

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

**RÔLE DE POLYMORPHISMES NUCLÉOTIDIQUES DANS LES GÈNES
DE L'INTERLEUKINE-4 ET SON RÉCEPTEUR ET DU CORÉCEPTEUR
CD40, ET DES ALLÈLES HLA-DR, DANS LA PROGRESSION DE LA
POLYARTHRITE INFLAMMATOIRE D'INSTALLATION RÉCENTE**

Par
Gabrielle Sauvageau

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Jacques Bernier, PhD
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Fawzi Aoudjit, PhD
Faculté de médecine
Université Laval

Directeur de recherche

Claude Daniel, PhD
INRS-Institut Armand-Frappier

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr Claude Daniel, de m'avoir accueillie dans son laboratoire, et pour son support et son expertise tout au long de ma maîtrise.

Je remercie le Dr Gilles Boire et Nathalie Carrier, pour toute leur aide lors de l'analyse des résultats, la rédaction de ce mémoire, et la présentation de nos travaux en congrès.

Je remercie le Dr Yves St-Pierre, Andrée-Anne Grosset et Maryline Labrie pour leur aide lors de la mise au point du typage de CD40.

Je remercie les membres du laboratoire d'histocompatibilité, ainsi que mes collègues au laboratoire, particulièrement Benoît, William, et Alexandre.

Je remercie également mes collègues et amis de l'Institut, pour les bons moments.

Enfin, je remercie sincèrement mes parents, Elaine et Léon-Paul, et ma conjointe Vicki, pour tout leur soutien tout au long de ce projet. Je tiens également à remercier Ginette Cyr et Jean Sauvageau pour leur support financier pendant mes études universitaires.

RÉSUMÉ

Jusqu'à 1% de la population canadienne est affectée par la polyarthrite rhumatoïde, une maladie causant de la douleur, un handicap progressif, et des manifestations systémiques importantes. La progression très hétérogène de la polyarthrite rhumatoïde et les effets secondaires graves associés à certains traitements mettent en valeur l'importance d'identifier des marqueurs pronostiques fiables permettant de prédire la progression de la maladie chez les patients individuels. Ce projet de recherche visait à identifier des marqueurs immunogénétiques, spécifiquement au niveau des gènes HLA-DR, IL4, IL4R et CD40, associés à des issues particulières de la maladie chez les patients de la cohorte EUPA, et s'insère dans un projet plus vaste explorant diverses avenues pour identifier des biomarqueurs pronostiques additionnels. Le génotypage des allèles HLA-DR des patients a été effectué, et les patients ont été triés selon la présence ou l'absence de deux épitopes d'intérêt, soient l'épitope partagé (*shared epitope*) et l'épitope protecteur DERA. Une technique de génotypage des polymorphismes nucléotidiques a été développée, validée, et appliquée. Enfin, des analyses statistiques ont établi des corrélations entre le génotype et diverses issues de la maladie. Nos résultats démontrent l'effet protecteur hautement significatif de l'épitope DERA, présent dans certains allèles HLA-DR chez nos patients. Nous démontrons aussi une association significative entre des allèles atypiques au niveau de polymorphismes dans IL4, IL4R et CD40 et des issues de la maladie, soient le dommage radiographique, à l'incapacité fonctionnelle, et à la probabilité d'entrer en rémission chez les patients de la cohorte EUPA. Globalement, nous avons démontré l'importance du génotypage de ces marqueurs chez les patients atteints de polyarthrite inflammatoire d'inflammation récente, puisque les indices tirés de ces typages fournissent de l'information additionnelle permettant aux cliniciens d'identifier les patients chez qui un traitement agressif serait bénéfique et, inversement, les patients qui pourraient être épargnés des traitements plus agressifs. Nos données viennent s'ajouter à celles obtenues par les études effectuées dans le cadre des plusieurs autres volets de ce projet multi-institutionnel concernant les biomarqueurs pronostiques de la polyarthrite rhumatoïde.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	II
RÉSUMÉ	III
TABLE DES MATIÈRES.....	IV
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	VIII
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1: REVUE DE LITTÉRATURE.....	3
1 LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE.....	3
1.1 <i>Épidémiologie</i>	3
1.2 <i>Diagnostic</i>	3
1.3 <i>Incapacité fonctionnelle</i>	5
1.4 <i>Conséquences socioéconomiques</i>	7
2 PATHOGENÈSE I : PHASE PRÉ-ARTICULAIRE	8
2.1 <i>Facteurs génétiques</i>	8
2.1.1 HLA.....	8
2.1.2 Épitope partagé (<i>shared epitope</i>)	10
2.1.3 Épitope de protection DERA 11	11
2.1.4 IL-4.....	11
2.1.5 CD40.....	13
2.1.6 PTPN22	14
2.1.7 Autres gènes	15
2.2 <i>Facteurs environnementaux</i>	16
2.2.1 Tabagisme	16
2.2.2 Agents infectieux	17
3 PATHOGENÈSE II : PRODUCTION D'ANTICORPS AUTOEACTIFS.....	18
3.1 <i>Facteur rhumatoïde</i>	18
3.2 <i>ACPA et anti-CCP</i>	19
3.3 <i>Anti-Sa</i>	20
4 PATHOGENÈSE III : PHASE CLINIQUE	21
4.1 <i>Synovite</i>	21
4.1.1 Rôle du système immunitaire adaptatif	21
4.1.2 Activité de la maladie	22
4.2 <i>Dommage structural</i>	25
4.2.1 Dégradation du cartilage	27
4.2.2 Érosion osseuse	29
4.3 <i>Manifestations systémiques</i>	32
5 TRAITEMENT DE L'ARTHRITE RHUMATOÏDE	35
5.1 <i>Traitements non-pharmacologiques</i>	35
5.2 <i>Traitements pharmacologiques</i>	37

5.2.1	Anti-inflammatoires non-stéroïdiens	37
5.2.2	Corticostéroïdes.....	38
5.3	DMARDs.....	38
5.3.1	DMARDs synthétiques.....	39
5.3.2	Méthotrexate.....	39
5.3.3	Autres csDMARDs.....	39
5.3.4	tsDMARDs.....	40
5.3.5	Agents biologiques	40
5.3.6	Effets secondaires des DMARDs	41
5.3.7	Effets secondaires des bDMARDs	42
CHAPITRE 2: SINGLE-NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) ALLELES IN IL4R, IL4 PROMOTER AND CD40, AND HLA-DR ALLELES, PROVIDE INSIGHT INTO PROGRESSION OF STRUCTURAL DAMAGE AND JOINT FUNCTION, AND LIKELIHOOD OF REMISSION IN PATIENTS WITH EARLY IMMUNE-MEDIATED INFLAMMATORY ARTHRITIS		43
6	CONTRIBUTIONS DES AUTEURS	43
6.1	<i>Auteurs</i>	43
6.2	<i>Contributions des auteurs</i>	43
7	RÉSUMÉ DE L'ARTICLE	43
8	ARTICLE TEL QUE SOUMIS	45
8.1	<i>Abstract</i>	45
8.2	<i>Introduction</i>	46
8.3	<i>Patients and Methods</i>	48
8.3.1	Patient cohort	48
8.3.2	Disease variables and predefined outcomes.....	49
8.3.3	SNP Genotyping.....	49
8.3.4	HLA-DR typing.....	50
8.3.5	Statistical analysis	51
8.4	<i>Results</i>	51
8.4.1	Characteristics of the patients of the cohort at inclusion and follow-up visits.....	51
8.4.2	Results from a pilot study using multicytokine assays.....	52
8.4.3	Distribution of SNP and HLA-DR alleles among patients in the EUPA cohort	53
8.4.4	Correlation of the (G) allele at rs1801275 (IL4R) with radiographic damage	53
8.4.5	Correlation of the (T) allele at rs2243250 (IL4) with subsequent radiographic damage, functional incapacity, and disease activity.....	54
8.4.6	Correlation of the (T) allele at rs1883832 (CD40) with functional incapacity.....	55
8.4.7	Correlation of the (T) allele at rs4810485 (CD40) with disease activity and likelihood of clinical remission.....	55
8.4.8	Correlation of the shared epitope with radiographic damage and disease activity.....	55
8.4.9	Correlation of the DERA shared epitope on radiographic damage, functional incapacity, and disease activity.....	56
8.4.10	Effects of combined biomarkers	56
8.5	<i>Discussion and conclusion</i>	58
8.6	<i>Tables and Figures</i>	64
8.7	<i>Bibliography</i>	71
CHAPITRE 3: DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE.....		76
9	DISCUSSION GÉNÉRALE	76
9.1	<i>Évaluation des méthodes</i>	76
9.1.1	Génotypage des polymorphismes	76
9.1.2	Génotypage des allèles HLA-DR.....	78
9.1.3	Analyses statistiques	79

