l'OA qui touche plusieurs articulations avec ou sans implication de la main, impliquant, le plus fréquemment, les articulations qui dégénèrent telle que les hanches, les genoux et les pieds (Vignon, 2000).

La **figure 7** illustre les processus catabolique et anabolique normaux du cartilage, un déséquilibre est ainsi créé entre ces deux processus lors de l'OA dont le mécanisme responsable de la dégradation du cartilage dans cette maladie s'effectue en trois étapes. Dans la première étape, Swales et Athanasou (2010) ont attribué l'apparition d'une OA précoce aux changements structuraux du cartilage articulaire, en effet sa teneur en eau est augmentée tandis que la quantité de son composant macromoléculaire majeur "protéoglycane" est diminuée sous l'action des enzymes de dégradation de la MEC exprimées de manière intense au niveau des chondrocytes. Cette étape se caractérise par la synthèse des facteurs de croissance et des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF- α) par la membrane synoviale et les chondrocytes, qui sont responsables de la synthèse des inhibiteurs des composants de la MEC. Tous ces événements se traduisent par une dégradation du collagène et des protéoglycanes et par conséquent la rigidité du cartilage sera réduite (Lorenz et richter, 2006 ; Swales et Athanasou, 2010). Dans la deuxième étape, les chondrocytes essaient de

réparer la lésion de la MEC en augmentant leur prolifération et leur activité métabolique (Lorenz et richter, 2006). Durant la troisième phase de progression de l'OA, les chondrocytes seront incapables de contrôler l'effet destructif exercé sur le tissu cartilagineux, l'os sous-chondrale exposé à la surface articulaire réagit avec les molécules de fibrines (régénération fibro-cartilagineuse) formant une sorte de kystes appelés les nodules ostéochondrales qui font distinguer l'OA des autres types d'arthrites (Lorenz et richter, 2006). Les fragments d'os et du cartilage générés à la surface articulaire déclenchent une réponse immunitaire par la membrane synoviale entraînant la formation d'un pannus, une sécrétion excessive du LS est produite et parfois des vaisseaux sanguins nouvellement envahis peuvent être trouvés facilitant l'infiltration des cellules inflammatoires au sein de l'articulation (Swales et Athanasou, 2010).

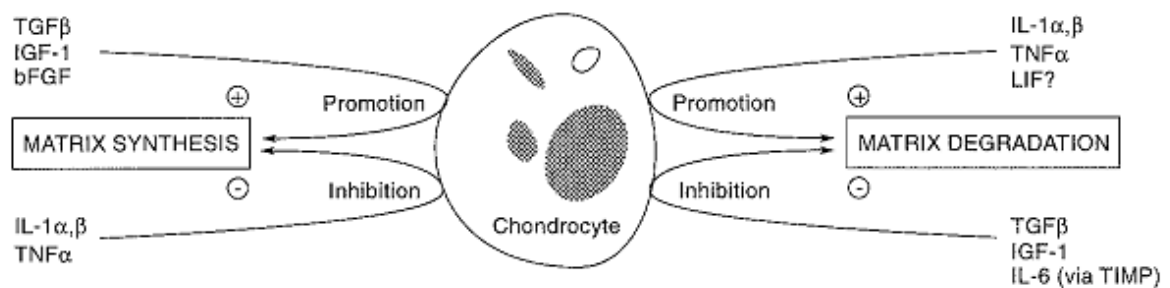


Figure 7. Contrôle de l'hémostase du cartilage par les cytokines. IL-1 (α et β) et TNF α agissent sur leurs récepteurs spécifiques à la surface des chondrocytes pour induire la synthèse des MMPase responsable de la dégradation de la MEC. Cette dégradation est inhibée par TGF- β et IGF-1 et indirectement par IL-6. Inversement TGF- β , IGF-1 et bFGF agissent aussi sur leurs récepteurs spécifiques, incitant les chondrocytes à produire les macromolécules de la MEC, cette production est inhibée par IL-1(α et β) et TNF α (Westacott et charif, 1996).

Au cours de la progression de l'OA, on observe une formation d'auto-anticorps dirigés contre les métabolites libérés dans l'articulation (Poole, 2003). Dans ce contexte, Myers (1999) a suggéré que la plus part des molécules utilisées comme marqueurs dans le diagnostic de l'OA sont libérées par le cartilage sous l'action des enzymes de dégradation de la MEC telles que

les collagénases (MMP-1), les gélatinases (MMP-2), stromelysine (MMP-3) et les collagénases des neutrophiles (MMP-8 et MMP-13). D'après poole (2003), ces protéases sont secrétées de manière intense au cours de l'OA, et leur mesure dans le LS par des essais immunologiques constitue un élément indicateur de la protéolyse des éléments tissulaires. l'OA se caractérise par un clivage excessif et progressif des fibres du collagène type II, ce clivage est réalisé par les collagénases type II et par d'autres protéases et a comme résultat la génération des néo-épitopes au niveau du site de clivage (Poole, 2003). L'apparition des néo-épitopes constitués par le groupement C-terminal et N-terminale entraîne une réponse immunitaire qui se manifeste par la production des auto-anticorps spécifiques pour le collagène (Poole, 2003). Les aggrécanes sont clivés par deux types de protéases, les MMPase et les aggrécánases dont les sites de clivage sont identifiés par des anticorps dirigés contre les épitopes nouvellement formés. La formation des auto-anticorps spécifiques pour les aggrécanes n'est pas réalisée seulement par leur clivage mais aussi par le changement structural des aggrécanes lié à la synthèse augmentée de la MEC (Poole, 2003).

Selon Sipe (1995), les produits de dégradation du cartilage servent de marqueurs directs pour l'évaluation de l'activité et de la sévérité de l'OA, mais ne sont pas intensivement utilisés à cause de leur sensibilité limitée. Néanmoins, Engstrom *et al.* (2009) ont montré qu'il existe une association entre la CRP et la sévérité, la douleur et les marqueurs de l'inflammation synoviale locale au niveau du genou affecté par une OA.

2.2. Arthrites inflammatoires

Les arthrites inflammatoires regroupent un grand nombre de conditions arthritiques dans lesquelles on assiste à une inflammation synoviale. Ces inflammations touchent une (monoarticulaires) ou plusieurs articulations (polyarticulaires), caractérisées par une douleur et raideur matinales ou suite à un repos prolongé. En plus de l'arthrite rhumatoïde (détaillé

précédemment), on trouve parmi les arthrites inflammatoires la spondylarthrite séronégative et les arthrites métaboliques (Hughes, 2008).

2.2.1. Spondylarthrite séronégative

La spondylarthrite (SA) forme un groupe de rhumatismes voisins inter-reliés mais phénotypiquement distincts, dominés par la spondylarthrite ankylosante et le rhumatisme psoriatique (Dougados et Baeten, 2011). Sur le plan anatomo-clinique, la SA combine de façon variable des atteintes inflammatoires du squelette axial (articulations sacro-iliaques, rachis, paroi thoracique antérieure) et des membres (enthésites, arthrites périphériques), ainsi que des atteintes extra-articulaires particulières dont les plus fréquentes sont les uvéites antérieures aiguës, le psoriasis et les maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin (Brebant *et al.*, 2011). La SA se caractérise particulièrement par une enthésite et une synovite qui résultent d'un processus inflammatoire non spécifique dont on ne connaît pas la cause et qui peut prendre un aspect destructeur qui la rapproche un peu plus de la synovite rhumatoïde (Fournié, 2004). Des investigateurs ont prouvé la contribution génétique pour la SA pouvant atteindre 80% jusqu'à 90 %. Le pourcentage de concordance élevé entre les jumeaux monozygotes (50 - 75%) comparé à celui des jumeaux dizygotes (15 %) confirme que la présence de la maladie chez plusieurs membres de la même famille est due aux causes génétiques plutôt qu'environnementales (Dougados et Baeten, 2011). En effet, cette maladie est fortement associée à la présence d'un facteur de risque génétique majeur ; le complexe majeur d'histocompatibilité de la classe I « HLA-B27 » (Dougados et Baeten, 2011). D'autre part, les spondylarthrites se distinguent des autres inflammations articulaires par l'absence des autoanticorps dans le sang (Gran et Ostensen, 1998).

a. Spondylarthrite ankylosante

La spondylarthrite ankylosante est un rhumatisme inflammatoire chronique qui affecte le squelette axial (articulations sacro-iliaques et rachidiennes) conduisant à une destruction

structurale et une limitation fonctionnelle (Chen *et al.*, 2011). D'après Gran et Ostensen (1998), les manifestations cliniques semblent être similaires chez les hommes et chez les femmes. Plus récemment, Chen *et al.* (2011) ont rapporté que la maladie se produit préférentiellement et de manière fréquente et sévère chez l'individu jeune masculin. La progression de la maladie semble être lente et la probabilité d'implication des hanches augmente avec l'avancement de la durée de la maladie (Chen *et al.*, 2011). L'évidence d'un endommagement radiographique spinale, érosion osseuse et rétrécissement de l'espace articulaire est en corrélation significative avec les marqueurs inflammatoires tels que la CRP et le taux de sédimentation des érythrocytes (Chen *et al.*, 2011).

b. Arthrite psoriatique

L'arthrite psoriatique (AP) est une SA inflammatoire chronique qui se produit en combinaison avec une psoriasis, elle est généralement séronégative, caractérisée par l'absence du facteur rhumatoïde (Duarte *et al.*, 2012) et affecte la peau, les articulations et les enthèses (Mease *et al.*, 2009). La destruction progressive et irréversible observée au niveau de l'articulation semble être le résultat de la diffusion de l'inflammation jusqu'à le cartilage et l'os donnant naissance à un affaiblissement de la fonction articulaire (Narváez *et al.*, 2012). L'AP partage les mêmes concepts physiopathologiques de l'AR, cependant les acteurs moléculaires ne sont pas tous identiques (Narváez *et al.*, 2012). Selon Duarte *et al.* (2012), cette maladie se caractérise par des changements au niveau de la réponse humorale (La production des autoanticorps contre les antigènes dermiques et les antigènes de la membrane synoviale ; la présence des complexes immunitaires circulants) et cellulaire (L'activation d'une sous-population des lymphocytes T dont les CD4⁺ sont majoritaires au niveau de la peau, la membrane synoviale et les enthèses) du système immunitaire. Cependant, d'après Narváez *et al.* (2012), l'AR et l'AP se différencient par la localisation anatomique des lésions inflammatoires, en effet l'AR est caractérisé par une synovite alors qu'au cours de l'AP,

l'inflammation se manifeste par une enthésite. D'autre part, lorsque l'AP affecte plusieurs petites articulations symétriques, il devient très difficile de distinguer entre les deux maladies, mais la présence des FR, ACPA, les nodules et les psoriasis fait l'objet de distinction (Narváez *et al.*, 2012).

2.2.2. Arthrites métaboliques

Les désordres métaboliques au niveau de l'articulation sont à l'origine de plusieurs arthropathies métaboliques. Elles sont causées par le dépôt des cristaux (Chondrocalcinose) de pyrophosphate de calcium ou d'urate monosodique (Forme ionisée de l'acide urique à pH physiologique) dans le cartilage articulaire, les ménisques ainsi que dans la membrane synoviale. La gôûte et la pseudogôûte sont des exemples d'arthropathies métaboliques (Zarins et McInerney, 1985).

a. Gôûte

La gôûte constitue une arthrite inflammatoire déclenchée par la cristallisation de l'acide urique dans l'articulation (Smith *et al.*, 2011) lorsque sa concentration dans les liquides biologiques dépasse 68 mg/L (Lioté et Ea, 2007). La goute est généralement présente sous forme d'une monoarthrite aiguë affectant habituellement l'articulation métatarsophalangienne du grand orteil, mais dans certains cas, la maladie affecte aussi d'autres articulations tel que les pieds, les chevilles, les genoux, les coudes et les poignets (Smith *et al.*, 2011). L'hyperuricémie constitue le facteur de risque le plus prédisposant au développement de la gôûte du fait qu'il existe une corrélation positive entre la concentration sérique de l'acide urique et la sévérité des crises aiguës de la goute (Smith *et al.*, 2011). D'autre part, Ea (2011a) a montré que la concentration plasmatique en acide urique dépend de l'équilibre entre sa synthèse et son élimination, qui sont régulés à leur tour par des facteurs diététiques et génétiques. Par conséquent, le déséquilibre entre la synthèse et l'excrétion rénale de l'acide urique entraîne une augmentation du taux dans le corps (Ea, 2011a). Cette dernière est due

selon Smith *et al.* (2011) soit à l'éthanol soit à la prise augmentée de nutriments riches en purines (Viande, fruits de mer) dont le produit finale du catabolisme est l'acide urique, ou par des mutations affectant les transporteurs rénaux de l'urate et qui peuvent être potentiellement associés à une excrétion réduite de l'acide urique.

b. pseudogoutte

La pseudogoutte est un terme utilisé pour décrire un syndrome similaire à celui de la goutte classique mais d'une sévérité moins intense (Hirose et Wright, 2007). Cette arthropathie est caractérisée par une synovite inflammatoire chronique, causée par le dépôt des cristaux de pyrophosphate de calcium au niveau du fibrocartilage accompagné, dans certains cas, par une calcification significative au niveau du cartilage hyalin et des ligaments intra-articulaires incluant les ligaments du genou (Zarins et McInerney, 1985). Si elle n'est pas traitée, la pseudogoutte peut se développer en OA dégénérative. La **figure 8** montre l'aspect blanc des cristaux de pyrophosphate de calcium et les leucocytes (mononucléaires et fibroblastes) infiltrés dans la membrane synoviale donnant l'aspect d'un pannus d'AR.

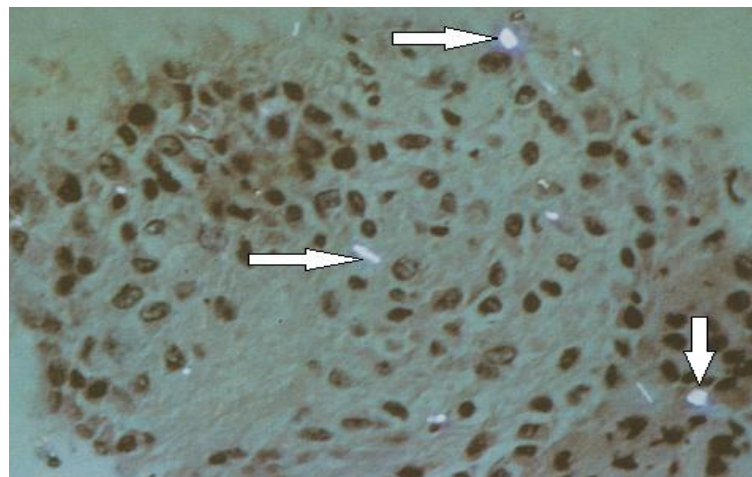


Figure 8. Dépôts des cristaux de pyrophosphate de calcium au niveau de la synoviale articulaire, responsables de l'induction de la pseudogoutte (Zarins et McInerney, 1985).

Les cristaux nouvellement formés entraînent l'activation des cellules qui composent l'articulation (cellules endothéliales, synoviocytes, macrophages, et leucocytes infiltrées) soit par interaction cristaux-membrane cellulaire ou par activation d'un ou de plusieurs récepteurs membranaires aboutissant à la sécrétion d'IL-1 β (Ea, 2011b). Après la digestion des cristaux par les neutrophiles attirés vers l'articulation, ces derniers libèrent le contenu de leurs lysosomes dans l'articulation en particulier les enzymes génératrices de ROS et une quantité importante de prostaglandines et de leucotriènes LTB₄ impliqués dans l'activation de la réaction inflammatoire (Afonso *et al.*, 2007 ; Ea, 2011b). Tous ces événements déclenchent une réponse inflammatoire aiguë qui se manifeste par une fièvre caractéristique, gonflement et des douleurs au niveau de l'articulation (Zarins et McInerney, 1985).

3. Rôle de la XOR dans les maladies rhumatismales

La xanthine oxydoréductase (XOR) est un complexe molybdoflavoprotéine catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et la xanthine en xanthine et acide urique respectivement, durant la dernière étape du catabolisme des purines (Rouquette *et al.*, 1998). Chez les mammifères, la XOR existe sous deux formes inter-convertibles, xanthine déshydrogénase (XDH : EC 1.1.1.204) et xanthine oxydase (XO : EC 1.1.3.22). Ces deux formes peuvent réduire l'oxygène moléculaire (**Figure 9**), alors que c'est seulement la XDH qui préfère le NAD⁺ comme un accepteur d'électron (Page *et al.*, 1998).

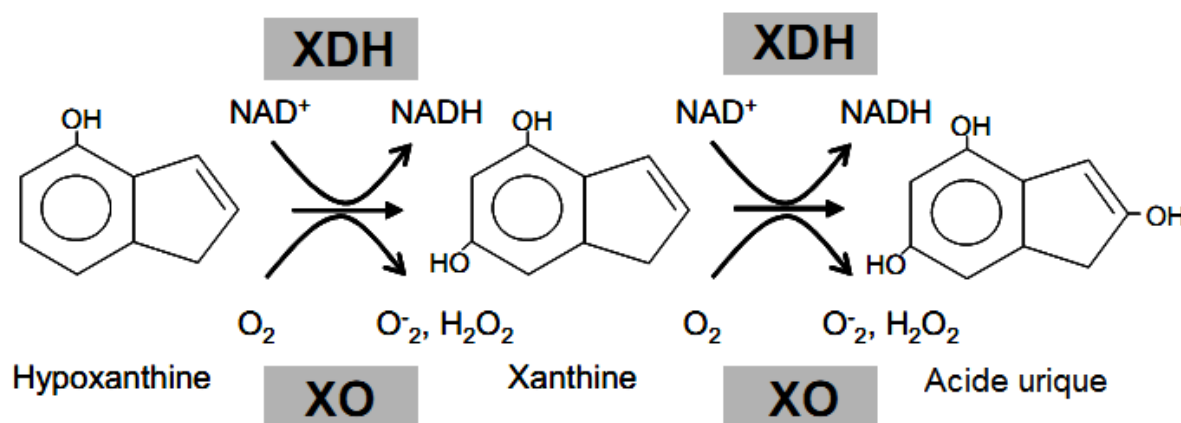


Figure 9. Réactions catalysées par la forme XDH et XO de la XOR. l'O₂⁻ : superoxyde, H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène (Hill et Nishino, 1995).