9.2	<i>L'IL-4 et son récepteur</i>	80
9.2.1	Impact de l'allèle atypique T aux polymorphismes rs2243250 et rs2070874 dans IL4	81
9.2.2	Impact de l'allèle atypique G au polymorphisme rs1801275 dans IL4R.....	84
9.3	<i>Le co-récepteur CD40</i>	85
9.3.1	Impact de l'allèle atypique T au polymorphisme rs1883832 dans CD40.....	86
9.3.2	Impact de l'allèle atypique T au polymorphisme rs4810485 dans CD40.....	87
9.4	<i>Les allèles HLA-DR</i>	89
9.4.1	L'épitope partagé.....	89
9.4.2	L'épitope protecteur DERA	90
9.5	<i>Combinaisons de marqueurs</i>	92
10	CONCLUSION.....	93
	CHAPITRE 4 : BIBLIOGRAPHIE	96

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Critères diagnostiques de la polyarthrite rhumatoïde selon l'ACR et l'EULAR.....	4
Tableau 2: Critères du M-HAQ pour l'évaluation du niveau d'incapacité fonctionnelle	6
Tableau 3: Éléments du SDAI	23
Tableau 4: Score Sharp/van der Heijde	26
Table 5: Selected characteristics of the cohort patients at inclusion and at follow-up visits	64
Table 6: Distribution of SNPs and HLA-DR alleles in EUPA patient cohort	65
Table 7: General linear model (GLM) with repeated measures over five years	66
Table 8: Generalized estimating equation (GEE) with repeated measures over five years	67
Table 9: Effect of combined biomarkers (GEE with repeated measures over five years)	68

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Effect of polymorphism alleles in the IL4 promoter on (a) erosive damage and (b) functional incapacity; Effect of DERA status on (c) erosive damage and (d) likelihood of remission; Effect of combined IL4 and DERA status on (e) erosive damage and (f) likelihood of remission.	69
---	----

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ACPA	<i>Anti-citrullinated protein antibody</i>
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
AINS	Anti-inflammatoire non-stéroïdien
APC	<i>Antigen-presenting cell</i>
ARN	Acide ribonucléique
ASPE	<i>Allele-specific primer extension</i>
BAFF	<i>B-cell activating factor</i>
boDMARD	<i>Biological original DMARD</i>
bsDMARD	<i>Biosimilar DMARD</i>
CCP	<i>Cyclic citrullinated peptide</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CI	<i>Confidence interval</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CrP	Protéine C-réactive
csDMARD	<i>Conventional synthetic DMARD</i>
DMARD	<i>Disease-modifying antirheumatic drug</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EPA	<i>Early polyarthritis</i>
ESR	<i>Erythrocyte sedimentation rate</i>
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
EUPA	<i>Early Undifferentiated PolyArthritis</i>
FLS	<i>Fibroblast-like synovocyte</i>
GEE	<i>Generalized estimating equation</i>
GLM	<i>General linear model</i>

GWAS	<i>Genome-wide association study</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HV	Hypervariable
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IQR	<i>Interquartile range</i>
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
JSN	<i>Joint space narrowing</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
M-HAQ	<i>Modified Health-Assessment Questionnaire</i>
MMP	Métalloprotéinase matricielle
NK	<i>Natural killer</i>
OPG	Ostroprotégérine
PAD	Peptidylarginine-déiminase
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PTPN22	<i>Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid)</i>
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RA	<i>Rheumatoid arthritis</i>
RANK	<i>Receptor Activator of Nuclear Factor κ B</i>
RF	<i>Rheumatoid factor</i>
RR	<i>Relative risk</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDD	<i>Smallest detectable difference</i>
SDAI	<i>Simplified disease activity index</i>
SE	<i>Shared epitope</i>

SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SJC	<i>Swollen joint count</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SSO	<i>Sequence-specific oligonucleotides</i>
SSP	<i>Sequence-specific primer</i>
SvH	Sharp/van der Heijde
T2T	<i>Treatment to target</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TJC	<i>Tender joint count</i>
TNF	<i>Tumour necrosis factor</i>
TRAP	<i>Tartrate-resistant acid phosphatase</i>
tsDMARD	<i>Targeted synthetic dMARD</i>
TSS	<i>Total Sharp score</i>
VAS	<i>Visual analogue scale</i>

INTRODUCTION

La polyarthrite rhumatoïde, une maladie auto-immune et dégénérative touchant principalement les articulations, affecte entre 0,5 et 1% de la population dans les pays développés, incluant le Canada. La progression de la maladie variant énormément d'un patient à l'autre, et les traitements étant associés à des effets secondaires importants, l'identification de biomarqueurs pronostiques serait bénéfique afin de mieux cibler les traitements aux patients individuels.

La cohorte EUPA, basée au CIUSSS de l'Estrie, est constituée de plus de 700 patients atteints de polyarthrite inflammatoire d'installation récente. Ces patients sont diagnostiqués, suivis, et traités par un groupe de rhumatologues selon des protocoles uniformisés, et des données et échantillons biologiques sont obtenus régulièrement. Ce projet de maîtrise s'insère dans un vaste projet multi-institutionnel dont l'objectif général est l'identification de biomarqueurs permettant de prédire la progression de la polyarthrite au niveau des individus. D'autres volets du projet incluent des investigations au niveau du rôle de divers anticorps autoréactifs, de prédictors de douleur, de chimiokines, de facteurs psychologiques, d'un facteur putatif promouvant l'érosion osseuse, et de télomères raccourcis, dans la progression de la maladie.

Le volet du projet détaillé dans le présent document s'est concentré sur le rôle de marqueurs pronostiques immunogénétiques, au niveau des gènes HLA-DR, ainsi que de gènes non-HLA dont les produits participent à la réponse immunitaire.

La problématique de notre étude fût la question suivante: certains allèles particuliers des molécules HLA-DR, ainsi que certains allèles atypiques de polymorphismes nucléotidiques au niveau des gènes encodant l'interleukine-4 (IL-4), son récepteur (IL-4R), et le corécepteur CD40, ont-ils un impact sur des issues particulières de la maladie? Notre hypothèse voulait que ces allèles aient effectivement un impact sur le dommage structural, l'incapacité fonctionnelle, et l'activité de la maladie. Les allèles HLA-DR contenant les épitopes d'intérêt avaient été identifiées par des études précédentes, tant chez les patients de la cohorte EUPA que chez d'autres populations. Les polymorphismes d'intérêt ont été identifiés suite à des GWAS et des études de gènes-candidats potentiellement associés à l'évolution de la polyarthrite rhumatoïde. L'application visée de nos recherches était de fournir de l'information additionnelle aux cliniciens afin de mieux prédire la progression de la polyarthrite rhumatoïde chez des patients individuels, pour éventuellement mieux cibler les traitements administrés à ces patients.

Notre premier objectif était donc le génotypage des allèles HLA-DR (spécifiquement l'identification des patients dont les molécules HLA-DR contiennent l'épitope dit « partagé » et/ou l'épitope dit « de protection »), ainsi que de certains polymorphismes nucléotidiques dans les gènes IL4, IL4R, et CD40, chez les patients de la cohorte. Le génotypage des allèles HLA-DR a été effectué en basse et en haute résolution en utilisant des kits commerciaux, et les patients dont les allèles HLA-DR contenaient un des épitopes d'intérêt étaient identifiés. Plusieurs sous-objectifs ont été impliqués à la complétion de notre premier objectif principal, soient le développement et la validation de méthodes de génotypage à haut débit (via l'extension d'amorce spécifique de l'allèle) de cinq polymorphismes nucléotidiques d'intérêt dans les gènes IL4, IL4R, et CD40. Suite aux étapes de développement et de validation des méthodes de génotypage, ces méthodes ont été appliquées afin d'obtenir le génotype des patients de la cohorte pour tous les polymorphismes d'intérêt.

Notre second objectif était une série d'analyses rétrospectives visant à établir des corrélations entre les divers génotypes des patients de la cohorte, avec certaines issues de la maladie, soient le dommage structural, l'incapacité fonctionnelle, et la probabilité d'entrer en rémission.

Nos analyses statistiques ont permis de démontrer que l'épitope dit « de protection » DERAA, est associé à une réduction du dommage érosif ainsi qu'à une augmentation de la probabilité d'entrer en rémission clinique suite au traitement administré. Nous avons également démontré que l'allèle atypique T au niveau de deux polymorphismes dans la région promotrice d'IL4 est associé à une augmentation du dommage érosif et du déclin fonctionnel, que l'allèle atypique G au niveau d'un polymorphisme dans IL4R est associé à une augmentation du dommage radiographique, et que des allèles atypiques T au niveau de deux polymorphismes dans CD40 sont associés à une augmentation du déclin fonctionnel et de la probabilité de rémission, respectivement. Enfin, nous avons démontré que certaines combinaisons de biomarqueurs, particulièrement le génotype majeur C/C aux polymorphismes dans IL4 et l'épitope protecteur DERAA, offrent des corrélations encore plus significatives que les corrélations obtenues pour les marqueurs individuels.

Nos résultats nous permettent de conclure que le génotypage des allèles HLA-DR des patients de la cohorte EUPA, ainsi que de polymorphismes dans IL4, IL4R, et CD40, est bénéfique dans l'optique de la prédiction de la progression de la polyarthrite rhumatoïde ciblage du traitement personnalisé à des patients individuels.

CHAPITRE 1: REVUE DE LITTÉRATURE

1 La polyarthrite rhumatoïde

L'arthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire chronique d'origine auto-immunitaire, qui s'attaque principalement aux petites articulations synoviales des mains et des pieds. Les symptômes, qui débutent habituellement entre 40 et 60 ans, incluent le gonflement, la douleur, et la raideur des articulations affectées, menant à la réduction de l'amplitude de mouvement et à la difformité. Cette maladie commune est associée à du dommage radiographique menant à un handicap progressif, à des complications systémiques, à une espérance de vie réduite, et à des coûts socioéconomiques importants (Firestein, 2003).

1.1 Épidémiologie

L'arthrite rhumatoïde affecte entre 0,5% et 1,0% des adultes au sein des populations d'origines européenne et nord-américaine, avec des fréquences beaucoup plus élevées chez certaines populations, et beaucoup plus faibles chez d'autres. Par exemple, les peuples amérindiens Pima et Ojibwé ont des fréquences de 5,3% et 6,8%, respectivement, et les populations d'origine africaine ou asiatique ont des fréquences observées de 0,0 à 0,3% (Silman *et al.*, 2002). La prévalence chez les femmes est environ le double de chez les hommes, et l'arthrite rhumatoïde est plus commune dans les pays développés (WHO, 2014).

1.2 Diagnostic

Une étude publiée en 2010 par plusieurs membres de l'American College of Rheumatology (ACR) et de l'European League Against Arthritis (EULAR) a défini des critères de diagnostic de l'arthrite rhumatoïde. Ces critères sont conçus pour évaluer la condition de patients présentant de la synovite (inflammation de la membrane synoviale) dans au moins une articulation, en l'absence d'un autre diagnostic qui permettrait de mieux expliquer la synovite. Ce système attribue une note dans quatre catégories, soit les articulations affectées, la présence d'anormalités sérologiques (anticorps autoréactifs), la réponse de phase aiguë, et la durée des

symptômes. Une note totale supérieure ou égale à 6/10 est nécessaire pour que le diagnostic d'arthrite rhumatoïde soit appliqué à un patient (voir Tableau 1) (Funovits *et al.*, 2010).

Tableau 1: Critères diagnostiques de la polyarthrite rhumatoïde selon l'ACR et l'EULAR

Critères et catégories	Note
A. Articulations douloureuses ou gonflées	
Au moins une grosse articulation (épaule, coude, hanche, genou, cheville)	0
2-10 grosses articulations	1
1-3 petites articulations (des mains, incluant le poignet, et des pieds), avec ou sans grosses articulations affectées	2
4-10 petites articulations, avec ou sans grosses articulations affectées	3
plus de 10 articulations, dont au moins une petite	5
B. Sérologie	
RF négatif et ACPA négatifs	0
RF positif-faible ou ACPA positifs-faibles	2
RF positif-élevé ou ACPA positifs-élevés	3
C. Réactifs de phase aigüe	
CRP normal et ESR normal	0
CRP anormal ou ESR anormal	1
D. Durée des symptômes	
Moins de 6 semaines	0
Au moins 6 semaines	1

Adapté de (Funovits *et al.*, 2010)

1.3 Incapacité fonctionnelle

L'incapacité fonctionnelle représente une issue importante de l'arthrite rhumatoïde. Le handicap entraîné par la perte de fonction des articulations ankylosées, mène fréquemment à l'invalidité au travail (voir Conséquences socioéconomiques), ainsi qu'à une réduction importante de la qualité de vie des patients.

L'incapacité fonctionnelle est mesurée par le M-HAQ (*modified health assessment questionnaire*), un questionnaire portant sur le niveau de difficulté éprouvé par le patient lors de l'exécution de ses activités quotidiennes. Une note entre 0 et 3 est attribuée, par le patient, pour huit activités quotidiennes (voir Tableau 2, p.6). La somme des notes attribuées pour les huit catégories est multipliée par 0,125, pour une note finale pouvant atteindre au maximum 3,0/3,0. Un score M-HAQ supérieur ou égal à 1,0/3,0 indique que le niveau d'incapacité fonctionnelle du patient est significatif.

Des questions additionnelles portent sur l'utilisation de dispositifs facilitant certaines tâches, ainsi que sur les activités pour lesquelles le patient requiert l'aide d'une autre personne (Bruce *et al.*, 2003, Hochberg *et al.*, 1992, Maska *et al.*, 2011).