D'après Rouquette *et al.* (1998), la XOR est considérée comme un potentiel générateur des espèces oxygénées réactives (ROS), en plus d'autres nombreuses sources comme la chaîne respiratoire mitochondriale, le cytochrome P-450, l'activité de la NADH oxydase, la myéloperoxydase et NO synthase (**Figure 10**). La réduction de l'oxygène moléculaire par la XOR conduit à la formation du radical superoxyde (O₂⁻) qui constitue la première forme radicalaire capable d'agresser les composants cellulaires et matriciels. Afonso *et al.* (2007) ont noté aussi, que parmi les fonctions pro-inflammatoires de l'O₂⁻ l'agression des cellules endothéliales et donc l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la génération des chimio-attractants, ayant comme résultat le recrutement des polynucléaires neutrophiles et des macrophages dans les sites inflammatoires. L'hyperréactivité des neutrophiles et des macrophages entraîne l'augmentation du stress oxydatif au niveau de l'articulation. Sous l'influence des conditions d'ischémie-réperfusion dans la synoviale arthritique, l'influx augmenté des radicaux libres produits par les monocytes et les granulocytes hyperractives, convertit la forme XDH à la forme XO et par conséquent la génération d'une quantité significative du radical O₂⁻ et H₂O₂ (Miesel et Zuber, 1993).

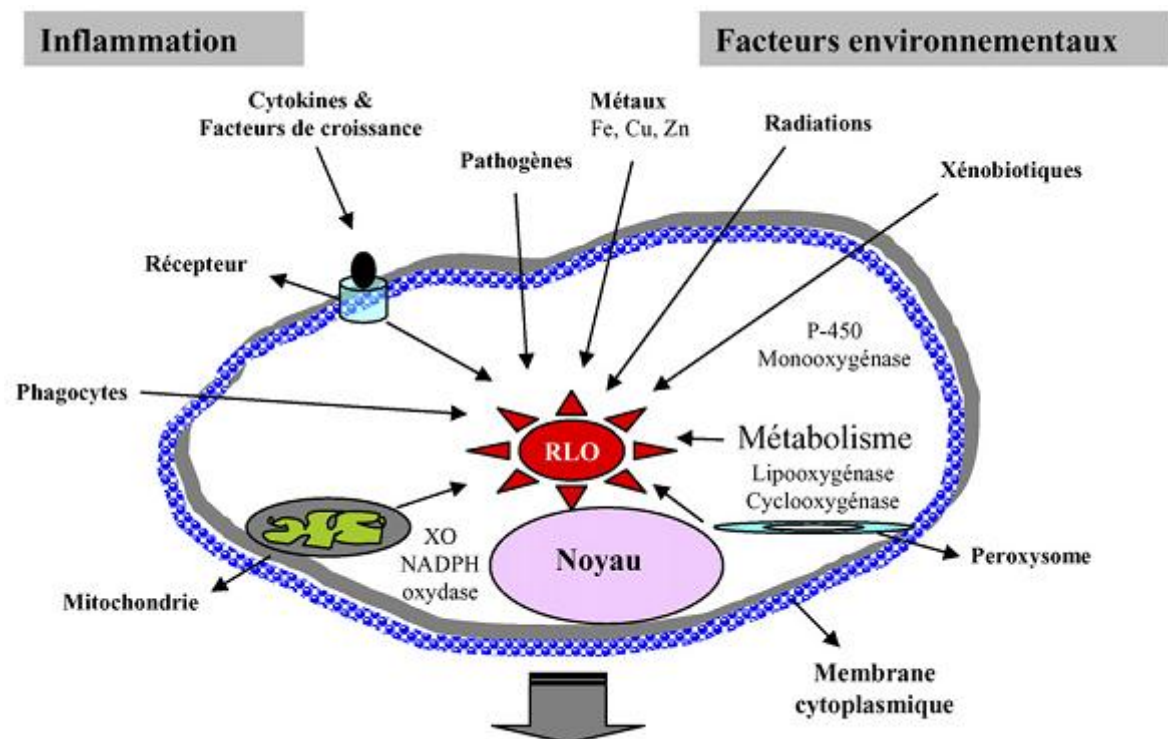


Figure 10. Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène (Afonso *et al.*, 2007).

Selon Wu *et al.* (2009), l' $O_2^{\cdot -}$ constitue également le précurseur d'autres espèces radicalaires plus réactives comme le radical hydroxyl ($OH^{\cdot}$) formé par l'interaction de l' $O_2^{\cdot -}$ avec les ions métalliques comme le fer et le cuivre (réaction de Haber Weiss). Par ailleurs, l' $O_2^{\cdot -}$ peut former le peroxynotrite ($ONOO^{\cdot}$) par combinaison avec l'oxyde nitrique (NO). Il peut également former le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui peut diffuser dans le cytoplasme et à travers les membranes (Wu *et al.*, 2009).

Certains de ces radicaux libres sont utilisés par l'organisme comme médiateurs régulant des fonctions cellulaires, en revanche certains sont extrêmement agressifs. En effet, Henrotin *et al.* (2003) ont rapporté que le stress oxydatif joue un rôle dans les arthrites en dégradant non seulement les membranes cellulaires et les acides nucléiques, mais aussi les composants extracellulaires comme le collagène et les protéoglycanes. Le stress oxydatif réduit

indirectement les composants de la MEC *via* l'induction de l'apoptose et l'activation des MMPases. Afonso *et al.* (2007) ont suggéré que le stress oxydatif est impliqué dans le vieillissement et dans la dégénération du cartilage articulaire qui caractérisent l'arthrose. Le stress oxydatif modifie aussi les protéines par oxydation, nitrosylation, nitration ou chlorination des acides aminés spécifiques (Henrotin *et al.*, 2003). Dans ce contexte, van der Harst *et al.* (2006) ont démontré que la nitrotyrosine, marqueur de l'attaque radicalaire résultat de l'oxydation de la tyrosine, est surexprimée dans le cartilage ostéoarthritique. Tous ces produits de dégradation et d'oxydation des composants cellulaires entraînent l'exacerbation de l'inflammation synoviale (Henrotin *et al.*, 2003). Afonso *et al.* (2007) ont soupçonné une possible implication des radicaux libres dans l'arthrite. En effet, le ONOO^- augmente l'expression des MMP-3 et diminue la synthèse et l'activité des inhibiteurs tissulaires des MMPases, ainsi que le $\text{TNF}\alpha$ produit de façon excessive au cours de l'AR est décrit comme principal activateur de la production des ROS due à l'inhibition de la superoxyde dismutase. Le H_2O_2 induit la production du facteur activateur des plaquettes (PAF) par l'endothélium causant ainsi l'adhérence des leucocytes *via* leurs récepteurs (Miesel et Zuber, 1993). L'ensemble de ces changements aboutit à une augmentation de la dégradation matricielle observée durant la pathogénèse de l'AR (Afonso *et al.*, 2007).

Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Animaux et échantillons biologiques

- Des lapins males et femelles de race locale pesant de 600 à 700 g obtenus d'une ferme à Ain Arnet, sont mis en adaptation avant l'expérience durant une période de 10 jours, logés dans des cages en métal avec un accès libre à l'eau et la nourriture.
- Le lait bovin est fraîchement obtenu d'une ferme à Guedjal, au sud de la ville de Sétif, et traité directement à l'arrivée au laboratoire pour la préparation de la xanthine oxydoréductase.
- Des couples de sang de liquides synoviaux sont prélevés des patients atteints d'inflammations articulaires durant leurs examens périodiques chez des médecins privés au niveau de la wilaya de Setif (Dr Bounouar, Dr N. Arrar), de la wilaya de Bordj Bou Arreridj (Dr Krita) et au niveau de l'hôpital d'El-Eulma. Les liquides synoviaux et le sang sont immédiatement centrifugés avec une vitesse de 3000 rpm à 4°C pendant 15 mn, puis les surnageants sont répartis en petites aliquotes et gardés à – 20°C jusqu'à leur utilisation.

1.2. Réactifs

Les produits utilisés pour réaliser ce travail proviennent de Sigma et Fluka (Allemagne).

2. Méthodes

2.1. Purification de la Xanthine oxydoréductase

La xanthine oxydoréductase (XOR) bovine a été purifiée à partir du lait bovin selon la méthode utilisée dans notre laboratoire (Baghiani *et al.*, 2003). Toutes les étapes de purification ont été effectuées à 4°C.

2.1.1. Obtention de l'extrait brut

Le lait bovin fraîchement récupéré est centrifugé dès son arrivée au laboratoire avec une vitesse de 5000 g pendant 30 mn (centrifugeuse Sigma 3K30 C). La crème collectée est dissoute dans deux volumes de phosphate de potassium (K_2HPO_4 0.2 M, EDTA 1 mM, DTT 5 mM) sous agitation pendant une heure. En présence de DTT l'enzyme sera libérée des membranes lipidiques, puis centrifugée une deuxième fois avec la même vitesse pendant 30 mn. La crème qui constitue les lipides est jetée, alors que le surnageant qui contient l'enzyme libéré est récupéré et filtré à travers la laine de verre. Les lipides restants sont solubilisés par 15 % (V/V) de butanol refroidi -20°C qui sont ajoutés au volume final du filtrat avec 15 % (P/V) de sulfate d'ammonium, ajoutés petit en petit sous agitation pendant une heure. Le mélange est centrifugé à 10000 g pendant 30 mn et le surnageant récupéré est filtré à travers la laine de verre, la couche superficielle (lipides et butanol) est aspirée à l'aide d'une pipette Pasteur. Une deuxième précipitation de l'enzyme est effectuée par addition de 20 % de sulfate d'ammonium ajouté graduellement au filtrat sous agitation pendant une heure, puis une autre centrifugation est pratiquée à 13000 g pendant 30 mn. Un précipité marron est récupéré, dissout dans un petit volume (25 ml) de tampon héparine constitué de NaH_2PO_4 et Na_2HPO_4 25 mM, pH 6.2, et dialysé contre le même tampon durant une nuit. L'extrait brut de la XOR est obtenu après une élimination des impuretés par une dernière centrifugation à 35000 g pendant une heure, et une filtration à travers une membrane de 0.45 μm .

2.1.2. Purification de l'enzyme sur colonne d'héparine–agarose

La XOR montre une pseudo-affinité vis-à-vis à l'héparine, cette caractéristique est utilisée pour purifier cet enzyme par un fractionnement chromatographique. L'extrait brut de la XOR est injecté dans une colonne d'héparine-agarose 4% préalablement équilibrée par un lavage avec le même tampon. Pour éliminer les molécules non fixées, la colonne est lavée par 30 ml du tampon héparine avec un débit de 7 ml/h, ensuite l'enzyme est élué par le même tampon contenant du NaCl à 0.2 M. La fraction éluée est dialysée pendant une nuit contre 2.5 l de tampon bicine (Bicine 50 mM, NaCl 50 mM, pH 8.3) puis répartie en petits volumes (0.5 ml à 1 ml) et conservée à -20°C jusqu'à son utilisation. La colonne est régénérée par un lavage par du tampon héparine renfermant du NaCl 1 M puis conservée dans le même tampon contenant de l'azide de sodium (NaN_3) 1% (P/V).

2.2. Contrôle de pureté de la XOR

Pour évaluer la pureté de l'enzyme, un balayage spectrale et une électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans un milieu dénaturant en présence de SDS ont été effectués.

2.2.1. Spectre d'absorbance UV-VIS

La XOR se caractérise par un spectre d'absorbance spécifique. Un balayage spectrale est effectué entre 200 et 700 nm. Selon Bray (1975) le rapport PFR (absorbance de protéines à 280 nm/ absorbance du centre FAD à 450 nm) est utilisé comme un indice de pureté.

2.2.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du SDS

Une deuxième méthode pour tester la pureté de la XOR est une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS-PAGE), (Laemmli, 1970). Le gel de séparation 10 % a été préparé dans un tampon Tris-HCl (0.375 M, pH 8.8) en présence de 0.01 % de SDS (P/V), 0.0042% (V/V) de Temed (N,N,N',N' tetramethylethylene) qui sert comme un initiateur et 0.01 % (P/V) de persulfate d'ammonium. Le gel de concentration à 5

% d'acrylamide a été préparé dans du tampon Tris-HCl (0.125 M, pH 6.8) auquel sont ajoutés 0.01 % (P/V) de SDS, 0.001 % (V/V) de Temed et 0.01 % (P/V) de persulfate d'ammonium. Les échantillons et les témoins de poids moléculaires connus (Sigma ; 30 KDa-220 KDa) ont été préparés par chauffage dans un bain marie à 100° C avec un volume égal de SDS pendant 10 mn, après le refroidissement le même volume de la solution d'échantillon contenant Tris-HCl (62.5 mM, pH 6.8), 20 % (V/V) du glycérol et 0.005 % (P/V) de bleu de bromophénol est ajouté. L'électrophorèse est effectuée en utilisant un tampon d'électrophorèse Tris (0.3 %)-glycine (1.44 %)-SDS (0.1 %). Cette étape est débutée sous un bas ampérage (10 mA) jusqu'à pénétration complète des échantillons dans le gel de concentration, et puis l'ampérage est augmenté graduellement jusqu'à 36 mA. Après un temps suffisant, les protéines séparées sont fixées et colorées pendant deux heures dans une solution de coloration contenant 0.2 % (P/V) de bleu de Coomassie R250 dissout dans 10 % (V/V) d'acide acétique et 45 % du méthanol. La décoloration du gel est effectuée dans de l'acide acétique 10 % (V/V) jusqu'à transparence satisfaisante.

2.3. Activité enzymatique de la xanthine oxydoréductase

L'activité de la xanthine oxydoréductase purifiée et des échantillons étudiés (sérums et liquides synoviaux) a été évaluée selon la méthode de Nakamura et Yamazaki (1982) par spectrophotomètre en aérobie et à la température ambiante dans un tampon phosphate (Na_2HPO_4 50 mM, NaH_2PO_4 0.5 mM, pH 7.4, EDTA 0.1 mM). L'activité totale (xanthine déshydrogénase + oxydase) est estimée en suivant la production de l'acide urique dans le milieu réactionnel à 295 nm (coefficient d'absorption $9600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) en présence de 100 μM de xanthine utilisée comme substrat et 500 μM de NAD^+ , par une quantité appropriée de la XOR ou de l'échantillon. L'activité xanthine oxydase (XO) est déterminée en mesurant le taux de l'oxydation de la xanthine en acide urique dans le milieu réactionnel en présence de

100 μ M de la xanthine mais en absence du NAD^+ , le pourcentage de la forme XO est calculé

à partir de la relation suivante : $\text{XO \%} = \frac{\text{Activité xanthine oxydase}}{\text{Activité totale}} \times 100$

2.4. Préparation des anticorps anti-XOR Par immunisation de lapins

Des lapins sont immunisés selon Rousseaux-Prévost *et al.* (1989) avec modifications. L'immunisation est réalisée par 200 μ g de XOR dissoute dans 500 μ l de PBS (pH 7.4, 10 mM, 0.9 % NaCl) et émulsifiée avec 500 μ l de l'adjuvant complet de Freund (ACF). Un ml de cette solution est injecté par voie sous cutanée à différents points sur le dos du lapin. Cinq rappels espacés de 15 jours sont réalisés en utilisant la même quantité d'enzyme émulsifiée avec l'adjuvant incomplet de Freund (AIF). Des prélèvements sont effectués une semaine après chaque rappel à partir de la veine latérale extérieure de l'oreille. Après le dernier rappel, les lapins sont égorgés et le sang total a été récupéré. Le sang collecté est laissé coaguler pendant 4 heures à température ambiante puis à 4°C pendant une nuit. Le sérum obtenu est centrifugé à 4°C avec une vitesse de 3000 rpm (Centrifugeuse Sigma 1-15 K) pendant 15 mn, ensuite réparti en petits volumes (0.5 ml) et conservé à -20°C jusqu'à l'utilisation.

2.5. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) pour le dosage des anticorps anti-XOR

Pour déterminer la quantité des anti-XOR (de lapin et humains) une technique d'ELISA indirecte est utilisée, les étapes pratiquées sont illustrées par la **figure 11** (Arrar *et al.*, 2008). Sur des plaques de microtitration 96 puits sont adsorbés 10 μ g / ml de XOR diluée dans un tampon carbonate-bicarbonate 50 mM, pH 9.6, (renfermant 0.01% d'azide de sodium). Les plaques sont ensuite incubées pendant quatre heures à température ambiante (environs 20° C). Après un lavage (trois fois) par le tampon PBS (10 mM, pH 7.4) contenant le Tween 20 (0.05 %, V/V), (PBS-Tw), les sites libres sont saturés à l'aide de la caséine 2 % (P/V) dans le PBS-Tw (200 μ l / puits) pendant une nuit à 4° C puis une heure à température ambiante sous

agitation. L'immun sérum ou le LS avec différentes dilutions est ajouté après trois lavages au PBS-Tw puis incubé à 37°C durant 90 mn. Des anticorps secondaires marqués à la peroxydase dirigés contre les IgG de lapin (Sigma, dilués 1000 fois dans du PBS-Tween), les IgG ou IgM humaines (Sigma, dilués 2000 fois dans du PBS-Tween) sont ajoutés et incubés à 37°C pendant une heure. La révélation de la réaction immunitaire se fait par l'addition de 100 µl / puit de la solution de substrat (Citrates de sodium 0.1 M, pH 5 et Na₂HPO₄ 0.2 M, pH 6) contenant H₂O₂ (0.01 %) et l'orthophénylène diamine (OPD, Sigma). Après une incubation à l'obscurité pour environ 15 mn (Temps d'apparition d'une coloration jaune) la réaction est stoppée par l'ajout de 50 µl / puits de H₂SO₄ (2N). L'absorbance de chaque puit est alors évaluée à 490 nm à l'aide d'un lecteur d'ELISA (Biotech, USA).