Des associations significatives existent entre l'incapacité fonctionnelle et d'autres mesures de l'issue de la maladie, soient le dommage articulaire et l'activité de la maladie, qui seront discutées dans leurs sections respectives.

L'incapacité fonctionnelle est l'une des mesures-piliers de la progression de l'arthrite rhumatoïde, et l'identification de marqueurs indépendants permettant de prédire le degré d'invalidité associé à la maladie chez les individus serait bénéfique afin de mieux cibler les traitements, et administrer les mesures adéquates chez les patients qui sont plus à risque de développer une maladie incapacitante.

Tableau 2: Critères du M-HAQ pour l'évaluation du niveau d'incapacité fonctionnelle

Critères (Activités quotidiennes)	Note ¹
A. s'habiller et faire sa toilette	
capable d'effectuer l'activité sans difficulté	0
capable d'effectuer l'activité avec un peu de difficulté	1
capable d'effectuer l'activité avec beaucoup de difficulté	2
incapable d'effectuer l'activité	3
B. se lever (du lit ou d'un fauteuil)	
C. manger	
D. marcher et monter des escaliers	
E. maintenir son hygiène corporelle (se laver et aller à la salle de bains)	
F. atteindre des objets hors de la portée (ex: se baisser pour ramasser un objet)	
G. manipuler certains objets (ex: ouvrir la portière d'une voiture ou utiliser un robinet)	
H. effectuer des activités spécifiques (ex: faire le ménage)	

adapté de (Maska *et al.*, 2011)

¹ Les notes possibles, de 0/3 à 3/3, sont les mêmes pour les huit critères (activités quotidiennes).

1.4 Conséquences socioéconomiques

Les personnes affectées par l'arthrite rhumatoïde voient leurs capacités fonctionnelles se réduire drastiquement au cours de la maladie. Ceci mène à une augmentation de la probabilité d'invalidité, à une réduction des revenus, à une limitation des activités, et à une augmentation des coûts médicaux et de subsistance. Les coûts socioéconomiques de l'arthrite rhumatoïde ne sont pas limités aux personnes affectées, mais se répandent également au niveau de la famille, des employeurs, et même des services gouvernementaux, et donc du reste des citoyens (Markenson, 1991, Pugner *et al.*, 2000).

L'une des issues possibles importantes, et conséquences économiques majeures, de l'arthrite rhumatoïde, est l'invalidité, c'est-à-dire l'incapacité à continuer de travailler, à travailler au même emploi, ou à garder le même horaire. La probabilité et le niveau d'invalidité varie d'un patient à l'autre, selon plusieurs facteurs liés à l'emploi (nature de l'emploi, niveau d'activité physique requis, degré d'autonomie au niveau du rythme de travail), au patient (âge à l'apparition des symptômes, aspects sociaux (état civil et niveau d'éducation formelle)), et à la maladie (durée des symptômes, niveau d'incapacité fonctionnelle) (Barrett *et al.*, 2000).

L'arthrite rhumatoïde a un impact majeur sur la qualité de vie, particulièrement en raison du besoin accru de repos alité rapporté par un grand nombre de patients. De plus, l'arthrite rhumatoïde a un impact important sur la mobilité: l'incapacité à effectuer certaines tâches manuelles peut empêcher la conduite automobile, et la douleur et la perte de fonction articulaires peuvent empêcher le déplacement à la marche. Le logement est également affecté: l'invalidité peut nécessiter un logement à loyer réduit ou l'habitation dans une résidence avec services de soutien, et les logements nécessitent souvent des modifications afin d'augmenter l'accessibilité du patient, de même que le support social (Albers *et al.*, 1999, Burton *et al.*, 2006).

Les coûts monétaires encourus par les patients eux-mêmes incluent les coûts médicaux, les pertes de revenus associées à l'incapacité de travail, et les coûts associés au handicap, incluant le salaire du personnel soignant. Ces coûts affectent également les membres de la famille des personnes affectées. Les coûts affectant les employeurs incluent les coûts directs des soins de santé payés pour les personnes affectées et les bénéficiaires, les coûts associés à la perte de travail (prestations d'invalidité, absentéisme, productivité réduite, adaptations à l'environnement de travail). Enfin, l'arthrite rhumatoïde représente des coûts économiques importants pour le gouvernement, qui couvre les surcoûts médicaux des programmes

d'assurance-santé; de plus, les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde quittant le marché du travail plus tôt que prévu doivent souvent recevoir des prestations d'invalidité ainsi que de l'aide au revenu provenant d'autres programmes gouvernementaux, et ont une contribution grandement réduite aux impôts (Birnbaum *et al.*, 2010).

2 Pathogenèse I : Phase pré-articulaire

L'arthrite rhumatoïde est caractérisée par l'inflammation de la membrane synoviale menant à l'hyperplasie, la production d'anticorps autoréactifs, la destruction des structures articulaires locales, ainsi que des manifestations systémiques.

La susceptibilité à l'arthrite rhumatoïde est fortement associée à certains facteurs génétiques et environnementaux, discutés ci-bas. Il est proposé que la susceptibilité elle-même est codée génétiquement, mais que l'apparition des symptômes ainsi que du dommage structural qui leur est associé, serait plutôt déclenchée par des facteurs environnementaux, épigénétiques ou post-traductionnels (Kochi *et al.*, 2014, Silman *et al.*, 1993).

2.1 Facteurs génétiques

Les facteurs génétiques associés à la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde incluent les gènes HLA, ainsi que certains gènes non-HLA, incluant IL4, IL4R, CD40, PTPN22, et autres.

2.1.1 HLA

Les antigènes leucocytaires humains (HLA, human leucocyte antigen) sont la version du complexe majeur d'histocompatibilité chez l'humain. Les molécules HLA sont encodées par un locus génique de grande taille situé sur le chromosome 6, lui-même divisé en trois loci, dits de classe I, II et III (Beck *et al.*, 2000). Les gènes du CMH de classe I et II encodent notamment des protéines membranaires dont la fonction est de présenter des antigènes peptidiques aux lymphocytes T, et ainsi de déclencher une réponse adaptative au besoin. Il est à noter que certains gènes encodant des protéines dont la fonction est la présentation des antigènes sont encodés dans d'autres loci, comme CD1, et que d'autres protéines, dont la fonction est autre que la présentation antigénique, sont encodés dans le CMH (Choo, 2007).

Les gènes du CMH de classe III encodent entre autres les protéines du système du complément, un groupe de protéines formant une cascade de signalisation qui mène éventuellement à la destruction de pathogènes, soit directement via la formation du complexe d'attaque membranaire, soit en amplifiant dramatiquement la réponse inflammatoire au site de l'infection (Beck *et al.*, 2000).

Les molécules du CMH de classe I et II diffèrent par leur structure, leur fonction, et leur expression. Les molécules de classe I sont formées d'une chaîne α transmembranaire, composée de 3 domaines, et liée de manière non-covalente à une unité β 2-microglobuline. La fonction des molécules du CMH de classe I est de présenter des peptides aux lymphocytes T CD8 cytotoxiques, et ces molécules sont exprimées sur toutes les cellules nucléées (Bjorkman *et al.*, 1987a, Bjorkman *et al.*, 1990, Klein *et al.*, 2000). Par contre, les molécules du CMH de classe II sont formées de deux chaînes transmembranaires, α et β , associées de manière non-covalente (hétérodimère). La fonction des molécules de classe II est de présenter des peptides aux lymphocytes T auxiliaires CD4. Ces molécules sont exprimées principalement sur les cellules dendritiques, les macrophages, et les lymphocytes B (JH Brown *et al.*, 1993, Engelhard, 1994).

De par leurs particularités structurales, les molécules HLA permettent également à l'organisme de différencier les cellules appartenant à ce même organisme (le soi) des cellules appartenant à un organisme étranger (le non-soi): ainsi une réponse immunitaire n'est pas montée contre des peptides du soi (tolérance). Un mal fonctionnement de ce système peut entraîner une maladie autoimmunitaire (Bjorkman *et al.*, 1987b, Stern *et al.*, 1994).

Les gènes encodant les protéines du CMH sont hautement polymorphes, et des variations peuvent entraîner des différences au niveau du site de liaison des peptides, soit au niveau de la capacité de la molécule du CMH à lier ce peptide, ou au niveau de la reconnaissance par les lymphocytes T (Falk *et al.*, 1991).

Le locus de classe II encode trois protéines majeures, DP, DQ, et DR, qui sont des récepteurs transmembranaires participant à la présentation antigénique. Deux protéines mineures, DM et DO, sont également encodées par des gènes du locus de classe II ; ces protéines participent à la présentation antigénique et au chargement des peptides antigéniques sur les molécules HLA majeures.

Les protéines HLA-DR sont des hétérodimères formés d'une chaîne α , encodée par le locus HLA-DRA, et d'une chaîne β , encodée par un de quatre loci HLA-DRB (HLA-DRB1, -DRB3,

DRB4, DRB5). Le locus DRA est relativement invariable, tandis que le locus DRB contient toute la variabilité qui mène à la spécificité de liaison des peptides antigéniques de la molécule. La chaîne β est composée de deux domaines extracellulaires, encodés par les exons 2 et 3 du gène HLA-DRB1, dont le domaine N-terminal, site de la majorité de la diversité antigénique de la molécule HLA-DR. Le domaine N-terminal de la chaîne β est composé de régions hypervariables, dites HV1, HV2, et HV3, alternant avec des régions invariantes. La troisième région hypervariable, dite HV3, est le site principal d'intérêt pour la recherche en matière de polyarthrite rhumatoïde (Gregersen *et al.*, 1987).

2.1.2 Épitope partagé (*shared epitope*)

Une séquence hautement conservée de cinq acides aminés (QKRAA/QRRAA/RRRAA), aux positions 70 à 74 de la chaîne DR β 1 dans la troisième région hypervariable, est présente dans plusieurs allèles HLA et est associée à la susceptibilité à l'arthrite rhumatoïde.

Le rôle exact de cette séquence, dite l'épitope partagé ou *shared epitope* (SE), n'a pas été établi, mais, compte tenu de la fonction de la chaîne DR β 1, est probablement relié à un aspect faisant la promotion des réponses immunitaires adaptatives (De Almeida *et al.*, 2011, De Almeida *et al.*, 2010). Les hypothèses quant à cette fonction incluent la présentation de peptides arthritogéniques du soi (Wucherpfennig *et al.*, 1995), la sélection du répertoire des lymphocytes T (Bhayani *et al.*, 1991), le mimétisme moléculaire par des antigènes étrangers (La Cava *et al.*, 1997), et une sénescence accrue des lymphocytes T (Goronzy *et al.*, 2005).

La présence de l'épitope partagé est aussi associée à la sévérité de la maladie: l'étude de Moreno *et al.* (1996) propose que les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde et possédant au moins un allèle HLA contenant l'épitope partagé éprouvent une maladie plus érosive que les patients SE-négatifs (Gonzalez-Gay *et al.*, 2002, Moreno *et al.*, 1996). Ainsi, les patients possédant au moins un allèle contenant le SE sont plus à risque de développer une maladie érosive, et bénéficieraient d'un traitement plus agressif afin de réduire au minimum le dommage structural.

L'étude de Raychaudhuri *et al.* (2012) propose que les acides aminés en position 71 et 74, spécifiquement, soient impliqués dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde séropositive (Raychaudhuri *et al.*, 2012)

2.1.3 Épitope de protection DERA

La présence d'un résidu aspartique à la position 70 de la chaîne HLA-DR β 1, définie en tant qu'épitope de protection (DERAA), est associée à une maladie moins sévère (Mattey *et al.*, 2001, van der Helm-van Mil *et al.*, 2005a).

L'étude de Carrier *et al.* (2009), dont la cohorte utilisée est la même que pour le présent projet, démontre une association très significative entre la présence de l'épitope DERA et une maladie non-érosive à 30 mois, proposant un rôle protecteur pour DERA (Carrier *et al.*, 2009). Cet effet protecteur semble être très fort, et supprime l'effet érosif de plusieurs autres marqueurs proposés précédemment.

Ces résultats suggèrent que les patients possédant au moins une copie de l'épitope de protection, DERA, bénéficieraient d'un traitement moins agressif, en raison du caractère faiblement érosif de l'arthrite rhumatoïde chez cette sous-population, afin d'épargner à ces patients les effets secondaires très sérieux des traitements modifiant la maladie.

En plus des associations connues avec les allèles HLA, il existe des associations génétiques putatives entre l'arthrite rhumatoïde et d'autres gènes d'intérêt, généralement liés à la régulation immunitaire.

2.1.4 IL-4

L'interleukine-4 (IL-4) est une cytokine polyfonctionnelle produite principalement par les lymphocytes T CD4+, et également par plusieurs autres types cellulaires, incluant les cellules NK, les cellules dendritiques, et les macrophages. Les lymphocytes auxiliaires de la sous-population Th2 produisent l'IL-4 suite à leur activation par l'IL-4 elle-même, en boucle de rétroaction positive. La cellule productrice d'IL-4 d'origine n'est toujours pas identifiée; il a été proposé que cette cytokine proviendrait initialement des basophiles (Sokol *et al.*, 2008). Le gène IL4 se trouve sur le chromosome 5 et comprend 8693 pb. L'IL-4 est un ligand pour le récepteur de l'IL-4 (IL-4R), qui est également un récepteur pour l'IL-13 (IL-13), cytokine dont les fonctions sont très semblables à celles de l'IL-4 (Coffman, 2013).

L'IL-4 participe à la différenciation des lymphocytes T, en favorisant la différenciation des lymphocytes Th0 vers le phénotype Th2, qui joue un rôle important dans la réponse immunitaire humorale en stimulant les lymphocytes B (Paul *et al.*, 2010). Les effets de la stimulation des

lymphocytes B par les lymphocytes Th2 incluent la prolifération, la commutation isotypique vers la classe des immunoglobulines E (IgE), et une production accrue d'anticorps neutralisants (Crotty, 2015). Une fois activés par l'IL-4, les lymphocytes Th2 produisent d'autre IL-4 en boucle de rétroaction positive (Lundgren *et al.*, 1989).

Le rôle exact de l'IL-4 dans la pathogenèse ou la progression de la polyarthrite rhumatoïde n'a pas encore été identifié. L'effet anti-inflammatoire est probablement en cause, et le déséquilibre entre les populations de Th1 et Th2 chez les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde a été documenté (Schulze-Koops *et al.*, 2001). Certaines études proposent que le niveau d'IL-4 présent dans le fluide synovial des personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde est élevé aux étapes hâtives, mais réduit ou absent aux étapes tardives de la maladie (Miossec *et al.*, 1990, Raza *et al.*, 2005). De plus, l'IL-4 régule à la baisse l'expression de l'IL-17 par les lymphocytes Th17 (Park *et al.*, 2005, Tesmer *et al.*, 2008).