2.6. ELISA pour le dosage des complexes XOR-anti-XOR

Pour déterminer le taux des complexes immunitaires XOR-anti-XOR, l'immun sérum de lapin est dilué 40 fois dans le tampon carbonate-bicarbonate puis adsorbé sur plaques de microtitration et les sérums et les liquides synoviaux sont ajoutés avec différentes dilutions. Les étapes suivantes sont les mêmes comme précédemment décrit (**Figure 11**).

2.7. ELISA pour le dosage du facteur rhumatoïde

Pour déterminer la concentration sérique et synoviale en FR libres, les IgG humaines (Sigma) sont coatées sur les plaques de microtitration avec une concentration de 5 µg / ml (dilués dans le tampon carbonate pH 9,6). Les sérums et les liquides synoviaux dilués dans le PBS-Tw sont ensuite ajoutés et la révélation du FR s'effectue par l'addition des anti-IgM humains conjugués à la peroxydase. Les étapes suivantes sont identiques à celles précédemment décrites (**Figure 11**). Les FR en complexes IgM-IgG sont déterminés de la même manière que les complexes XOR-Anti-XOR mais ce sont les anti-IgG humaines qui sont fixés avec une concentration de 5 µg / ml.

2.8. Etude du sérum standard (sérum standard Std)

Un pool de sérums humains latex positifs (sérum standard Std Z1) a été employé pour la titration des anticorps des sérums et liquides synoviaux. Dans chaque plaque de microtitration une série de dilutions du Std Z1 est utilisée pour être considérée comme 100 %. La détermination du taux des anticorps anti-XOR, des complexes immunitaires XOR-anti-XOR et du FR libre, et complexe dans le Std Z1 est effectuée de la même manière mais en se basant sur des concentrations connues en IgG ou IgM (gamme d'étalonnage) après fixation des anticorps spécifiques de ces immunoglobulines.

2.9. Autres tests immunologiques

2.9.1. Détection du facteur rhumatoïde par le test Latex

La présence des FR dans les sérums et les liquides synoviaux est détectée par le test d'agglutination au Latex en utilisant des plaques appropriées (Behring, Germany) conformément aux recommandations du fabricant. Un volume de 50 µl d'échantillon est déposé sur la plaque-test, 50 µl des particules Latex (Suspension de particules de polystyrène recouvertes de γ -globuline humaine) sont ajoutés à côté des dépôts de l'échantillon puis un mélange à l'aide des bâtonnets est réalisé. Des sérums de control (Humains) positifs (Au moins 20 UI/ml) et négatifs (Maximum 1 UI/ml) sont utilisés. Après deux minutes d'un mouvement de rotation, des agrégats clairs sont observés dans l'échantillon positif formés par l'agglutination des particules de Latex avec les FR. Les échantillons contenant moins de 20 UI/ml sont considérés comme négatifs selon les recommandations du fabricant.

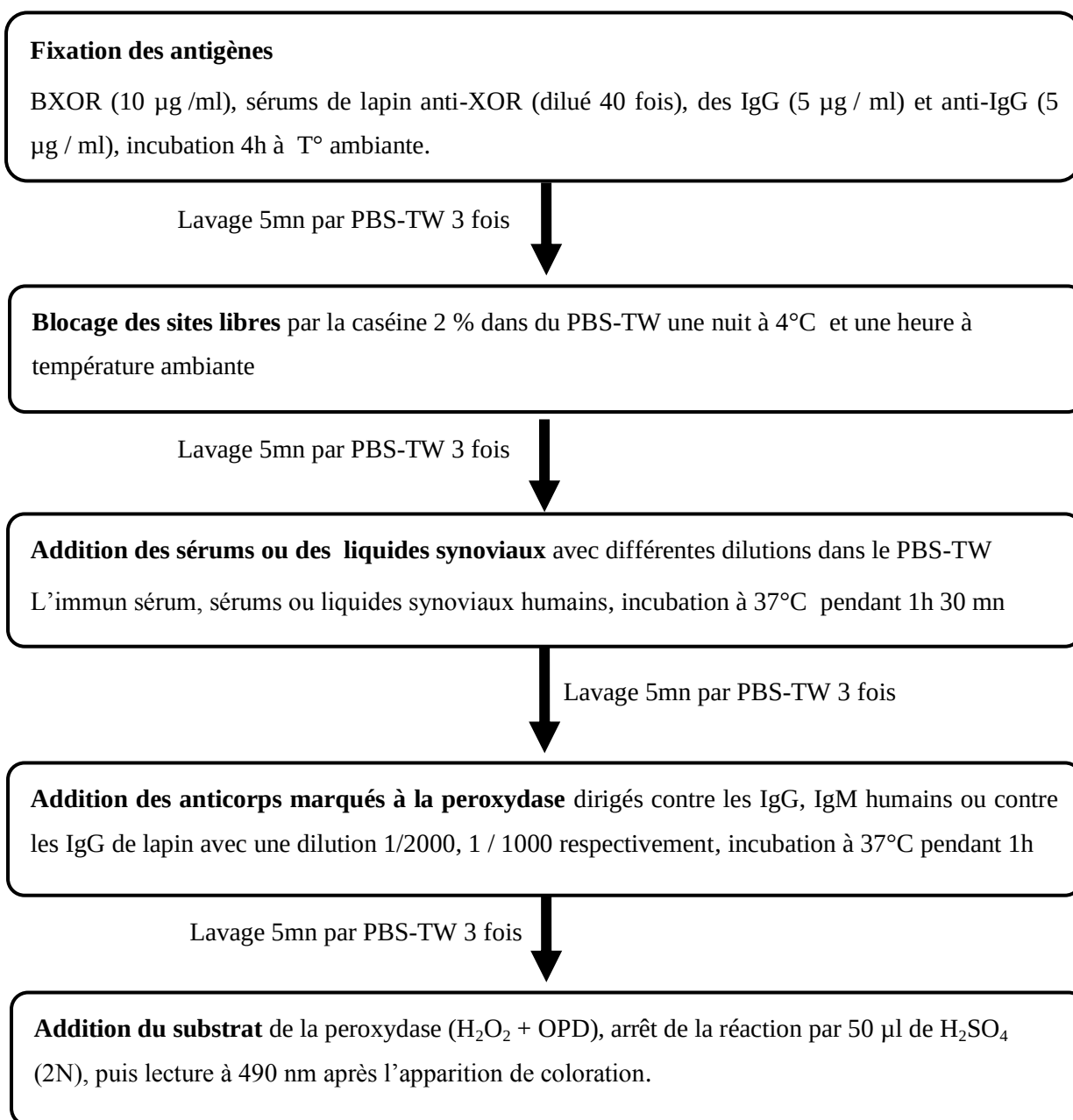


Figure 11. Protocoles des ELISA utilisées pour le dosage des anticorps anti-XOR de lapin et humains, des complexes immunitaires XOR-anti-XOR du et FR dans les sérums et les liquides synoviaux humains.

2.9.2. Détermination de la concentration de la protéine C-réactive

La concentration de la CRP est déterminée selon les recommandations du fabricant ; dépôt de 50 µl d'échantillon sur la plaque-test suivis par un dépôt de 50 µl de la solution d'absorbant FR. Ensuite 50 µl d'une suspension d'anticorps monoclonaux anti-CRP humaine couplés à des particules de polystyrène sont ajoutés. Après un mélange en rotation à l'aide de bâtonnets et incubation des plaques pendant 2 mn, une agglutination visible à l'œil nu est formée par la liaison de la CRP aux anticorps spécifiques couplés au polystyrène. Une agglutination nette indique une concentration de CRP ≥ 6 mg/l tandis que l'absence d'agglutination montre une concentration de CRP < 6 mg/l.

2.10. Etude statistique

Les résultats d'ELISA sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ SD et la signification de différence entre la concentration des anticorps dans le sérum des patients et celle dans le liquide synovial est testée par le test t de Student en utilisant le logiciel Graph Pad Prisme 5.

Une valeur de la probabilité $p < 0.05$ est considérée significative.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Purification de la xanthine oxydoréductase

La xanthine oxydoréductase (XOR) a été longtemps connue d'être présente en abondance dans le lait bovin et humain et pouvant être purifiée en appliquant des protocoles appropriés. Au niveau de notre laboratoire, la XOR est purifiée en utilisant la technique décrite par Sanders *et al.* (1997) modifiée par Baghiani *et al.* (2003). Dans ce protocole, l'extrait brut de la XOR est obtenu à partir du lait bovin frais en présence du DTT après plusieurs étapes de centrifugation et de précipitation avec du sulfate d'ammonium. La XOR est ensuite purifiée par chromatographie d'affinité sur gel d'héparine-agarose où la XOR est adsorbée dans du tampon héparine pH 6,2 et éluée avec NaCl 0,2 M dans le même tampon. La XOR est obtenue avec un rendement relativement faible comparé aux travaux de Sanders *et al.* (1997) et Baghiani *et al.* (2003) qui ont obtenu des concentrations de 6,25 mg et 22.2 mg XOR / l de lait, respectivement. Cependant, le rapport protéines flavine (PFR) était de 6.0 témoignant une bonne pureté de la XOR purifiée. Il est à noter qu'un PFR proche de 5.0 présente une meilleure pureté (Bray, 1975). La XOR purifiée montre un spectre UV-visible (250-700nm) caractéristique avec trois pics majeurs à 280 nm, 350 nm et 450 nm (**Figure 12**). D'autre part, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du SDS (SDS-PAGE) montre que l'extrait brut renferme plusieurs protéines (**Figure 13** : ligne a) et la XOR purifiée avec deux bandes majeures (**Figure 13** : ligne b) de 146 et 126 KDa et deux bandes mineures de 113 et 80 KDa. Ces deux dernières peuvent être la résultante d'un clivage enzymatique due à l'incubation prolongée de la XOR aux enzymes protéolytiques le long de l'expérience de la purification, sans utiliser le PMSF (Phenylmethylsulphonyl fluoride) qui est un inhibiteur des protéases à cause de leur absence dans notre laboratoire. En plus des deux bandes majeures

qui correspondent à la XOR, l'extrait brut de la XOR contient plusieurs d'autres bandes de poids moléculaires 117, 80, 74, 31 et 21 KDa.

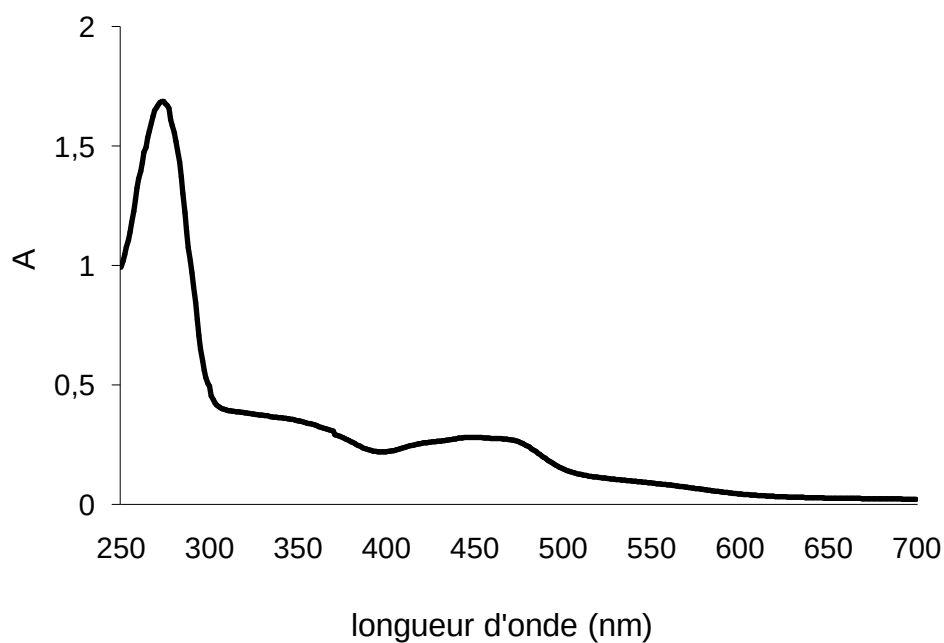


Figure 12. Spectre d'absorption UV-VIS (250-700 nm) de la XOR purifiée

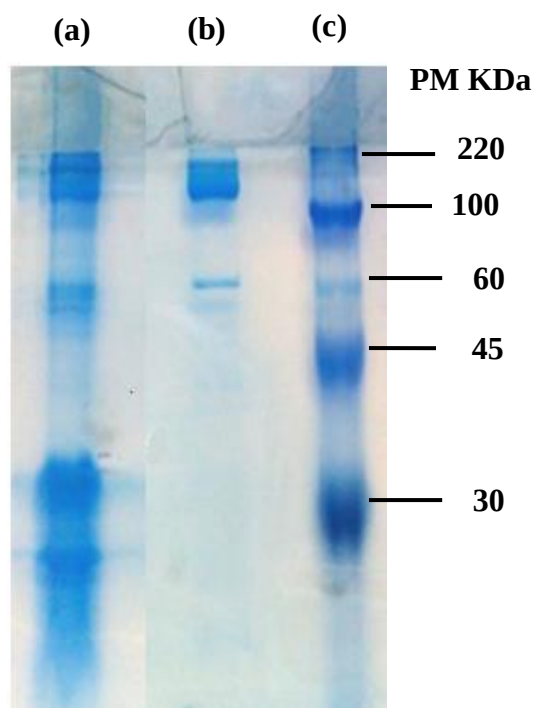
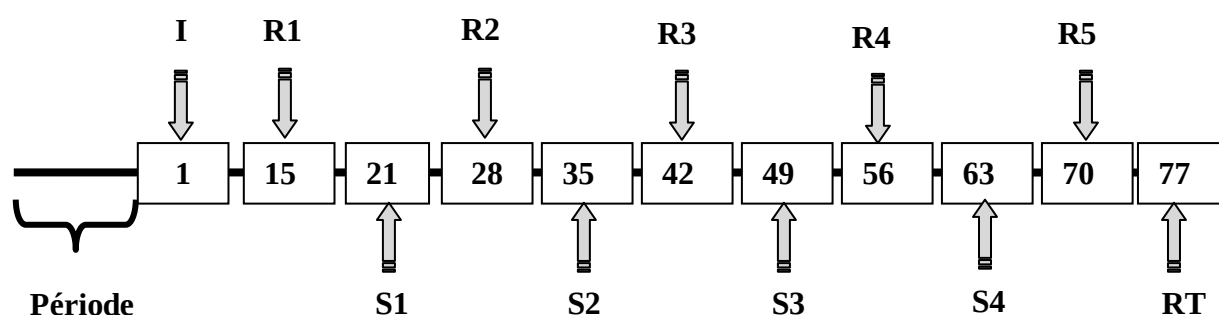


Figure 13. SDS-PAGE (10 %) de la XOR bovine purifiée. Ligne (a) : extrait brut de la XOR, ligne (b) : XOR purifiée, ligne (c) : standards de poids moléculaires.

L'estimation de l'activité enzymatique de la XOR en suivant la production de l'acide urique par l'oxydation de la xanthine nous a permis de conclure que l'enzyme est totalement sous la forme xanthine oxydase (923 nmoles/mn/mg).

2. Etude des anticorps de lapins anti-XOR

Dans cette partie de notre travail, trois lapins ont été immunisés avec la XOR bovine comme illustré dans la **figure 14**.



d'adaptation

Figure 14. Différentes étapes de l'immunisation des lapins contre la XOR. Chiffres arabes encadrés : jours à partir de la première immunisation, **I** : immunisation (XOR+ACF), **R** : rappels (XOR+AIF), **S** : saignement, **RT** : récupération totale du sang par décapitation des lapins.

La technique d'ELISA indirecte est utilisée pour la détermination des titres d'anticorps après trois semaines de l'immunisation puis une semaine après chaque rappel. La **figure 15** montre que les titres des anticorps augmentent significativement après le premier jusqu'au cinquième rappel où on observe une légère diminution. Cette diminution peut être expliquée par l'arrivée au plateau (maximum d'anticorps à fournir par l'animal) ou à une certaine tolérance immunitaire à l'antigène après une immunisation prolongée (Dorner et Uhr, 1964). Nos résultats montrent que les antisérums sont riches en anticorps anti-XOR avec une séropositivité pouvant atteindre un titre de 102400 (**Figure 16**).

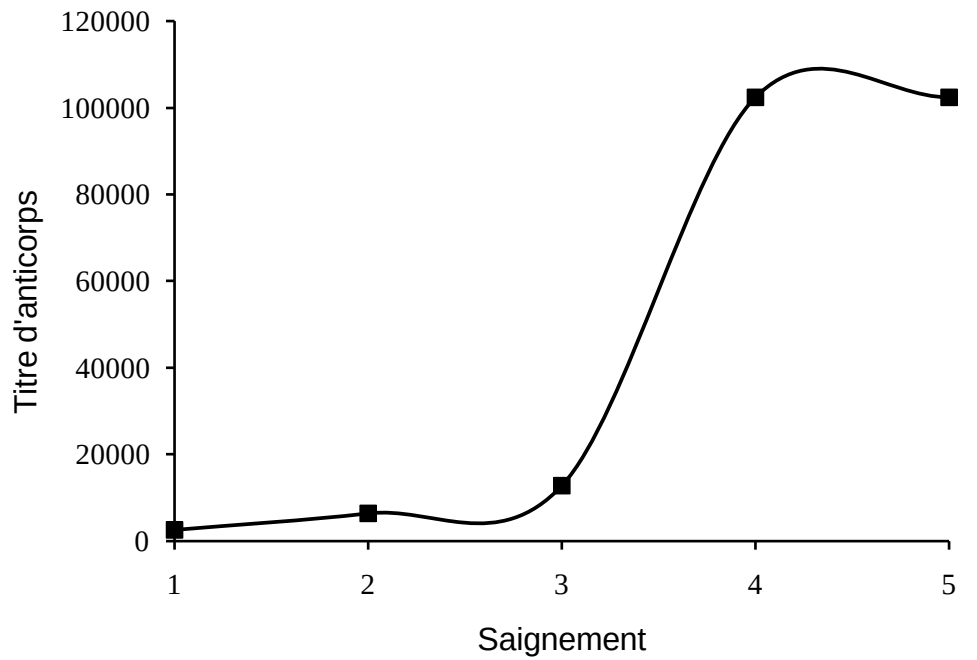


Figure 15. Exemple de développement de la réponse immunitaire contre la XOR (L2).