Les polymorphismes rs2243250 et rs2070874, dans la 5'-UTR de l'IL-4, et rs1801275, dans la portion codante du récepteur de l'IL-4 (IL4R Q576R), ont été sélectionnés en tant que polymorphismes d'intérêt pour cette étude en raison de leur association à la polyarthrite rhumatoïde, documentée par diverses études (Balsa *et al.*, 2010, Cantagrel *et al.*, 1999, Krabben *et al.*, 2013, Pawlik *et al.*, 2005). Par contre, les conclusions tirées de ces études ne sont pas consistantes, et un lien direct n'a pas été établi entre le génotype et un quelconque aspect de la maladie (Marinou *et al.*, 2008, Qiu *et al.*, 2015). Akkad *et al.* proposent que des allèles atypiques aux polymorphismes dans la région promotrice d'IL4 sont associés à une expression plus élevée de cette cytokine (Akkad *et al.*, 2007).

Le SNP rs2243250 est associé à une augmentation dans la survie des patients atteints de plusieurs types de cancers (Cerhan *et al.*, 2007, Habermann *et al.*, 2008, Schoof *et al.*, 2009), mais également à une augmentation de la susceptibilité à certains cancers, notamment le lymphome non-hodgkinien (Lan *et al.*, 2006, Tindall *et al.*, 2010, Zhenzhen *et al.*, 2013). Le SNP rs2070874 est souvent associé aux mêmes cancers que rs2243250, mais également à une susceptibilité accrue à la maladie de Crohn (Durães *et al.*, 2012), de même qu'à certaines infections parasitaires (Fumagalli *et al.*, 2009). Le polymorphisme rs1801275 est associé à un risque réduit de diabète de type I (Erlich *et al.*, 2009) et de lymphome de Hodgkin (D'Amelio *et al.*, 2012), et un risque plus élevé d'asthme (Loza *et al.*, 2007).

2.1.5 CD40

CD40 est un corécepteur, membre de la superfamille des récepteurs du TNF, retrouvé sur les cellules présentatrices d'antigène et requis pour leur activation. Cette protéine transmembranaire est encodée par le gène du même nom, situé sur le chromosome 20 (Banchereau *et al.*, 1994).

L'interaction de CD40 avec son ligand, CD40L (ou CD154), retrouvé sur les lymphocytes T auxiliaires, active les APC et induit plusieurs actions en aval. Chez les lymphocytes B, l'interaction entre CD40 (retrouvé sur les lymphocytes B) et CD40L (retrouvé sur les lymphocytes T), stimule leur prolifération et mène à la formation de centres germinaux, à leur différenciation en plasmocytes, à la commutation isotypique, et au développement d'une réponse-mémoire humorale (van Kooten *et al.*, 1997). L'interaction CD40-CD40L sur les monocytes et les cellules dendritiques augmente la production de cytokines (Alderson *et al.*, 1993, Caux *et al.*, 1994). Le rôle exact de CD40 dans l'arthrite rhumatoïde n'a pas encore été identifié, mais la maladie étant caractérisée par une réponse humorale spécifique à des protéines du soi, il est probable que l'interaction de CD40 avec son ligand, nécessaire pour ce processus, soit impliquée (MacDonald *et al.*, 1997).

Plusieurs polymorphismes dans CD40 ont été associés à la polyarthrite rhumatoïde par des GWAS (*genome-wide association studies*), notamment les deux polymorphismes d'intérêt pour cette étude, rs4810485 et rs1883832 (Raychaudhuri *et al.*, 2008). Ces deux polymorphismes sont situés dans des régions non-codantes, soit le premier intron et la région 5' non-traduite, respectivement. Les SNPs situés dans des régions non-codantes n'affectent pas la séquence en acides aminés, mais peuvent avoir un effet sur l'expression. rs1883832, par exemple, est situé dans une séquence de Kozak, et perturbe l'initiation de la traduction de CD40 en modifiant le site d'initiation (Jacobson *et al.*, 2007). rs4810485 est en déséquilibre de liaison important avec rs1883832, et une association avec la progression du dommage radiologique a été proposée (Van Der Linden *et al.*, 2009).

Le SNP rs4810485 est également associé à une augmentation de la susceptibilité au lupus érythémateux disséminé (Chen *et al.*, 2015, Piotrowski *et al.*, 2013, Vazgiourakis *et al.*, 2011). Le SNP rs1883832 est associé à une augmentation de la susceptibilité à la maladie de Graves (Tomer *et al.*, 2002), ainsi qu'à la maladie de Crohn et à la sclérose en plaques (Blanco-Kelly *et al.*, 2010).

2.1.6 PTPN22

Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid), ou PTPN22, est un régulateur négatif de l'activité des lymphocytes T. La protéine PTPN22, ou LYP, est encodée par le gène PTPN22, qui est situé sur le chromosome 1. PTPN22 est une protéine intracellulaire, principalement exprimée dans le cytoplasme des cellules composant les tissus lymphoïdes (Shai Cohen *et al.*, 1999).

PTPN22 forme un complexe activateur avec le domaine SH3 de Csk (C-src tyrosine kinase), dont la fonction est de phosphoryler des résidus tyrosine dans la région C-terminale des kinases Src (Cloutier *et al.*, 1999). Les kinases Src phosphorylent les ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) du récepteur des lymphocytes T (TCR), qui deviennent un lieu de liaison pour les tyrosines-kinases de la famille Syk; les Src phosphorylent également les Syk elles-mêmes, qui poursuivent ensuite la cascade d'activation du TCR (Palacios *et al.*, 2004). La conformation active des kinases Src est l'état déphosphorylé, ainsi leur phosphorylation par PTPN22-Csk modifie leur conformation vers l'état inactive (Salmond *et al.*, 2009).

Des mutations dans PTPN22 sont associées au risque de maladie auto-immune: le polymorphisme rs2476601 a été associé avec un risque accru de diabète de type 1, de maladie d'Addison, de lupus érythémateux disséminé, de vitiligo, de maladie de Graves-Basedow, et de polyarthrite rhumatoïde (Siminovitch, 2004). Cette mutation, qui mène à la substitution d'un résidu arginine à un résidu tryptophane à la position 620, est associée à un gain de fonction immunitaire (Vang *et al.*, 2005). Le rôle proposé de la mutation R620W est la perturbation de la liaison de PTPN22 à Csk, en raison du repliement altéré causé par la substitution d'un résidu chargé positivement pour un résidu hydrophobe (Bottini *et al.*, 2004, Burn *et al.*, 2011). Ainsi, l'activité réduite de PTPN22 mène à une activation plus élevée des lymphocytes T (gain de fonction), causant une réponse immunitaire plus active, et pouvant mener à des maladies auto-immunitaires. La mutation R620W n'affecte pas l'espérance de vie, et pourrait être conservée dans la population car la réponse immunitaire accrue contre les agents infectieux qu'elle confère aux personnes porteuses pourrait être un avantage lorsqu'elle ne mène pas à une réponse auto-immune (Napolioni *et al.*, 2011).

L'étude de Begovich *et al.* (2004) propose une association entre la mutation R620W et la polyarthrite rhumatoïde, via les mécanismes expliqués ci-haut: l'activité accrue du TCR provoquerait une réponse auto-immunitaire plus intense envers l'antigène du soi causant la maladie (Begovich *et al.*, 2004).