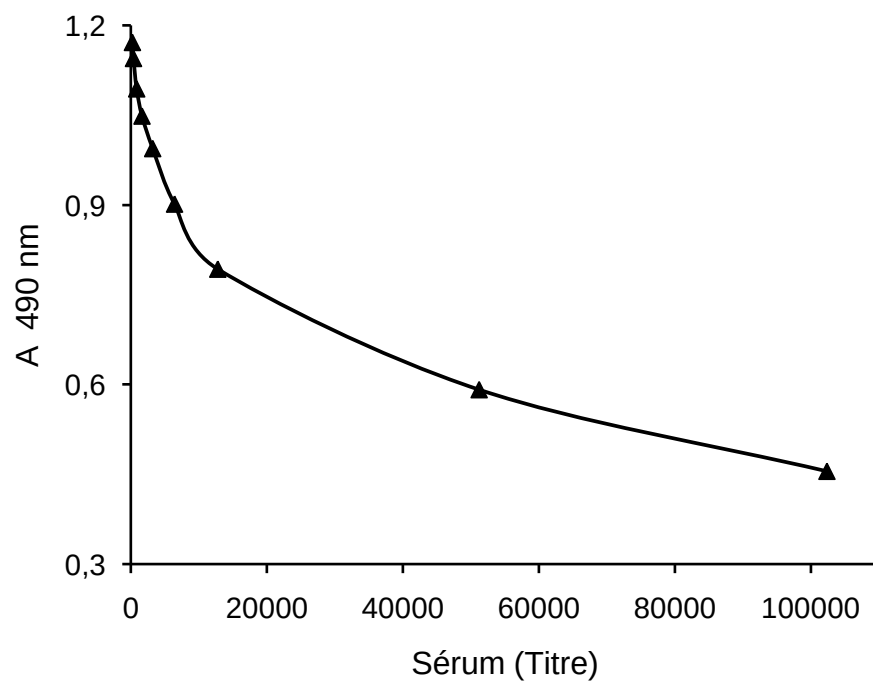


Figure 16. Titration de l'antisérum de lapin immunisé avec la XOR par l'ELISA indirecte.

3. Etude des anticorps anti-XOR dans des sérums et des liquides synoviaux chez des sujets atteints d'inflammations articulaires

3.1. Etude des anticorps anti-XOR libres

L'étude des anticorps anti-XOR libres dans des sérums et liquides synoviaux des patients atteints d'inflammations articulaires est effectuée par ELISA indirecte. Les quantités de ces anticorps sont estimées en se basant sur un sérum de référence Std Z1. Il s'agit d'un pool de sérums latex positifs qui contient des taux élevés en anticorps anti-XOR. La concentration des anticorps anti-XOR de la classe IgG et IgM, ainsi que la concentration des complexes immunitaires XORIC (IgG et IgM), FR libre et complexe du sérum standard Z1 (**Tableau 1**) sont déterminées en se basant sur une gamme d'étalonnage dont le tracé est représenté dans la **figure 17**. L'effectif des malades et la concentration des anticorps libres (IgG et IgM) spécifiques de la XOR (Moyenne $\pm$ SD) dans chaque type de maladie sont illustrés dans le **Tableau 2**.

Tableau 1. Taux des IgG et IgM anti-XOR libres et complexés avec la XOR, et le FR (IgM) libre et en complexe dans le sérum standard Z1.

Anti-XOR ($\mu\text{g/ml}$)		XOR-anti-XOR ($\mu\text{g/ml}$)		FR ($\mu\text{g/ml}$)	
IgG	IgM	IgG	IgM	Libre	Complexe
1.51 $\pm$ 0.31	22.52 $\pm$ 7.6	3.17 $\pm$ 0.14	18.22 $\pm$ 5.29	228.05 $\pm$ 118.72	115.01 $\pm$ 41.01

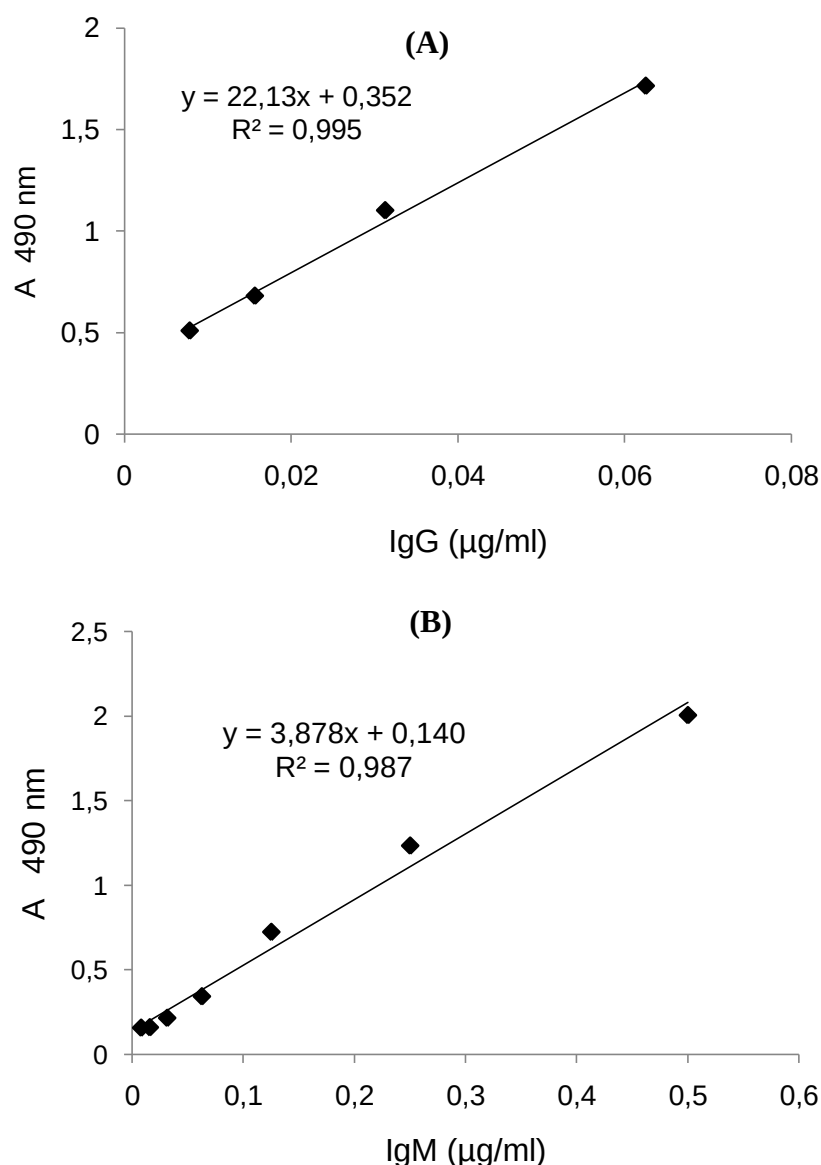


Figure 17. (A) Courbe d'étalonnage utilisée pour déterminer la concentration des IgG anti-XOR libres et en complexe, (B) et celle des IgM anti-XOR libres et complexés avec la XOR, et le FR (IgM) libre et en complexe dans le sérum standard Z1.

Tableau 2. Concentrations des IgG et IgM anti-XOR libres dans les couples de sérums et des liquides synoviaux des patients atteints d'inflammations articulaires.

Maladie	IgG (µg/ml)		IgM (µg/ml)	
	Sérum	LS	Sérum	LS
PR (n=2)	1.21±0.5	1.43±0.15	17.8±6.7	19.9±7.2
Arthrose (n=5)	0.62±0.08	0.7±0.12	11.6±1.2	11.12±3.08
Arthrite (n=6)	1.08±0.3	0.9±0.31	14.6±3.93	12.92±3.81

Dans la catégorie des patients atteints de la PR, nos résultats montrent qu'ils n'y'a pas de différence significative entre la concentration des IgG anti-XOR dans les sérums et celle dans les liquides synoviaux : $1.21 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$ (80 % du Std Z1) et $1.43 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$ (95.36 % du Std Z1), respectivement. La même constatation est faite en ce qui concerne la concentration des IgM anti-XOR des mêmes patients dont elle est de $17.8 \pm 6.7 \mu\text{g/ml}$ (79,05 % du Std Z1) dans les sérums et $19.9 \pm 7.2 \mu\text{g/ml}$ (88,24 % du Std Z1) dans les liquides synoviaux. Par contre, la différence entre ces deux classes d'immunoglobulines est significative et on constate que le taux des IgM anti-XOR excède presque 15 fois celui des IgG dans le sérum et 14 fois dans le LS (**Figure 18**).

Malgré que les quantités des anticorps que nous avons trouvés sont plus faibles, nos résultats concordent avec ceux obtenus par Arrar *et al.* (2008) dans leurs étude réalisée sur des sérums d'un groupe de 36 patients atteints de l'AR où ils ont trouvé que la concentration des IgM anti-XOR est 25 fois plus élevée que la concentration des IgG (133.43 ± 101.98 contre $5.34.18 \pm 2.88 \mu\text{g/ml}$) chez les RA^+ , et 11 fois plus élevée chez les RA^- (60.76 ± 38.39 contre $5.55 \pm 2.06 \mu\text{g/ml}$). La différence observée dans les taux des anticorps anti-XOR peut être due au petit nombre que nous avons examiné (2 cas) qui représentent probablement la limite inférieure. Le fait que les concentrations détectées en IgM spécifiques pour la XOR dans nos échantillons soient plus élevées que les IgG peut être due aux effets d'une immunisation interne. En effet, Bruder *et al.* (1984) ont supposé que les anticorps dirigés contre la XOR peuvent être générés par l'exposition de la XOR intrinsèque au système immunitaire. Cette enzyme peut être présente dans la circulation sanguine soit suite à sa libération au cours des lésions tissulaires comme l'endothélium capillaire qui est riche en XOR (stimulation endogène) soit elle peut être fournie suite à la consommation du lait bovin.

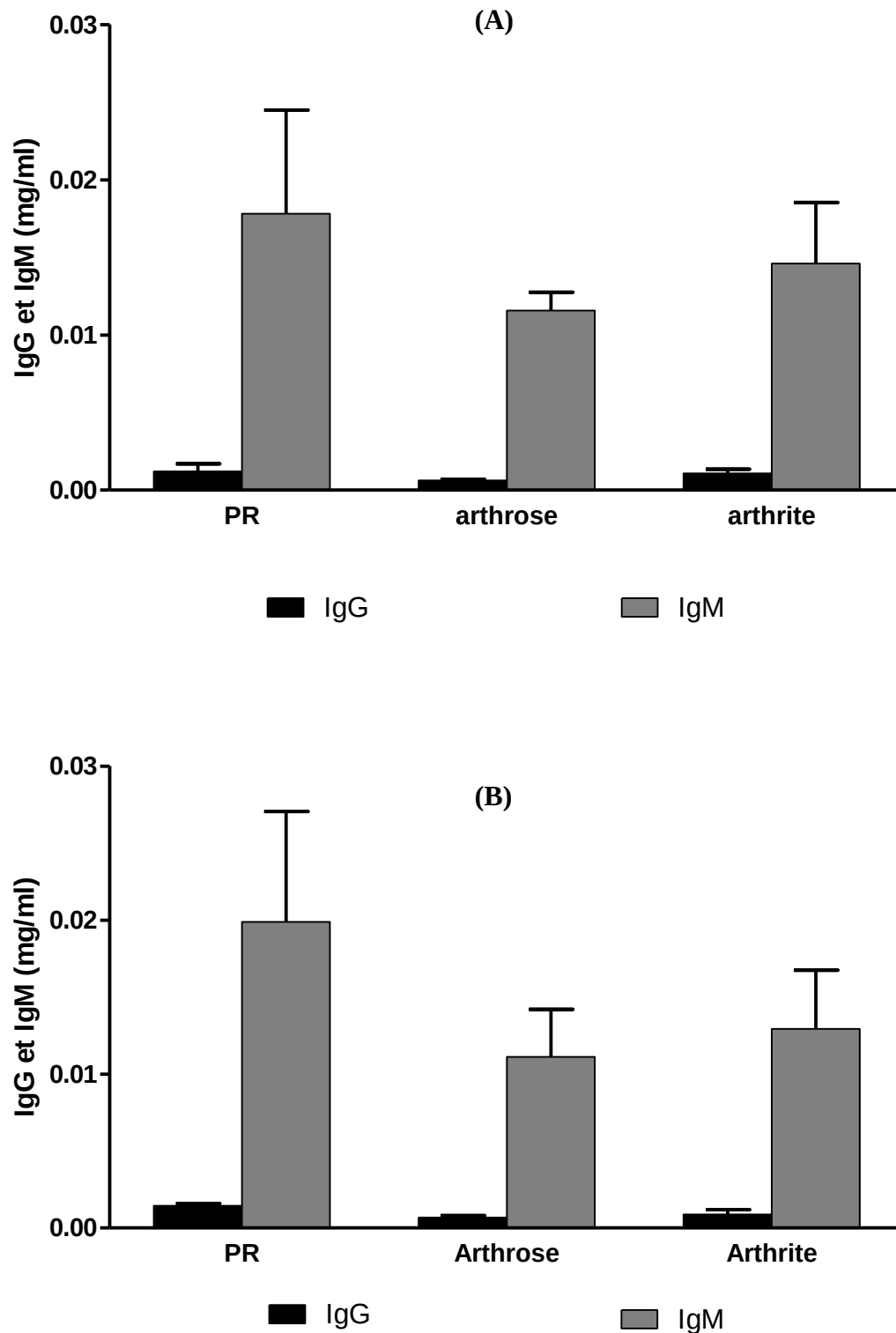


Figure 18. (A) Comparaison entre la concentration des IgG et des IgM anti-XOR libres dans les sérums, et (B) les liquides synoviaux des patients atteints d'inflammations articulaires.

On discute les deux sources, endogène et exogène de la XOR. Rouquette *et al.* (1998) ont trouvés la XOR dans le cytoplasme des cellules épithéliales et endothéliales, mais elle est

localisée d'une manière intense dans la région périnucléaire suggérant donc son rôle dans la production des ROS et par conséquent l'activation des facteurs de transcription tel que le facteur de transcription nucléaire (NF- κ B) qui à son tour joue un rôle dans l'inflammation par la régulation de la transcription des gènes codant pour plusieurs cytokines et médiateurs inflammatoires (oxyde nitric synthase, la cyclooxygénase 2, les molécules d'adhésion) (Smith *et al.*, 2011). Comme ils ont trouvé que la XOR est localisée dans les régions cellulaires externes suggérant le rôle de l'enzyme dans la communication intercellulaire impliquant la signalisation *via* la production des ROS. Tandis que Stevens *et al.* (1991) ont attribué la présence de ces anticorps dans le LS à la libération de la XOR localisée dans l'endothélium de la membrane synoviale au sein de la cavité articulaire. Le phénomène qui est expliqué selon Mor *et al.* (2005) par l'hyperplasie de la membrane synoviale au cours du développement de l'AR et à la sécrétion des enzymes par les fibroblastes stimulées au sein de l'articulation.

D'autre part, la détection des anticorps dirigés contre la XOR dans le sang peut être due à une stimulation du système immunitaire par la XOR exogène, fournie du lait bovin et qui contient selon Page *et al.* (1998) une quantité assez importante de cet enzyme associée avec les membranes des globules gras des cellules épithéliales mammaires. En effet, Ho *et al.* (1976) ont rapporté qu'une partie de la XOR apportée par l'alimentation échappe à la dégradation par le milieu acide ou protéolytique de l'estomac et des intestins, respectivement. Vu son caractère lipophile, cette enzyme est donc absorbée par les intestins sous forme intacte et rejointe la circulation sanguine.

Chez les patients affectés de la PR, la présence d'une concentration en anticorps anti-XOR dans le LS presque identique à celle trouvée dans le sang peut être expliquée selon Timoney et Yarkoni (1976) à l'augmentation de la perméabilité de la membrane synoviale aux protéines et aux cellules plasmatiques et leur accumulation par la suite dans le tissu synovial.

Il est raisonnable d'assumer qu'au moins une partie de ces immunoglobulines est synthétisée localement au niveau des articulations arthritiques par les cellules infiltrées à travers la membrane synoviale et sont ensuite libérées dans le LS. D'autre part, Timoney et Yarkoni (1976) ont suggéré qu'une partie de ces immunoglobulines spécifiques pour la XOR résulte de l'effet non spécifique de l'arthrite sur la perméabilité de la barrière synoviale aux protéines plasmatiques notamment les anticorps. Néanmoins, il existe un autre facteur qui complique l'interprétation de la distribution des anticorps spécifiques pour la XOR entre le sang et le LS et qui se manifeste par l'échappe des protéines localement synthétisées ou infiltrées à travers la membrane synoviale via les canaux lymphatiques participant de ce fait à la formation des concentrations sanguines en anticorps anti-XOR (Timoney et Yarkoni, 1976).

Dans le cas d'arthrite, les IgG anti-XOR sont présentes aussi presque avec la même concentration dans les sérums ($1.08 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$, 72.03% du Std Z1) et les liquides synoviaux ($0.9 \pm 0.31 \mu\text{g/ml}$, 59% du Std Z1). Ce phénomène est aussi observé avec les IgM qui sont présentes avec une moyenne de $14.6 \pm 3.93 \mu\text{g/ml}$ (64.84% du Std Z1) et de $12.92 \pm 3.81 \mu\text{g/ml}$ (57.37% du Std Z1) dans les sérums et les liquides synoviaux, respectivement (**Tableau 2**). La différence significative ($p < 0.0001$) entre le taux des IgG et celui des IgM anti-XOR (Dans le sérum ou dans le LS) est en accord avec les résultats trouvés par Al-Muhtaseb *et al.* (2011). Dans le sérum les IgM anti-XOR excèdent de 13.5 fois les IgG anti-XOR et 14 fois dans le LS (**Figure 18**).

Chez les atteints de l'arthrose il n'existe pas de différence significative entre la concentration des IgG anti-XOR dans les sérums ($0.62 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$, 41.32 % du Std Z1) et dans les liquides synoviaux ($0.7 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$, 45.47 % du Std Z1). Le même résultat est observé pour les IgM présentes avec des concentrations de $11.6 \pm 1.2 \mu\text{g/ml}$ (51.39 % du Std Z1) et de $11.12 \pm 3.08 \mu\text{g/ml}$ (49.35 % du Std Z1) dans les sérums et dans les liquides synoviaux, respectivement. D'autre part on constate que les IgM anti-XOR sont significativement sont

majoritaires ($p < 0.0001$) dépassant les IgG anti-XOR de 18.7 fois dans le sérum et 16 fois dans le LS.

La similarité dans la concentration des anticorps libres (IgG ou IgM) dirigés contre la XOR dans le sérum et le LS chez les trois catégories de patients n'est pas générale puisque certains patients font exception. Chez le malade 9 (**Annexe 1**) qui est atteint de PR, on a observé une différence significative ($p < 0.0078$) où la concentration des IgG anti-XOR dans le sérum ($0.86 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$) est plus faible que celle trouvée dans le LS ($1.33 \pm 0.16 \mu\text{g/ml}$). Ceci peut être expliqué par le fait que l'inflammation articulaire augmente la perméabilité vasculaire synoviale et par conséquent le passage des protéines du sang vers le LS y compris les anticorps (Damiano et Bardin, 2004) ou par l'infiltration des cellules plasmiques synthétisantes des immunoglobulines dans le tissu synovial (Jones *et al.*, 1982). Ces résultats peuvent témoigner que qu'il y a une synthèse locale des anticorps anti-XOR dans le tissu synovial et qui va enrichir la concentration de ces anticorps dans le LS que dans le sang.

D'autre part, nos résultats montrent que les liquides synoviaux de deux patients atteints des arthrites contiennent moins d'anticorps que leurs sérums. Prenant comme exemple le patient 13 (**Annexe 1**) où la concentration en IgG anti-XOR ($9.54 \pm 0.7 \mu\text{g/mg}$) dans le sérum est significativement ($p < 0.0212$) élevée que celle dans le LS ($0.7 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$). Chez le malade 3 (**Annexe 1**), la concentration des IgM anti-XOR ($13.38 \pm 1.66 \mu\text{g/ml}$) dans le sérum est significativement ($p < 0.011$) plus élevée que celle dans le LS ($9.77 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$). Tel résultat peut indiquer que dans le LS, une partie de ces anticorps est liée aux tissus ou elle est impliquée dans la formation des complexes immunitaires et de ce fait, d'autres techniques sont nécessaires pour leurs détection (Al-Muhtaseb *et al.*, 2011).

3.2. Etude des complexes immunitaires XOR-IC (IgG et IgM)

Le taux des complexes immunitaires XOR-IgG ou XOR-IgM dans les échantillons étudiés (Sérums et liquides synoviaux) est déterminé en utilisant la technique de l'ELISA sandwich. Les résultats obtenus sont montrés dans le **tableau 3**. Le sérum Std Z1 (100%) a été employé pour référence (**Tableau 1**).

Tableau 3. Concentration des complexes immunitaires XOR-IgG et XOR-IgM déterminés par ELISA dans les couples de sérums et liquides synoviaux des patients atteints d'inflammations articulaires.

Maladie	XOR-IgG anti-XOR (µg/ml)		XOR-IgM anti-XOR (µg/ml)	
	Sérum	LS	Sérum	LS
PR (n=2)	2.4±0.33	2.53±0.75	19.42±3.28	21.08±4.33
Arthrose (n=5)	2.07±0.4	2.5±0.5	14.06±3.38	13±2.1
Arthrite (n=6)	2.7±0.32	2.31±0.8	14.82±2.4	14.8±3.09

Dans les trois catégories de patients, l'étude de l'estimation de la concentration des XORIC contenant les IgG n'a pas montrées une différence significative entre le sérum ; 2.4 ± 0.33 µg/ml pour les atteints par la PR, 2.7 ± 0.32 µg/ml pour les patients atteints par des arthrites et 2.07 ± 0.4 µg/ml pour les patients affectés de l'arthrose et le liquide synovial ; 2.53 ± 0.75 µg/ml (PR), 2.31 ± 0.8 µg/ml (arthrites) et 2.5 ± 0.5 µg/ml (arthrose). Ces résultats sont présentés dans la **figure 19 (A)**. Cependant, le malade 8 et 12 (**Annexe 1**) ont fait l'exception où la concentration des XOR-IC (IgG) dans le LS est significativement ($p < 0.0114$ et $p < 0.0058$, respectivement) plus élevée que celle dans le sérum. Ces complexes immunitaires sont présents dans le LS, pour le malade 8, avec une moyenne de 3.18 ± 4.23 µg/ml et de 2.72 ± 0.44 µg/ml pour le malade 12. Alors que dans le sang, ils sont présents avec 2.38 ± 0.01 µg/ml pour le malade 8 et 1.39 ± 0.26 µg/ml pour le malade 12. Ces résultats montrent que les concentrations remarquablement élevées en IgG complexés avec la XOR dans l'articulation

peuvent se diriger à l'origine locale de la synthèse des complexes immunitaires chez ces deux patients qui sont affectés par la maladie d'arthrose (poole, 2003).

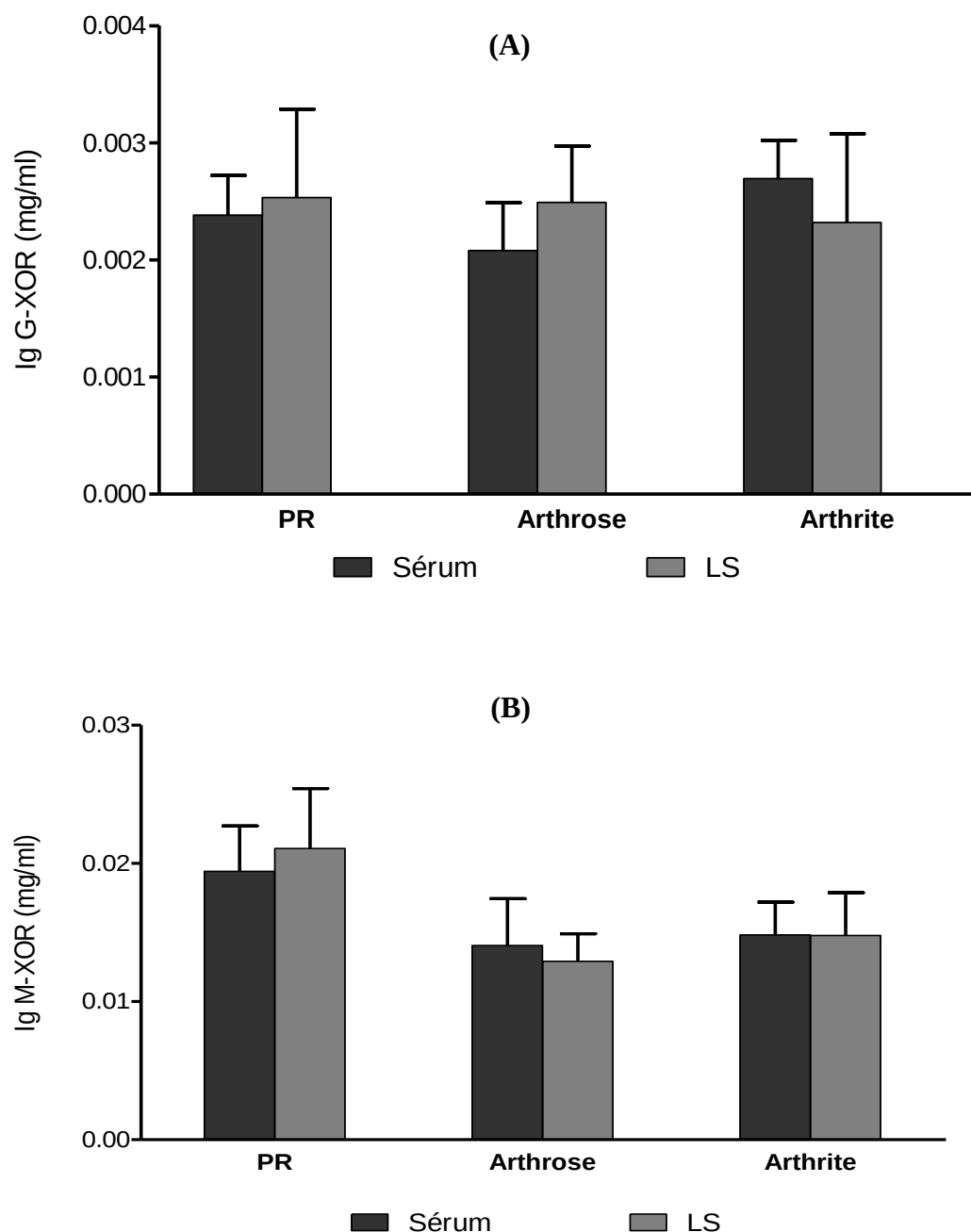


Figure 19. Comparaison entre les concentrations des XORIC : **(A)** IgG, **(B)** IgM dans les sérums et dans les liquides synoviaux des patients atteints d'inflammations articulaires.

Egalement, notre étude n'a montré aucune différence dans la concentration des complexes XOR-IgM chez les trois groupes de malades, entre le sérum et le LS en particulier dans le cas des arthrites. Dans les sérums, ces anticorps sont présents avec $19.42 \pm 3.28 \mu\text{g/ml}$ (PR), $14.82 \pm 2.4 \mu\text{g/ml}$ (Arthrites) et $14.06 \pm 3.38 \mu\text{g/ml}$ (Arthrose). Ils sont présents dans les liquides synoviaux avec $21.08 \pm 4.33 \mu\text{g/ml}$ (PR), $14.8 \pm 3.09 \mu\text{g/ml}$ (Arthrites) et $13 \pm 2.1 \mu\text{g/ml}$ (Arthrose). Ces résultats sont exprimés dans la **figure 19 (B)**. Il est à noter que chez le malade 6 atteint d'arthrite (**Annexe 1**) la concentration des XOR-IC (IgM) dans le LS ($12.3 \mu\text{g/ml}$) est significativement ($p < 0.05$) plus élevée que celle trouvée dans le sérum ($10.85 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$).

Comme dans le cas des anticorps libres on constate que chez la catégorie des patients atteints de la PR, les XOR-IC contenant les IgM sont significativement majoritaires ($P < 0.05$) et dépassent de 8 fois ceux contenant les IgG soit dans le sang ou dans le LS, (**Figure 20**). Egalement, chez les patients qui souffrent d'arthrites et d'arthrose, la différence est plus significative ($P < 0.0001$). Les XOR-IC contenant les IgM excèdent de 5.5 fois les XOR-IC contenant les IgG dans le sérum (**Figure 20 A**) et de 6.4 fois dans le LS (**Figure 20 B**) des patients affectés par les arthrites. Dans la catégorie des patients atteints de l'arthrose, les XOR-IC contenant les IgM excèdent de 6.8 fois ceux contenant les IgG dans le sérum (**Figure 20 A**) et de 5 fois dans le LS (**Figure 20 B**).

Cette concentration élevée en XOR-IC (IgM) est confirmée par les travaux de Arrar *et al.* (2008) qui ont trouvé que le rapport des XOR-IC formés par les IgM au ceux formés par les IgG est de cinq fois dans le LS des patients atteints de la PR et de sept fois dans le LS des patients souffrant d'autres types d'inflammations articulaires. Ces résultats concordent avec les travaux réalisés par Al-muhtaseb *et al.* (2011) qui ont trouvé que le LS des patients affectés par la PR contient $90.34 \pm 74.96 \mu\text{g/ml}$ des XOR-IC (IgM) et $77.06 \pm 38.74 \mu\text{g/ml}$ des XOR-IC (IgG) mais avec des rapports moins importants.

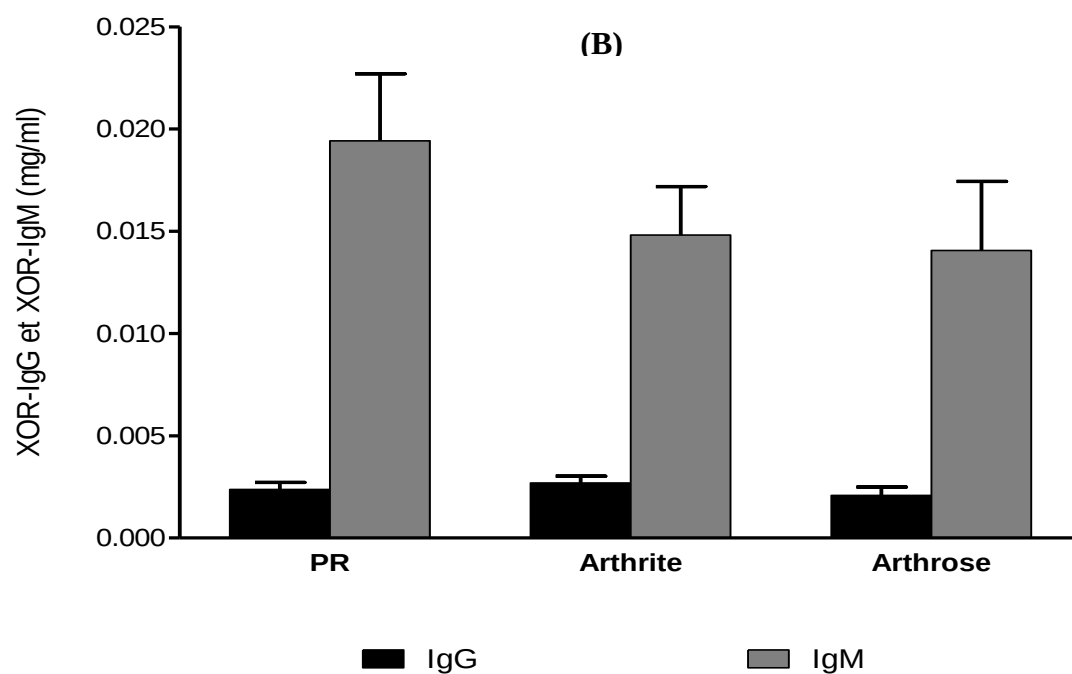
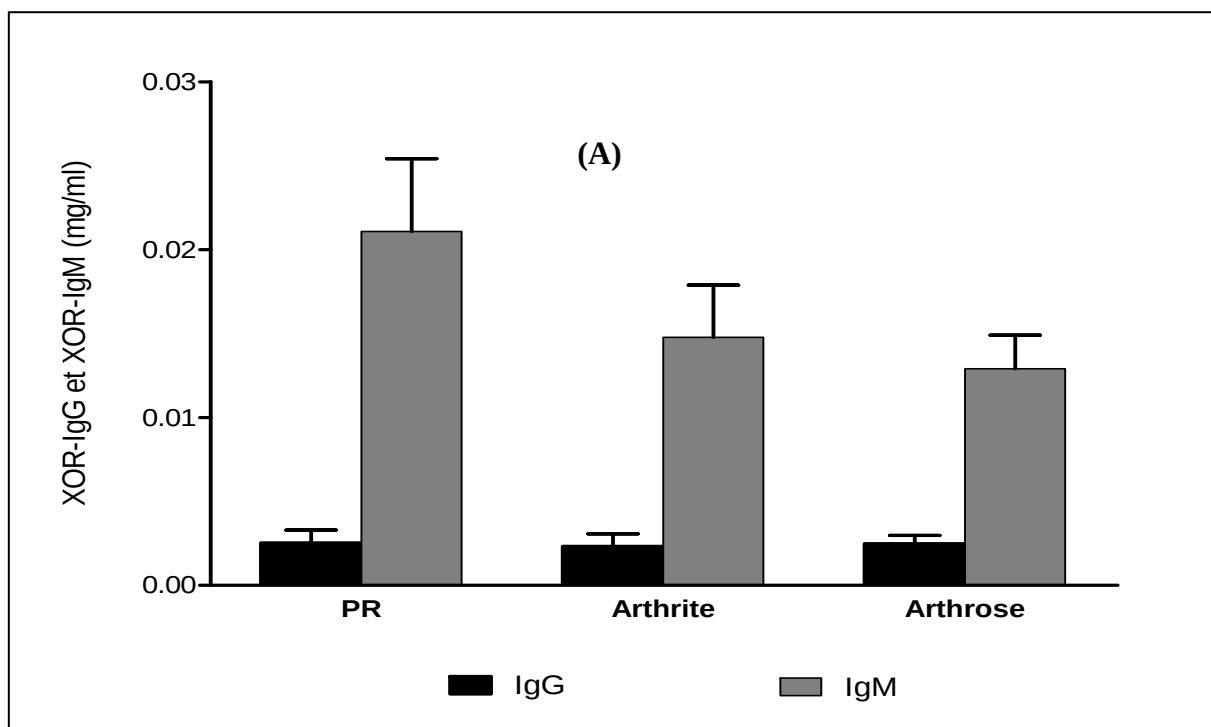


Figure 20. (A) Comparaison entre la concentration des XOR-IC contenant les IgG et les IgM dans le LS et **(B)** dans le sérum des patients atteints d'inflammations articulaires.