2.1.7 Autres gènes

Plusieurs gènes autres que ceux discutés ci-haut, et plus particulièrement des polymorphismes au niveau de ceux-ci, ont été associés à la polyarthrite rhumatoïde, soit pour leur valeur diagnostique, ou pour leur valeur pronostique (Rego-Perez *et al.*, 2008).

Des polymorphismes au niveau du gène TNF, qui encode la protéine du même nom dont le rôle dans la pathogenèse et son intérêt pour les voies de traitement sont discutés dans d'autres sections, sont associés à l'arthrite rhumatoïde. Ces polymorphismes se retrouvent principalement dans la région promotrice du gène. rs361525 (-238 G>A), par exemple, est associé à une réduction du dommage érosif chez les personnes atteintes (Brinkman *et al.*, 1997). Les polymorphismes rs1800629 (-308 G>A), rs1799724 (-857 C>T), rs1800630 (-863 C>A), et rs1799964 (-1031 T>C), sont associés à une production plus élevée de TNF, et ainsi à une augmentation de la susceptibilité à la polyarthrite rhumatoïde (Kuo *et al.*, 2005, Newton *et al.*, 2003, Udalova *et al.*, 2000, Wilson *et al.*, 1993).

L'IL-1 est une cytokine dont le rôle dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde est relié au dommage du cartilage: elle induit la libération d'agrécane, enzyme participant à la dégradation des protéoglycans, et réprime la synthèse matricielle par les chondrocytes (Dinarello, 2011, van den Berg, 2000). Des polymorphismes dans IL1A, rs1800587 (-889 C>T) et rs17561 (+4845 G>T), sont associés à une production augmentée d'IL-1 α et ainsi à une susceptibilité accrue à la maladie (Johnsen *et al.*, 2008). Un SNP dans IL1B, rs1143634 (+3954 C>T) est associé à une production augmentée d'IL-1 β et à du dommage structural sévère (Buchs *et al.*, 2001).

L'IL-17 est une cytokine inflammatoire produite par les lymphocytes Th17, suite à leur induction par IL-23 (Iwakura *et al.*, 2006). L'IL-17 agit sur plusieurs types cellulaires, dont les fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales, les kératinocytes et les macrophages. L'IL-17 joue un rôle important lors de plusieurs réactions immunes, notamment en augmentant la production de plusieurs cytokines (telles que: IL-6, G-CSF, GM-CSF, IL-1 β , TGF- β , et TNF- α), de chimiokines (telles que: IL-8, GRO- α , et MCP-1), et de prostaglandines. De plus, l'IL-17 contribue au recrutement au site d'inflammation de monocytes et de neutrophiles (Onishi *et al.*, 2010). Le rôle principal de l'IL-17 dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde se trouve à l'étape de la résorption osseuse (voir section 5.2.2), où cette cytokine stimule l'ostéoclastogénèse de façon importante (Kotake *et al.*, 1999). De plus, l'IL-17 participe à la destruction de la matrice synoviale des patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Chabaud *et al.*, 2000). L'IL-17 est

impliquée dans la pathogénèse de plusieurs autres désordres auto-immuns, dont le psoriasis (Arican *et al.*, 2005).

L'IL-6 est une cytokine inflammatoire participant notamment à l'inflammation et au métabolisme osseux; des niveaux élevés d'IL-6 sont associés à du dommage structural plus sévère et à une activité soutenue de la maladie (Uson *et al.*, 1997). Le polymorphisme rs1800795 (-174 G>C), qui est en déséquilibre de liaison total avec un autre polymorphisme du promoteur, à la position -622, est associé à une production réduite d'IL-6, et de ce fait à un dommage structural moins important (Pascual *et al.*, 2000).

L'IL-10 est un régulateur négatif du TNF (Chernoff *et al.*, 1995). Les polymorphismes dans le promoteur d'IL10 rs1800896 (-1082 G>A) et rs1800893 (-592 A>C) sont associés à une production réduite d'IL-10 et à une augmentation de la susceptibilité à la polyarthrite rhumatoïde (Padyukov *et al.*, 2004, Turner *et al.*, 1997).

La voie RANK/RANKL/OPG et sa participation à la résorption osseuse sont discutées dans une autre section. Un polymorphisme dans RANK, rs35211496, est proposé comme protecteur contre le dommage structural, tandis qu'un polymorphisme dans RANKL, rs2277438, est associé à une augmentation de la susceptibilité à l'arthrite rhumatoïde (Assmann *et al.*, 2010, Takayanagi *et al.*, 2000).

2.2 Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux associés à la pathogénèse de la polyarthrite rhumatoïde incluent le tabagisme, ainsi que certains agents infectieux.

2.2.1 Tabagisme

L'effet exact du tabagisme sur l'arthrite rhumatoïde n'a pas encore été identifié. La revue de Chang *et al.* (2014) présente une rétrospective des différents mécanismes proposés (Chang *et al.*, 2014). De façon générale, le tabagisme semble avoir un effet important sur l'état inflammatoire des patients, soit par action directe (Sopori, 2002), en causant un stress oxydatif (Pryor *et al.*, 1993), ou en favorisant la production d'anticorps autoréactifs contre les protéines du soi citrullinées (Klareskog *et al.*, 2006). La fumée de cigarette induit chez les fibroblastes

synoviaux la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires, incluant l'IL-1 et le TNF- α , dont le rôle dans la pathogenèse de l'arthrite rhumatoïde a été documenté (Shizu *et al.*, 2007).

Les études de De Rooy *et al.* (2014) et Saevarsdottir *et al.* (2015) présentent des résultats opposés concernant l'effet du tabagisme sur le dommage articulaire: Saevarsdottir *et al.* proposent que le tabagisme est un facteur de risque indépendant important pour une progression radiographique plus agressive, tandis que De Rooy *et al.* proposent que l'effet du tabagisme sur la progression radiographique est plutôt médié par les ACPA (de Rooy *et al.*, 2014, Saevarsdottir *et al.*, 2015). Le tabagisme est associé à une plus grande incidence et une sévérité plus importante de manifestations extra-articulaires de l'arthrite rhumatoïde (Carl Turesson *et al.*, 2004a). Enfin, la consommation de tabac affecte le traitement de l'arthrite rhumatoïde par DMARDs: Westhoff *et al.* (2008) proposent que les fumeurs atteints d'arthrite rhumatoïde requièrent un traitement plus agressif par des agents antagonistes du TNF- α pour atteindre la rémission clinique (Westhoff *et al.*, 2008).

2.2.2 Agents infectieux

Il existe une association entre l'arthrite rhumatoïde et plusieurs agents infectieux, dont le mécanisme exact n'est pas encore établi. Certains agents infectieux, comme le virus d'Epstein-Barr, et leurs produits, comme les protéines de choc thermique, pourraient avoir un effet sur le développement de la maladie via mimétisme moléculaire (Albert *et al.*, 1999)

Il a également été proposé que la formation de complexes immuns pendant plusieurs types d'infections virales pourrait engendrer la production du facteur rhumatoïde, un anticorps contre le fragment constant des immunoglobulines IgG (McInnes *et al.*, 2011).

L'étude de Wegner *et al.* (2010) propose une association entre la gingivite causée par *P. gingivalis*, et l'arthrite rhumatoïde: l'expression par l'agent pathogène de l'enzyme PADI4 (peptidylarginine-déiminase de type 4) est associée à la citrullination de protéines, qui pourrait être un agent déclencheur de la maladie (Wegner *et al.*, 2010).