Pour évaluer toute corrélation possible entre le titre de ces XOR-IC et la sévérité de la maladie, on a comparé entre le taux des XOR-IC (IgG et IgM) chez les trois catégories de maladies. En ce qui concerne les XOR-IC de type IgG, il n'existe pas de variation

significative entre la PR et les deux autres types de maladies articulaires. Cependant les sérums des patients affectés des arthrites contiennent la concentration la plus élevée ($p < 0.021$) en XOR-IC (IgG) par rapport aux patients qui souffrent d'arthrose et qui représente une maladie dégénérative plutôt qu'inflammatoire (**figure 21 A**). D'autre part notre étude n'a montrée aucune différence entre ces deux types de malades concernant la concentration des XOR-IC (IgM). Mais ce sont les patients atteints de la PR qui semblent avoir la concentration la plus élevée ($p < 0.0139$) en XOR-IC (IgM) dans le LS en comparant avec ceux qui ont une arthrose (**Figure 21 B**).

Ces titres élevés en anticorps XOR-IgM anti-XOR chez les patients atteints de la PR peuvent être dues à la présence d'un taux élevé de la XOR dans le LS. En effet, plusieurs études ont montré que la PR et à moindre degrés les autres inflammations articulaires comme les spondylarthrites séronégatives et la pseudogoutte, sont caractérisés par la formation d'un nouveau réseau vasculaire favorisant de ce fait l'hyperplasie de la membrane synoviale et le recrutement des cellules inflammatoires dans le pannus et qui vont libérer à leurs tour des enzymes impliqués dans la génération des ROS au sein de l'articulation (Zarins et McInerney, 1985, Fournié, 2004 ; Ozgocmen *et al.*, 2004). Parmi ces enzymes on site la XOR, qui est considérée comme un agent pathogène impliqué dans la destruction du cartilage et l'érosion de l'os, suggérant de ce fait une corrélation positive entre le taux de l'enzyme et la sévérité de la maladie articulaire (Al-Muhtaseb *et al.*, 2011).

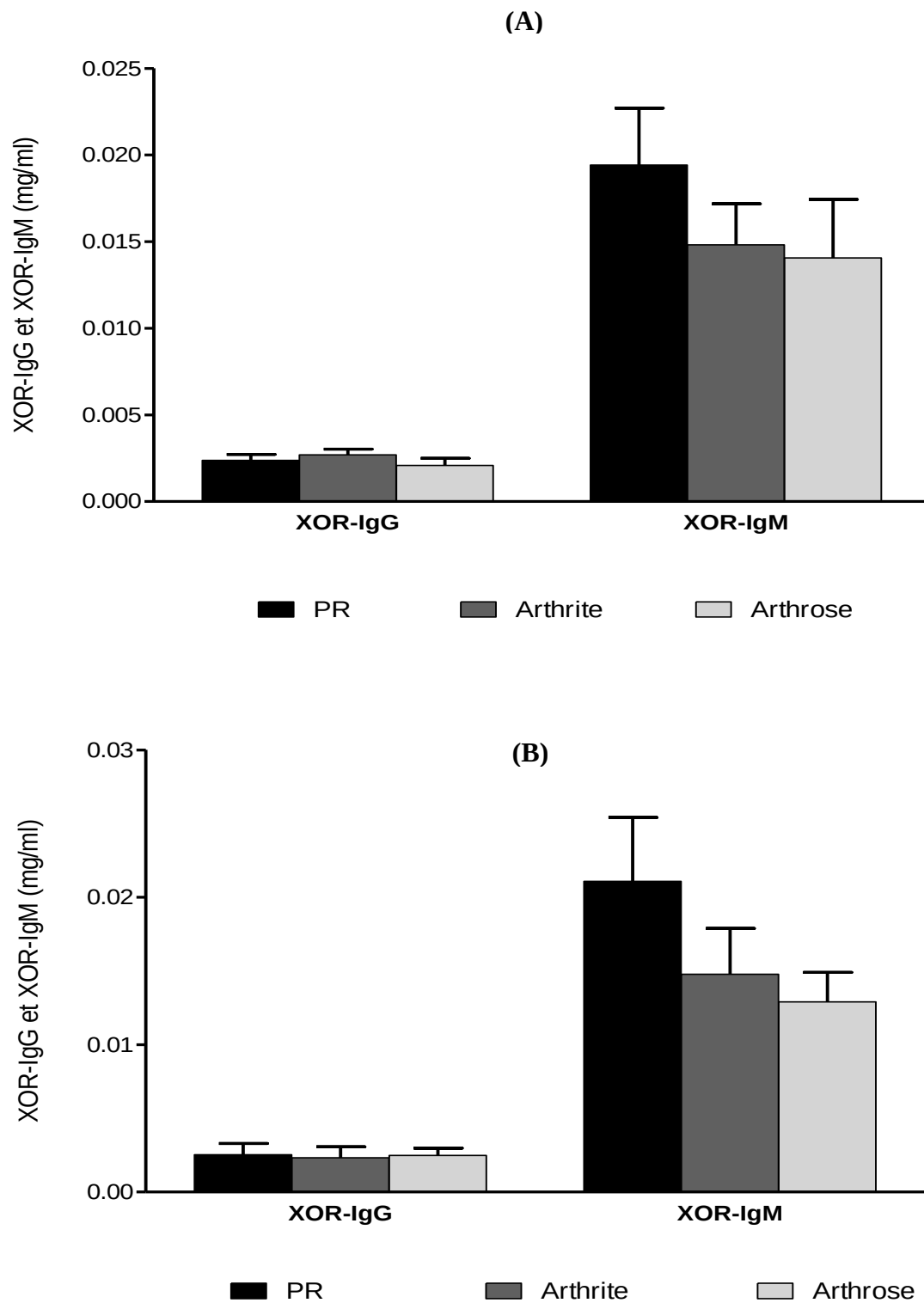


Figure 21 : (A) Comparaison entre les concentrations des XOR-IC (IgG et IgM) sériques, (B) ainsi les XOR-IC (IgG et IgM) dans le LS chez des patients atteints d'inflammations articulaires.

4. Etude du facteur rhumatoïde libre et en complexe

Les FR jouent un rôle important dans l'AR et jusqu'à récemment ils ont été considérés comme le prédictif le plus valable de l'activité et de la progression érosive de l'AR (Dao et Cush, 2006). Peu d'études se sont intéressées à la comparaison des FR libres et en complexes et leur relation avec la sévérité de la maladie articulaire. Pour cette raison, notre étude a porté sur la détermination des IgM-FR sous forme libre et en complexe. D'autre part, nous nous sommes intéressés à la comparaison des titres des RF (libres et en complexes) chez les trois types de malades. Cette recherche dans les couples de sérum et LS est réalisée par le test d'agglutination au latex (**Annexe 1**) et par l'ELISA indirecte et sandwich (**Tableau 4**) en utilisant les IgG comme antigène ou des anti-IgG humaines comme anticorps capteurs. Les résultats ont montré que tous les sérums négatifs en latex sont positifs en ELISA (sauf dans le cas des malades 6,7 et 12 où l'ELISA a montrée que ces patients sont positifs pour les FR libres et négatifs pour les FR complexes). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Arrar *et al.* (2008). Tels résultats peuvent être expliqué par le fait que la technique d'ELISA est plus sensible que la technique d'agglutination classique et que la mesure du FR (IgM) par le test d'agglutination au latex fournit des résultats significativement moins positifs que ceux mesurés par la technique d'ELISA (Syed *et al.*, 2008).

Tableau 4. FR libre et en complexe déterminés par l'ELISA dans les couples des sérums et des liquides synoviaux des patients atteints d'inflammations articulaires.

Maladie	FR libre (µg/ml)		FR complexe (µg/ml)	
	Sérum	LS	Sérum	LS
PR (n=2)	92.14 ± 80.9	94.4 ± 69.2	48.43 ± 29.9	41.66 ± 20.2
Arthrose (n=5)	37.6 ± 5.75	34.86 ± 5.26	17.6 ± 5.31	14.6 ± 2.23
Arthrite (n=6)	33.91 ± 24.03	25 ± 18.31	24.3 ± 20.57	23.72 ± 14.91

Nos résultats montrent que le titre du FR libre n'est pas significativement varié entre le sérum ; 92.14 ± 80.9 µg/ml pour les patients affectés de la PR, 33.91 ± 24.03 µg/ml pour les patients souffrants d'arthrite et 37.6 ± 5.75 µg/ml pour les patients affectés d'arthrose et le LS 94.4 ± 69.2 µg/ml (PR), 25 ± 18.31 µg/ml (Arthrite) et 34.86 ± 5.26 µg/ml (Arthrose), (**Figure 22 A**). Le même résultat est observé concernant la concentration du FR complexe dans le sérum ; 48.43 ± 29.9 µg/ml pour les patients affectés de la PR, 24.3 ± 20.57 µg/ml pour les patients souffrants d'arthrite et 17.6 ± 5.31 µg/ml pour les patients affectés d'arthrose et dans le LS ; 41.66 ± 20.2 µg/ml (PR), 23.72 ± 14.91 µg/ml (Arthrite) et 14.6 ± 2.23 µg/ml (Arthrose), présenté dans la **figure 22 (B)**. Cette similarité de répartition du FR entre le sang et l'articulation concorde avec les résultats trouvés par Jones *et al.* (1982) concernant le FR-IgG, alors qu'ils ont trouvé que le titre du FR-IgM et IgA est plus faible dans le LS. D'autre part on a observé que dans le LS des patients atteints de la PR, le titre du FR libre (94.4 ± 69.2 µg/ml) est significativement ($p < 0.0412$) plus élevé que celui trouvé chez les patients affectés par des arthrites (25 ± 18.31 µg/ml), (**Figure 23 A**). Le même résultat est observé aussi concernant le titre du FR complexe (41.66 ± 20.2 µg/ml), (**Figure 23 B**) et qui est significativement ($p < 0.0384$) plus élevé que celui trouvé chez les patients atteints de l'arthrose (14.6 ± 2.23 µg/ml). Ces résultats confirment la corrélation entre les taux des FR et la sévérité de la maladie puisque la PR représente un degré avancé par rapport aux autres inflammations étudiées. En effet, Jones *et al.* (1982) ont rapporté qu'une fois la maladie articulaire est établie, une inflammation chronique de la synoviale semble être la conséquence d'une auto-immunité appelée FR et son complexe antigène-anticorps. Ils ont comparé le rapport de la concentration de l'albumine dans le LS et dans le sérum (albumine dans le LS / albumine dans le sérum) des patients atteints de l'AR (0.57 - 0.7) et d'autres arthropathies inflammatoires non classées (0.43), et ils ont trouvé que ce rapport est plus élevé chez les patients atteints d'AR.

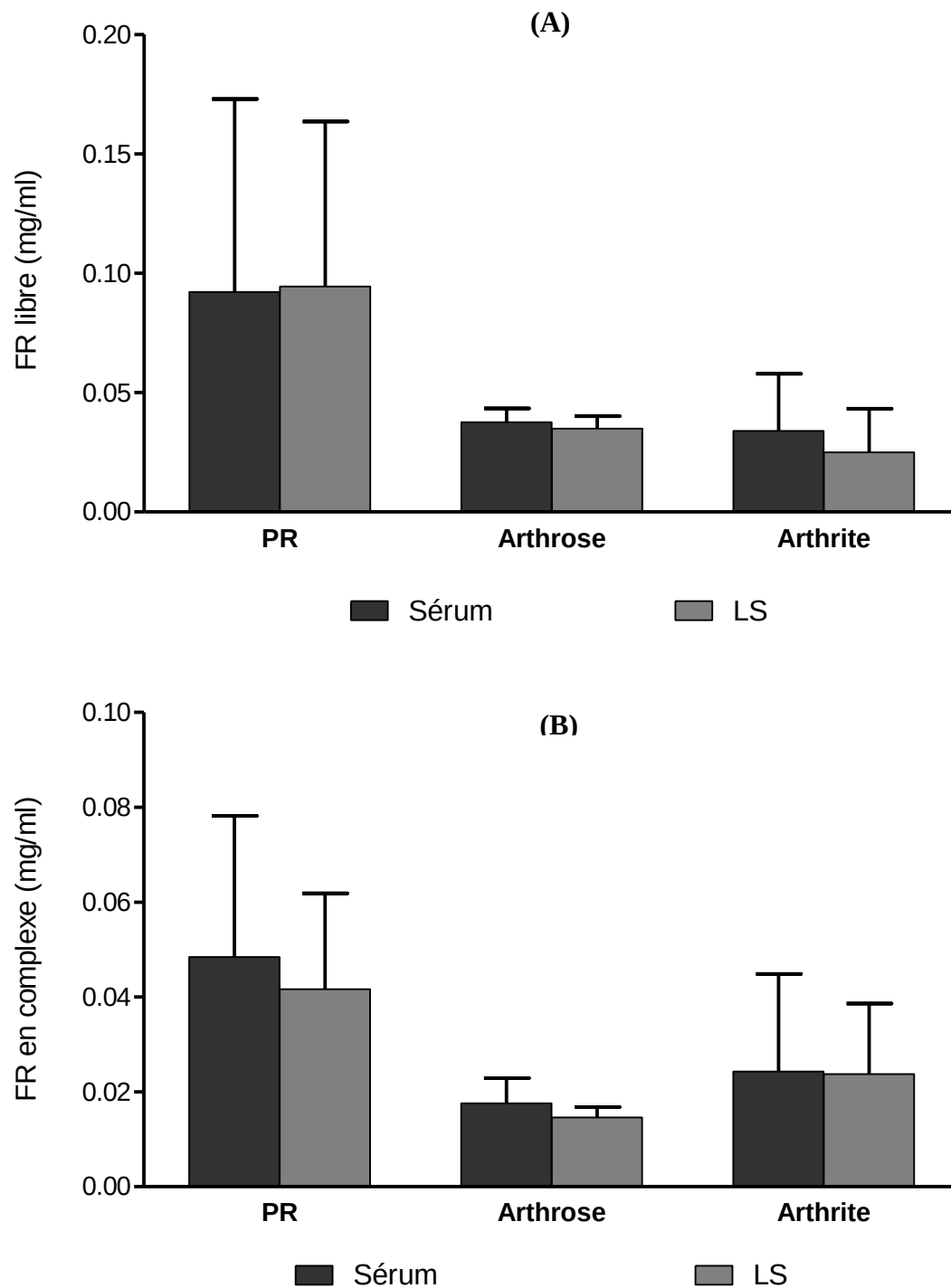


Figure 22. (A) comparaison des titres (mg/ml) du FR libre entre le sérum et le liquide synovial, (B) ainsi que celle du FR en complexe des patients atteints d'inflammations articulaires.

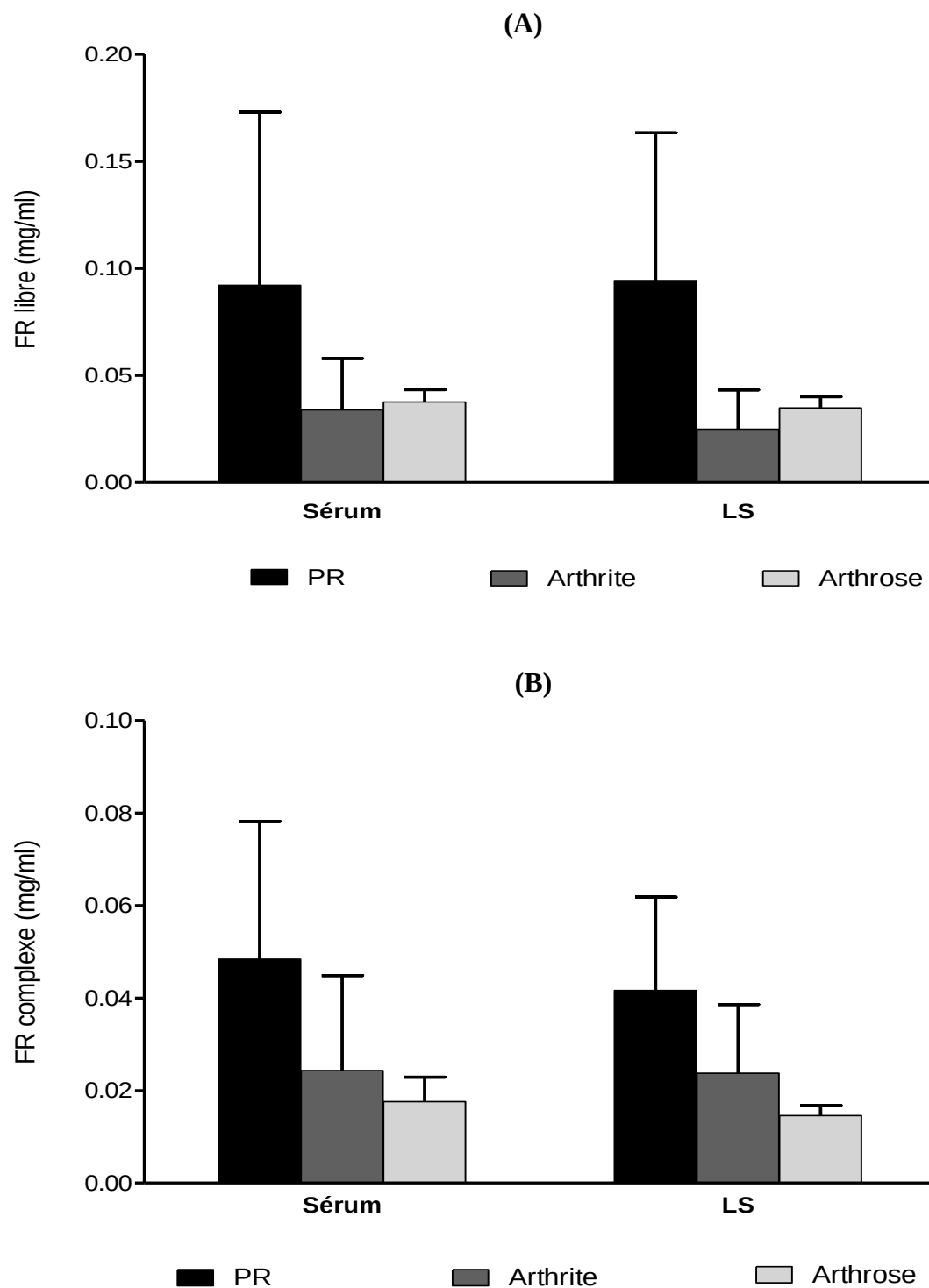


Figure 23. (A) Comparaison entre les titres du FR libre dans le sérum et dans le LS des patients atteints d'inflammations articulaires, et (B) celle du FR complexe.

Tel résultat témoigne que l'inflammation est plus sévère dans la synoviale de l'articulation affectée par l'AR. En effet, la perméabilité estimée par le rapport de la concentration de l'albumine entre le LS et le sérum est plus grande, ce qui permet l'infiltration des lymphocytes dans l'articulation. Plus récemment, Chou *et al.* (2002) ont suggéré que le FR soutient l'inflammation dans l'AR par leur association au fragment Fc ou F (ab)₂ des IgG suivi par l'activation du complément et la production de molécules pro-inflammatoires par les macrophages et les neutrophiles, ainsi les ROS amplifiant la réaction inflammatoire synoviale observée au cours de l'AR (Fabien *et al.*, 2008). L'évidence de la contribution de l'activation du complément dans la pathogénèse de l'AR est donnée selon Linton *et al.* (2000) par la détection de la présence des composés solubles résultants de l'activation du complément par la voie classique et alterne dans le LS d'une articulation enflammée, et ensuite par leur consommation, ainsi par le dépôt du complexe majeur d'attaque membranaire à travers la membrane synovial. Syed et ces collaborateurs (2008) ont rapportés aussi que l'IgM-FR est présent chez les patients de l'AR qui manifeste un développement prolongé de la maladie avec une incapacité fonctionnelle. D'autre part, lorsqu'on compare entre les titres sériques en FR libre et en complexe, ainsi qu'entre les titres synoviaux en FR libre et en complexe, les patients affectés de la PR et des arthrites n'ont pas montré une différence significative. Alors que chez les patients affectés par une arthrose, on a trouvé que le FR libre sérique de 37.6 ± 5.75 µg/ml est significativement ($p < 0.0027$) plus élevé que celui en complexe 17.6 ± 5.31 µg/ml. La même constatation est faite concernant le FR libre synovial de 34.86 ± 5.26 µg/ml qui est significativement ($p < 0.0002$) plus élevé que celui en complexe de 14.6 ± 2.23 µg/ml.

5. Mesure de la protéine C-réactive

A l'état normale, la CRP existe sous forme de trace dans le sang, mais quelques minutes après l'événement aigu, une blessure, une inflammation ou une infection, on observe très rapidement une augmentation de la concentration de cette protéine jusqu'à 1000 fois sa concentration initiale (Otterness, 1994). Dans les maladies inflammatoires chroniques, la concentration de la CRP reste augmentée et montre une certaine corrélation avec l'activité de la maladie. Par ces caractéristiques et à cause de la reproductibilité et l'accessibilité rapide du dosage, la CRP constitue le meilleur marqueur pour dépister un processus inflammatoire ou une infection (Roger *et al.*, 2009), ce qui justifie notre choix pour utiliser ce test.

Nos résultats montrent que chez les patients (9 et 11) atteints de la PR (**Annexe 1**), la concentration sérique et synoviale en CRP est élevée, dépasse 6 mg/l. Dans ce contexte, Saleem *et al.* (2006) ont montré que des taux élevés en CRP ont été détecté dans le sérum des patients atteints de l'AR, le plus souvent pendant les deux ans qui précèdent le début des symptômes. Ces concentrations élevées en CRP sont dues à l'effet stimulateur des cytokines proinflammatoires comme l'IL-6 et TNF α (Sipe, 1995), et qui sont produites en excès par les macrophages activées au cours de la pathogénèse de l'AR (van Leeuwen *et al.*, 1995). Alors que la réduction de la concentration de la CRP est effectuée par l'action des agents antirhumatismaux qui ont pour cible ces cytokines (Sipe, 1995). Il est intéressant de noter que les cytokines proinflammatoires possèdent des inhibiteurs physiologiques, et que la production importante de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra) dans le liquide articulaire de l'AR est un de ces mécanismes de régulation comme le souligne le fait que les animaux déficients pour le gène de l'IL-1Ra développent spontanément des arthrites similaires à celles de l'AR (Falgarone *et al.*, 2005). Du fait que des taux élevés en CRP sont observés au cours d'inflammation et des infections, cette protéine est un marqueur pour plusieurs maladies autres que l'AR (Otterness, 1994), comme il est démontré par notre étude

où la majorité des patients (**Annexe1**) atteints d'arthrites et d'arthrose sont séropositifs pour le test CRP. Néanmoins, chez certains d'entre eux, les liquides synoviaux sont négatifs en CRP. Ceci est expliqué selon Otterness (1994) par le fait que les taux de la CRP sont plus élevés dans la circulation sanguine que dans le LS, résultat de la synthèse de cette protéine dans le foie.

Discussion générale

Dans notre étude réalisée sur des sujets atteints d'inflammations articulaires (PR, arthrite et arthrose), la XOR bovine a été purifiée afin de l'utiliser comme antigène pour la détection des anticorps dirigés contre cette enzyme et qui semble avoir un rôle dans les maladies rhumatismales (Afonso *et al.*, 2007). Nous avons montré l'existence d'une réactivité entre les échantillons (sérum et liquide synovial) des trois catégories de patients et la XOR bovine, ce qui confirme l'existence des anticorps appropriés. Bruder *et al.* (1984) ont attribué la présence de tels autoanticorps dans le sang à l'auto-immunisation contre la XOR qui peut être générée suite aux lésions de l'endothélium vasculaire ou à une immunisation exogène par la XOR contenue dans le lait bovin. Stevens *et al.* (1991) ont attribué la présence des anticorps anti-XOR dans le LS à la libération de la XOR au sein de l'articulation après l'hyperplasie de la membrane synoviale de l'articulation enflammée. Dans notre étude nous avons essayé de trouver une relation entre les taux des anti-XOR dans les deux compartiments (sérum et LS) en vu d'avoir une idée sur le site de leur synthèse et/ou des échanges de ces anticorps. Nos résultats ont montré qu'il n'existe pas de différences significatives entre le sérum et le LS en ce qui concerne la concentration des anticorps libres anti-XOR soit de type IgG ou IgM. Ce phénomène est expliqué par Timoney et Yarkoni (1976) par l'augmentation de la perméabilité de la membrane synoviale, permettant l'échange des protéines entre le sang et l'articulation notamment les anticorps.

Les résultats montrent également que chez les trois catégories de patients, la majorité des anticorps anti-XOR sont de type IgM, ce qui a été récemment observé par Al-Muhtaseb *et al.* (2011) lorsqu'ils ont étudié le taux des anticorps anti-XOR dans le LS des patients atteints d'inflammations articulaires. Ces résultats indiquent que les anticorps anti-XOR possèdent un rôle protecteur soit par élimination de la XOR endogène de la circulation et du LS des patients

atteints d'inflammations articulaires (Klocke *et al.*, 2005) ou par inhibition de l'enzyme (Arrar, 2002).

Nos résultats montrent que les anticorps spécifiques à la XOR peuvent exister sous forme libre et en complexe (IgG et IgM), confirmant les résultats de Arrar *et al.* (2008) et Al-Muhtaseb *et al.* (2011). La détection des complexes immunitaires n'a pas montré une différence significatives entre le sérum et le LS chez les trois catégories de patients. Les complexes immunitaires formés par les IgM dominant nettement.

Les résultats montrent également que la proportion des IgG la plus élevée, détectée dans le sérum et dans le LS des patients atteints d'arthrites et d'arthrose, est sous la forme de complexes. Tandis que le titre des IgM anti-XOR libres n'est pas significativement différent que celui des IgM complexés à la XOR chez les trois catégories de patients. Ces résultats sont rapportés par Al-Muhtaseb *et al.* (2011) qui ont trouvé que les deux classes d'immunoglobulines IgG et IgM spécifiques à la XOR dominant sous forme de complexes, et que l'activité enzymatique correspondante est rarement détectable. Nos résultats concordent aussi avec les travaux de Arrar *et al.*, (2008), qui ont donné une explication à ces résultats par le fait que les complexes immunitaires possèdent un rôle dans l'inhibition de la XOR (rôle bénéfique), comme ils ont décrit que ces complexes immunitaires sont impliqués dans l'entretien de l'inflammation articulaire par la fixation du complément (rôle négatif). Cependant, Mathsson *et al.* (2006) ont attribué le rôle nocif des complexes immunitaires à l'induction de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages *via* les récepteurs du fragment Fc, en particulier TNF α qui joue un rôle dans la pathogénèse de l'AR. Pour confirmer la présence d'une relation entre la sévérité de l'inflammation articulaire et le taux des complexes immunitaires, les concentrations de ces derniers ont été comparées entre les trois groupes de malades. Les patients atteints de l'AR semblent avoir la concentration la plus élevée ($p < 0.0139$) en XOR-IC (IgM) dans le LS par comparaison avec ceux qui ont une

arthrose qui représente une maladie dégénérative plutôt inflammatoire, et que le sérum des patients souffrants d'arthrites contient la concentration la élevée en XOR-IC (IgG) par rapport aux patients qui souffrent d'arthrose ($p < 0.021$).

Beaucoup d'études ont démontré l'association d'un autre type d'autoanticorps à la sévérité de l'AR, nommé le FR et qui peut être détecté chez plus de 70 - 80 % des patients atteints de l'AR dont la classe d'IgM est la plus commune (Vallbracht et Helmke, 2005). Pour cela, on a adopté dans notre étude la détection et la mesure quantitative du FR (IgM) libre et complexe par le test d'agglutination au latex et la technique d'ELISA. On a trouvé que tous les sérums et les liquides synoviaux négatifs en FR par le test d'agglutination au latex sont positifs par la technique d'ELISA. La sensibilité de cette technique a été confirmée d'après l'étude de Vittecoq *et al.*, (2001). Ils ont trouvé que parmi les patients étudiés atteints de l'AR, certains d'entre eux et qui sont séropositifs par l'ELISA, demeuraient séronégatifs par le test d'agglutination, et ont rapporté que la technique d'ELISA possède la plus grande capacité à détecter les FR de la classe IgM dans l'AR très récente.

Nos résultats montrent également que le titre du FR libre ou en complexe n'est pas significativement différent entre le sérum et le LS des trois catégories de patients. D'après la comparaison entre les titres du FR (IgM) libre ainsi qu'entre ceux du FR complexe chez les trois catégories de patients atteints d'inflammations articulaires, on peut conclure qu'il existe une relation entre la présence de ces autoanticorps et la sévérité de la maladie. En effet, les patients atteints de la PR sont caractérisés par une concentration plus élevée en FR libre par rapport à ceux souffrants d'arthrites, et par une concentration plus élevée en FR complexe par rapport aux patients atteints d'arthrose. Dans ce contexte, Mathsson *et al.* (2006) ont rapporté que la présence du FR est associée à un développement plus agressif et plus destructif de l'AR.

Pour confirmer l'existence d'une inflammation chez les patients, un test de routine a été pratiqué, la CRP. Du fait que plusieurs événements entraînent une augmentation de la CRP : traumatismes et brûlures, la chirurgie, les nécroses tissulaires, les cancers et les maladies inflammatoires (Roger *et al.*, 2009). La CRP est un marqueur de faible spécificité. En effet, et malgré les différences entre nos trois catégories de malades, les taux en CRP sont élevés dans le sérum et le LS de la majorité des patients.

En conclusion, les résultats montrent qu'il existe une corrélation entre le taux des anticorps anti-XOR et la sévérité de la maladie articulaire. En effet, les échantillons prélevés de patients atteints de l'AR contiennent la concentration la plus élevée de ces anticorps.

La présente étude peut être considérée comme préliminaire vu le nombre des échantillons étudiés et le temps imparti pour la réalisation des travaux. Des études supplémentaires incluant les points suivants nous semblent nécessaires :

- Etudier l'inflammation articulaire à différents stades en suivant les patients dès les premiers symptômes de la maladie.
- Détecter les autres types d'autoanticorps qui sont en relation avec le développement des maladies articulaires, autres que les anti-XOR et les facteurs rhumatoïdes tels que les anticorps anti-collagène et anti-peptide cyclique citrulliné...
- Faire l'étude microbiologique des liquides synoviaux afin de trouver une étiologie possible entre les microorganismes et l'inflammation articulaire.

Références bibliographiques

- Aguillon J C, Cruzat A, Aravena O, Salazar L, Llanos C and Cuchacovich M (2006). Could single-nucleotide polymorphisms (SNPs) affecting the tumour necrosis factor promoter be considered as part of rheumatoid arthritis evolution?. *Immunobiology* **211**, 75-84.
- Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P et Lomri A (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme* **74**, 636-643.
- Al-Muhtaseb N, Al-Kaissi E, Thawaini A J, Eldeen Z M, Al-Muhtaseb S and Al-Saleh B (2011). The role of human xanthine oxidoreductase (HXOR), anti-HXOR antibodies, and microorganisms in synovial fluid of patients with joint inflammation. *Rheumatology International*. In press.
- Arrar L, Selloum L, Maiza A, Touabti A, Allali M and Guenfoud K (1995). Relationship between levels of IgG and IgM and IgM rheumatoid factor in human sera. *Biochemical Society Transactions* **23**, 475S.
- Arrar L (2002). Etude des anticorps anti xanthine oxydoréductase dans les sérums et liquides synoviaux de sujets atteints de pathologies rhumatoïdes. Thèse de Doctorat d'Etat en Biochimie/immunologie. Université Ferhat Abbas Sétif, Algérie. pp 95.
- Arrar L, Hanachi N, Rouba K, Charef N, Khennouf S and Baghiani A (2008). Anti-xanthine oxydase antibodies in sera and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and other joint inflammations. *Saudi Medical Journal* **29**(6), 803-807.
- Auger I, Sebbag M, Vincent C, Balandraud N, Guis S, Nogueira L, Svensson B, Cantagrel A, Serre G and Roudier J (2005). Influence of HLA-DR genes on the production of rheumatoid arthritis specific autoantibodies to citrullinated fibrinogen. *Arthritis and Rheumatism* **52**(11), 3424-3432.
- Baghiani A, Harrison R and Benboubetra M (2003). Purification and partial characterisation of camel milk xanthine oxidoreductase. *Archives of Physiology and Biochemistry* **111**(5), 407-414.
- Bernard C (2004). Faut-il traiter de façon agressive une polyarthrite débutante?. *Revue du Rhumatisme* **71**, 854-859.
- Bray R C (1995). Molybdenum iron-sulfur flavin hydroxylases and related enzymes. In Boyer P D. The "Enzymes" 3rd Ed. New York. *Academic Press*, 299-419.
- Breban M, Leboime A, Fert I et Furet J P (2011). Microbiote intestinal et spondylarthrites : quelles perspectives ? *Revue du Rhumatisme* **78**, 35-36.
- Bruder G, Jarasch E D and Heid H W (1984). High concentrations of antibodies to xanthine oxidase in human and animal sera. Molecular characterization. *Journal of Clinical Investigation* **74**(3), 783-794.
- Caspi D, Anouk M, Golan I, Paran D, Kaufman I, Wigler I, Levartovsky D, Litinsky I and Elkayam O (2006). Synovial fluid levels of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and

- IgA rheumatoid factor in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* **55**(1), 53-56.
- Chen H A, Chen C H, Liao H T, Lin Y J, Chen P C, Chen W S and Chou C T (2011). Factors associated with radiographic spinal involvement and Hip involvement in ankylosing spondylitis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* **40**(6), 552-558.
- Chou C T (2002). Binding of rheumatoid and lupus synovial fluids and sera-derived human IgG rheumatoid factor to degalactosylated IgG. *Archives of Medical Research* **33**, 541-544.
- Colantuoni G, Quintero M, Panasyuk A, Lomri A et Mitrovic D R (2005). L'acide arachidonique et ses métabolites, sécrétés par le tissu synovial rhumatoïde et arthrosique, interviennent-ils dans l'inhibition de la synthèse d'ADN par les chondrocytes articulaires humains en culture ? Une nouvelle approche d'analyse des mécanismes des lésions tissulaires. *Revue du Rhumatisme* **72**, 1288-1294.
- Daha N A, Banda N K, Roos A, Beurskens F J, Bakker J M, Daha M R and Trouwa L A (2011). Complement activation by (auto-) antibodies Molecular. *Immunology* **48**, 1656-1665.
- Damiano J et Bardin T (2004). Liquide synovial normal et pathologique. *EMC Rhumatologie Orthopédie* **1**, 2-16.
- Dao K and Cush J J (2006). Acute polyarthritis. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology* **20**(4), 653-672.
- de Almeida D E, Ling S and Holoshitz J (2011). New insights into the functional role of the rheumatoid arthritis shared epitope. *FEBS Letters*. In press.
- de Rycke L, Peene I, Hoffman I E A, Kruithof E, Union A, Meheus L, Lebeer K, Wyns B, Vincent C, Mielants H, Boullart L, Serre G, Veys E M and De Keyser F (2004). Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. *Annals of Rheumatic Diseases* **63**, 1587-1593.
- Dixon W G and Symmons D P M (2005). Does early rheumatoid arthritis exist? *Best Practice and Research Clinical Rheumatology* **19**(1), 37-53.
- Dorner M M and Uhr J W (1964). Immunologic tolerance after specific immunization. *The Journal of Experimental Medicine* **120**(3), 435-447.
- Dougados M and Baeten D (2011). Spondyloarthritis. *The Lancet* **377**, 2127-2137.
- Duarte G V, Faillace C and de Carvalho J F (2012). Psoriatic arthritis. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology* **26**, 147-156.
- Ea H K (2011a). De l'hyperuricémie à la goutte : physiopathologie. *Revue du Rhumatisme* **78**, 103-108.
- Ea H K (2011b). Physiopathologie de l'inflammation goutteuse. *Arthropathies Microcristallines* **40**, 836-843.
- El Desoky E S (2001). Pharmacotherapy of rheumatoid arthritis: an overview. *Current Therapeutic Research* **62**(2), 92-112.

Engdahl C, Jochems C, Windahl S H, Borjesson A E, Ohlsson C, Carlsten H and Lagerquist M K (2010). Amelioration of collagen-induced arthritis and immune-associated bone loss through signaling via estrogen receptor α , and not estrogen receptor β or g protein-coupled receptor 30. *Arthritis and Rheumatism* **62**(2), 524-533.

Engstrom G, Gerhardsson de Verdier M, Rollof J, Nilsson P M and Lohmander L S (2009). C-reactive protein, metabolic syndrome and incidence of severe hip and knee osteoarthritis. A population-based cohort study. *Osteoarthritis and Cartilage* **17**, 168-173.

Fabien N, Goetz J, Sordet C, Humbel R L et Sibilia J (2008). Nouveaux autoanticorps de la polyarthrite rhumatoïde : les autoanticorps anti-peptides ou protéines citrullinées et les autres. *Presse Medicale* **37**, 1756-1766.

Falgarone G, Jaen O et Boissier M C (2005). Rôle de l'immunité innée dans la polyarthrite rhumatoïde. *Revue du Rhumatisme* **72**, 17-26.

Favero M, Schiavon F, Riato L, Carraro V and Punzi L (2008). Rheumatoid arthritis is the major risk factor for septic arthritis in rheumatological settings. *Autoimmunity Reviews* **8**, 59-61.

Firestein G S (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* **423**, 356-361.

Firestein G S (2008). Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In Firestein G S, Budd R C, Harris E D, McInnes I B, Ruddy S and Sergent J S. Kelley's textbook of rheumatology (volume II), 8th ed. Philadelphia: Elsevier ;1035-1085.

Fournié B (2004). Anatomopathologie et anatomoclinique des spondylarthrites. *Revue du Rhumatisme* **71**, 1130-1135.

Gladman D D, Farewell V T, Rahman P, Schentag C T, Pellett F, Ng C M and Wade J A (2001). HLA-DRB1*04 alleles in psoriatic arthritis: comparison with rheumatoid arthritis and healthy controls. *Human Immunology* **62**, 1239-1244.

Graham D A, Mawhinney K A, Adair B M and Merza M (1998). Testing of bovine sera by ELISA for IgG, IgM and IgA rheumatoid factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **61**, 239-250.

Gran J T and Ostensen M (1998). Spondyloarthritides in females. *Bailliere's Clinical Rheumatology* **12**(4), 695-715.

Henrotin Y E, Bruckner P and Pujol J P L (2003). The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *OsteoArthritis and Cartilage* **11**, 747-755.

Hill R and Nishino T (1995). Xanthine oxidase and xanthine deshydrogenase. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* **9**, 995-1003.

Hill J A, Southwood S, Sette A, Jevnikar A M, Bell D A and Cairns E (2003). Cutting edge: the conversion of arginine to class II molecule arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC interaction with the rheumatoid citrulline allows for a high-affinity peptide. *The Journal of Immunology* **171**, 538-541.

Hirose C B and Wright R W (2007). Calcium pyrophosphate dihydrate deposition disease (Pseudogout) after total knee arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty* **22**(2), 273-276.

- Ho C Y and Clifford A J (1976). Digestion and absorption of bovine milk xanthine oxidase and its role as an aldehyde oxidase. *Journal of Nutrition* **106**(11), 1600-1609.
- Holland T A and Mikos A G (2003). Advances in drug delivery for articular cartilage. *Journal of Controlled Release* **86**, 1-14.
- Hughes D (2008). Osteoarthritis and inflammatory arthritis. *Surgery* **27**(2), 75-79.
- Jones V E, Jacoby R K, Cowley P J and Warren C (1982). Immune complexes in early arthritis. II. Immune complex constituents are synthesized in the synovium before rheumatoid factors. *Clinical and Experimental Immunology* **49**, 31-40.
- Khurana R and Berney S M (2005). Clinical aspects of rheumatoid arthritis. *Pathophysiology* **12**, 153-165.
- Klocke R, Mani A R, Moore K P, Blake D R and Mapp P I (2005). Inactivation of xanthine oxidoreductase is associated with increased joint swelling and nitrotyrosine in acute antigen-induced arthritis. *Clinical Experimental Rheumatology* **23**, 345-350.
- Laemli U K (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lioté F and Ea H K (2007). Physiopathogénie de l'inflammation microcristalline. *Revue du Rhumatisme* **74**, 131-137.
- Lorenz H and Richter W (2006). Osteoarthritis: Cellular and molecular changes in degenerating cartilage. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* **40**, 135-163.
- MacMullana P, McMahonb G et McCarthy G (2011). Détection des cristaux de phosphate de calcium basique dans l'arthrose. *Revue du Rhumatisme* **78**, 220-226.
- Majorczyk E, Pawlik A and Kuśnierczyk P (2010). PTPN22 1858CNT polymorphism is strongly associated with rheumatoid arthritis but not with a response to methotrexate therapy. *International Immunopharmacology* **10**, 1626-1629.
- Massardo L, Aguirre V, Garcia M E, Cervilla V, S Nicovani, Gonzdlez A, Rivero S and Sergio Jacobelli (1995). Clinical expression of rheumatoid arthritis in Chilean patients. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* **25**(3), 203-213.
- Mathsson L, Lampa J, Mullazehi M and Rönnelid J (2006). Immune complexes from rheumatoid arthritis synovial fluid induce FcγRIIa dependent and rheumatoid factor correlated production of tumour necrosis factor-α by peripheral blood mononuclear cells. *Arthritis Research and Therapy* **8**(3), 1-10.
- McCarty S, Syed F and Bayat A (2010). Role of the HLA system in the pathogenesis of Dupuytren's disease. *Hand (NY)* **5**(3), 241-250.
- Mease P J and Reich K (2009). Alefacept with methotrexate for treatment of psoriatic arthritis: Open-label extension of a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of the American Academy of Dermatology* **60**(3), 403-411.
- Miesel R and Zuber M (1993). Elevated levels of xanthine oxidase in serum of patients with inflammatory and autoimmune heumatic diseases. *Inflammation* **17**(5), 551-561.

- Mor A, Abramson S B and Pillinger M H (2005). The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clinical Immunology* **115**, 118-128.
- Morel J, Miossec P and Combe B (2004). Immunopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. *EMC-Rhumatologie Orthopédie* **1**, 218-230.
- Myers S L (1999). Synovial fluid markers in osteoarthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America* **25**(2), 433-449.
- Narváez J, Narváez J A, de Albert M, Gómez-Vaquero C and Nolla J M (2012). Can magnetic resonance imaging of the hand and wrist differentiate between rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis in the early stages of the disease?. *MRI features in early RA and PsA*. In press.
- Nakamura M and Yamazaki I (1982). Preparation of bovine milk xanthine oxidase as a dehydrogenase form. *Journal of Biochemistry* **92**, 1279-1286.
- Nijenhuis S, Zendman A J W, Vossenaar E R, Pruijn G J M and vanVenrooij W J (2004). Autoantibodies to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis: clinical performance and biochemical aspects of an RA-specific marker. *Clinica Chimica Acta* **350**, 17-34.
- Ollier W E R (2001). What is the natural history of rheumatoid arthritis?. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology* **15**(1), 27-48.
- Østensen M and Villiger P M (2002). Immunology of pregnancy as a remission inducing agent in rheumatoid arthritis. *Transplant Immunology* **9**, 155-160.
- Ostergaard K and Salter D M (1998). Immunohistochemistry in the study of normal and osteoarthritic articular cartilage. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **33**(2), 93-168.
- Otterness I G (1994). The value of C-reactive protein measurement in rheumatoid arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* **24**(2), 91-104.
- Ozgocmen S, Kiris A, Kocakoc E, Ardicoglu O et Kamanli A (2004). Evaluation de la synovite rhumatoïde des articulations métacarpophalangiennes par échodoppler pulsé: relations entre vascularisation synoviale et densité osseuse périarticulaire. *Revue du Rhumatisme* **71**, 763-767.
- Page S, Powell D, Benboubetra M, Stevens C R, Blake D R, Selase F, Wolstenholme A J and Harrison R (1998). Xanthine oxidoreductase in human mammary epithelial cells: activation in response to inflammatory cytokines. *Biochimica et Biophysica Acta* **1381**, 191-202.
- Panayi G S (2005). B cells: a fundamental role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis?. *Rheumatology* **44**, 3-7.
- Perricone C, Ceccarelli F and Valesini G (2011). An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: A never-ending story. *Autoimmunity Reviews* **10**, 599-608.
- Poole A R (2003). Biochemical/immunochemical biomarkers of osteoarthritis: utility for prediction of incident or progressive osteoarthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America* **29**, 803-818.

- Pratt A G, Isaacs J D and Matthey D L (2009). Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid Arthritis. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology* **23**, 37-48.
- Pullerits R, Bokarewa M, Dahlberg L and Tarkowski A (2007). Synovial fluid expression of autoantibodies specific for RAGE relates to less erosive course of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **46**, 1367-1371.
- Punzi L, Frigato M, Frallonardo P and Ramonda R (2010). Inflammatory osteoarthritis of the hand. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology* **24**, 301-312.
- Roger P M, Hung S, de Salvador F, Allieri-Rosenthal A, Farhad R, Pulcini C et Cua E (2009). Utilité de la C-reactive protein dans le suivi thérapeutique des patients infectés. *Médecine et Maladies Infectieuses* **39**, 319-324.
- Rojas-Villarraga A, Diaz F J, Calvo-Paramo E, Salazar J C, Iglesias-Gamarra A, Mantilla R D and Anaya J M (2009). Familial disease, the HLA-DRB1 shared epitope and anti-CCP antibodies influence time at appearance of substantial joint damage in rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity* **32**, 64-69.
- Rose H M, Ragan C, Pearce E and Lipman M O (1948). Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis. *Proceeding of The Society for Experimental Biology* **68**, 1.
- Rouquette M, Pagea S, Bryanta R, Benboubetra M, Stevens C R, Blake D R, Whish W D, Harrison R and Tosh D (1998). Xanthine oxidoreductase is asymmetrically localised on the outer surface of human endothelial and epithelial cells in culture. *FEBS Letters* **426**, 397-401.
- Rousseaux-Prevost R, de Almeida M, Arrar L, Hublau P and Rousseaux J (1989). Antibodies to sperm basic nuclear proteins detected in infertile patients by dot-immunobinding and ELISA. *American Journal of Reproductive Immunology* **20**, 17-20.
- Saleem B, Cox S R and Emery P (2006). Biomarkers: Strategies to predict outcome of rheumatoid arthritis. *Immunological Disorders and Autoimmunity* **3**(1), 11-16.
- Sanders S A, Eisenthal R and Harrison R (1997). Oxidation of NADH by human xanthine oxidoreductase: generation of superoxide anion. *European Journal of Biochemistry* **245**, 541-548.
- Sipe J D (1995). Acute-phase proteins in osteoarthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* **25**(2), 75-86.
- Smith H S, Bracken D and Smith J M (2011). Gout: current insights and future perspectives. *The Journal of Pain* **12**(11), 1113-1129.
- Stenberg P, Roth B and Wollheim F A (2009). Peptidylarginine deiminases and the pathogenesis of rheumatoid arthritis a reflection of the involvement of transglutaminase in coeliac disease. *European Journal of Internal Medicine* **20**, 749-755.
- Stevens C R, Benboubetra M, Harrison R, Sahinoglu T, Smith E C and Blake D R (1991). Localisation of xanthine oxidase to synovial endothelium. *Annals of the Rheumatic Diseases* **50**, 760-762.

- Swales C and Athanasou N A (2010). The pathobiology of osteoarthritis. *Orthopaedics and Trauma* **24**(6), 399-404.
- Syed R H, Gilliam B E and Moore T L (2008). Rheumatoid factors and anticyclic citrullinated peptide antibodies in pediatric rheumatology. *Current Rheumatology Reports* **10**, 156-163.
- Timoney J F and Yarkoni U (1976). Immunoglobulins IgG and IgM in synovial fluids of swine with ebysipelothrix polyarthritis. *Veterinary Microbiology* **1**, 467-474.
- Tobón G J, Youinou P and Saraux A (2010). The environment, geo epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity* **35**, 10-14.
- Toussierot E and Roudier J (2007). Pathophysiological links between rheumatoid arthritis and the Epstein Barr virus: An update. *Joint Bone Spine* **74**, 418-426.
- Vallbracht I and Helmke K (2005). Additional diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews* **4**, 389-394.
- van Boekel M A M, Vossenaar E R, van den Hoogen F H J and van Venrooij W J (2002). Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Research* **4**, 87-93.
- van der Harst M R, Bull S, Brama P A J, Barneveld A B, van Weeren P R and van de Lest C H A (2006). Nitrite and nitrotyrosine concentrations in articular cartilage, subchondral bone, and trabecular bone of normal juvenile, normal adult, and osteoarthritic adult equine metacarpophalangeal joints. *Journal of rheumatology* **33**(8), 1662-1667.
- van Gaalen F A, Linn-Rasker S P, van Venrooij W J, de Jong B A, Breedveld F C, Verweij C L, Toes R E M and Huizinga T W J (2004). Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis. *Arthritis and Rheumatism* **50**(3), 709-715.
- van Leeuwen M A, Westra J, Limburg P C, van Riel P L C M and van Rijswijk M H (1995). Interleukin-6 in relation to other proinflammatory cytokines, chemotactic activity and neutrophil activation in rheumatoid synovial fluid. *Annals of the Rheumatic Diseases* **54**, 33-38.
- Vega D, Maalouf N M and Sakhaee K (2007). The Role of receptor activator of nuclear factor- κ B (rank)/rank ligand/osteoprotegerin: clinical implications. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **92**(12), 4514-4521.
- Vignon E (2000). Hand osteoarthritis and generalized osteoarthritis: a need for clarification. *Osteoarthritis and Cartilage* **8**, 22-24.
- Vittecoq O, Jouen-Beades F, Krzanowska K, Bichon-Tauvel I, Ménard J F, Daragon A, Tron F et Le Loët X (2001). Les facteurs rhumatoïdes, les anticorps antifilagrine et la faible production in vitro d'interleukine 2 et d'interféron- γ sont des marqueurs immunologiques utiles au diagnostic précoce de la polyarthrite rhumatoïde dans une population de recrutement libéral. Étude préliminaire. *Review of Rheumatology* **68**, 239-49.

- Waller E (1940). On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* **17**(2), 172–188.
- Wakitani S, Muratan N, Toda Y, Ogawa R, Kaneshige T, Nishimura Y and Ochi T (1997). The relationship between HLA-DRB1 alleles and disease subsets of rheumatoid arthritis in Japanese. *British Journal of Rheumatology* **36**, 630-636.
- Westacott C I and Sharif M (1996). Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction?. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* **25**(4), 254-272.
- Westman E, Lundberg K and Harris H E (2006). Arthritogenicity of collagen type II is increased by chlorination. *Clinical and Experimental Immunology* **145**, 339-345.
- Witten T M (2000). Modeling the progression of articular erosion in rheumatoid arthritis (RA): Initial mathematical models. *Mathematical and Computer Modelling* **31**, 31-38.
- Wu J, Hecker G J and Chiamvimonvat N (2009). Antioxidant enzyme gene transfer for ischemic diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**, 351-363.
- Zanelli E, Jones G, Pascual M, Eerligh P, van der Slik A R, Zwinderman A H, Verduyn W, Schreuder G M T, Roovers E, Breedveld F C, de Vries R R P, Martin J and Giphart M J (2001). The Telomeric part of the HLA region predisposes to rheumatoid arthritis independently of the class II loci. *Human Immunology* **62**, 75-84.
- Zarins B and McInerney V K (1985). Calcium pyrophosphate and pseudogout. *The Journal of Arthroscopic and Related Surgery* **1**(1), 8-16.
- Zrour S H, Boumiza R, Sakly N, Mannai R, Korbaa W, Younes M, Bejia I, Touzi M and Bergaoui N (2010). The impact of pregnancy on rheumatoid arthritis outcome: The role of maternofetal HLA class II disparity. *Joint Bone Spine* **77**, 36-40.

Annexe 1. Les résultats de détermination du FR (par le test d'agglutination au latex) et de CRP chez les patient atteints de la PR (9,11), des arthrites (1, 3, 4, 6, 7et 13) et de l'arthrose (2, 5, 8, 10 et 12).

Malade	Age	Sexe	Maladie	Latex	CRP
1	-	-	-	Ser ⁻ LS ⁻	Ser ⁺ LS ⁻
2	27	H	Arthrose du genou	Ser ⁻ LS ⁺	Ser ⁻ LS ⁻
3	23	H	Arthrite du genou	Ser ⁺ LS ⁻	Ser ⁺ LS ⁻
4	73	F	Arthrite du genou	Ser ⁺ LS ⁻	Ser ⁺ LS ⁻
5	87	F	Arthrose	Ser ⁻ LS ⁻	Ser ⁺ LS ⁺
6	63	F	Arthrite du genou droit	Ser ⁻ LS ⁺	Ser ⁻ LS ⁻
7	83	H	Arthrite chronique des genoux et des poignets	Ser ⁺ LS ⁺	Ser ⁻ LS ⁻
8	58	F	Arthrose	Ser ⁻ LS ⁻	Ser ⁻ LS ⁻
9	67	F	Polyarthrite rhumatoïde	Ser ⁺ LS ⁺	Ser ⁺ LS-
10	69	H	Arthrose	Ser ⁻ LS ⁺	Ser ⁻ LS ⁻
11	71	H	Polyarthrite rhumatoïde	Ser ⁻ LS ⁻	Ser ⁺ LS ⁺
12	57	H	Arthrose	Ser ⁻ LS ⁻	Ser ⁺ LS ⁺
13	-	-	Arthrite du genou	Ser ⁻ LS ⁻	Ser ⁺ LS ⁺