Enfin, des différences au niveau de la flore intestinale des patients atteints d'arthrite rhumatoïde, comparativement à la population générale, suggèrent que l'activation des Th17 dans la muqueuse intestinale pourrait mener à une réponse autoimmune comme celle qui est observée dans l'arthrite rhumatoïde (Scher *et al.*, 2011).

3 Pathogenèse II : Production d'anticorps autoréactifs

La transition entre la phase pré-articulaire de la polyarthrite rhumatoïde et sa phase clinique est caractérisée par une perte de la tolérance aux protéines du soi et par la production d'anticorps autoréactifs. La perte de la tolérance au soi peut avoir lieu plusieurs années avant le début des symptômes, et dans un tout autre microenvironnement que la capsule synoviale: il est proposé que le site initial serait le système respiratoire, où l'autoimmunité serait initiée par des facteurs environnementaux tels que le tabagisme, chez les personnes possédant des allèles de susceptibilité à la maladie. Les anticorps autoréactifs comprennent notamment le facteur rhumatoïde, les anticorps contre les protéines citrullinées (ACPA), les anticorps contre les peptides cycliques citrullinés (anti-CCP), et les anticorps contre la vimentine citrullinée (anti-Sa) (van Boekel *et al.*, 2002).

3.1 Facteur rhumatoïde

Le facteur rhumatoïde est un anticorps autoréactif ayant pour cible la région constante (Fc) des immunoglobulines G (IgG) (Jefferis *et al.*, 1989, Mannik *et al.*, 1988). Cet autoanticorps est retrouvé chez environ 75% des personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde, mais n'est pas spécifique à cette maladie. Effectivement, le facteur rhumatoïde peut être observé chez des personnes atteintes de maladies autoimmunes autres que l'arthrite rhumatoïde, chez des personnes infectées par certains pathogènes, et enfin chez des personnes en santé, plus particulièrement des personnes âgées (van Boekel *et al.*, 2002). Malgré ce manque de spécificité, la présence de facteur rhumatoïde est fréquemment utilisée en tant que marqueur diagnostique de l'arthrite rhumatoïde, et la maladie est souvent qualifiée en tant que séropositive ou séronégative selon la présence de cet anticorps chez le patient.

Le facteur rhumatoïde est retrouvé le plus souvent sous la forme d'IgM (Corper *et al.*, 1997, Sutton *et al.*, 2000), mais peut également être retrouvé sous tous les autres isotopes d'immunoglobulines (Banchuin *et al.*, 1992, Hermann *et al.*, 1986, Herrmann *et al.*, 1991).

Le rôle précis du facteur rhumatoïde dans la pathogenèse de l'arthrite rhumatoïde n'est pas décrit précisément, mais il est proposé que la formation de complexes immuns composés du facteur rhumatoïde et des IgG cause de l'inflammation en activant le système du complément (Carson *et al.*, 1981). L'élément déclencheur précis de la production de facteur rhumatoïde par les lymphocytes B et plasmocytes n'a pas été identifié, mais il est probable que la liaison et la

présentation de complexes immuns composés de facteur rhumatoïde et d'IgG entraîne davantage de production de cet anticorps (Carson *et al.*, 1991, Roosnek *et al.*, 1991). Le facteur rhumatoïde peut être exprimé pendant certaines infections virales et bactériennes, notamment des infections par le virus d'Epstein-Barr (Vaughan, 1979); il est proposé qu'il s'agisse d'une réaction croisée avec des antigènes viraux.

La présence et le titre de facteur rhumatoïde ont une certaine valeur prédictive pour la progression de la maladie, le dommage structural et l'activité de la maladie: un titre élevé de facteur rhumatoïde est associé à du dommage structural plus rapide et sévère ainsi qu'à une activité soutenue de la maladie (Sutton *et al.*, 2000).

3.2 ACPA et anti-CCP

Les ACPA sont des anticorps autoréactifs ayant pour cible des protéines dont certains résidus arginine ont été convertis en citrulline: la citrulline ne faisant pas partie des acides aminés standards, cette conversion ne peut avoir lieu que sous forme de modification post-traductionnelle (Rogers, 1962). Les ACPA sont présents chez 80% des personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde, et ont une très forte spécificité (98%) pour cette maladie (Van Venrooij *et al.*, 2002).

La citrullination modifie un résidu chargé positivement en un résidu polaire mais neutre, et est catalysée par les enzymes de la famille PAD (peptidylarginine déiminases) (Vossenaar *et al.*, 2003). Le groupe -NH₂ du résidu arginine (chargé positivement) est hydrolysé en un groupement oxygène neutre, qui est l'épitope reconnu par les ACPA (Van Venrooij *et al.*, 2002). Ce processus altère la conformation des protéines modifiées, et une réponse immunitaire est générée contre ce néoépitope (GA Schellekens *et al.*, 1998). La capsule synoviale a été identifiée comme étant le site de la citrullination chez les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde (Kinloch *et al.*, 2008). La réponse est ensuite perpétuée localement en réponse immunitaire chronique (Kinloch *et al.*, 2006). Dans un modèle murin, l'expression des PAD est dépendante de l'œstrogène, ce qui est en accord avec la fréquence de l'arthrite rhumatoïde, qui est beaucoup plus élevée chez les femmes que chez les hommes (Takahara *et al.*, 1992).

Les ACPA peuvent être détectés à des étapes très précoces de la maladie, ce qui en fait un bon marqueur diagnostique; de plus, ces anticorps sont associés à du dommage structural plus important (Meyer *et al.*, 2003). Les traitements DMARDs existants ont potentiellement un effet

sur la citrullination des protéines dans le synovium; des inhibiteurs de déimination pourraient contribuer au traitement de l'arthrite rhumatoïde à l'avenir (Kinloch *et al.*, 2006).

Les anticorps contre les peptides citrullinés cycliques (anti-CCP) sont un sous-groupe d'ACPA (Ioan-Facsinay *et al.*, 2011) très spécifiques à la polyarthrite rhumatoïde (jusqu'à 99%) (Van Venrooij *et al.*, 2002). Ces autoanticorps ont une importante valeur diagnostique car ils peuvent être détectés plusieurs années avant l'apparition des symptômes (GA Schellekens *et al.*, 1998). Leur valeur pronostique est également connue: les anti-CCP sont fortement associés à une maladie plus érosive (Van Jaarsveld *et al.*, 1998).

3.3 Anti-Sa

Les anti-Sa sont des autoanticorps ayant pour cible la vimentine citrullinée, qui sont retrouvés chez environ 40% des personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde (Despres *et al.*, 1994, Vossenaar *et al.*, 2004a). La vimentine est une protéine filamentaire intermédiaire détectée dans le synovium, et exprimée par les macrophages, les FLS (*fibroblast-like synovocytes*, cellules synoviales ressemblant à des fibroblastes), et les cellules du mésenchyme (El-Gabalawy *et al.*, 2004). Il est proposé que la citrullination par les PAD a lieu dans les macrophages en état d'apoptose, car la forte hausse de la concentration de Ca^{2+} dans la cellule qui a lieu pendant ce processus fournit les conditions nécessaires à la réaction de déimination (Inagaki *et al.*, 1989, Vossenaar *et al.*, 2004b). Étant donné le taux d'apoptose relativement faible observé dans le synovium rhumatoïde (Firestein *et al.*, 1995), il est probable que l'accumulation de vimentine citrullinée dans ce microenvironnement soit liée à une déficience dans la clairance des déchets apoptotiques, et que c'est cette accumulation qui mène à la production des anti-Sa par des lymphocytes B et plasmocytes synoviaux (El-Gabalawy *et al.*, 2004).

La présence d'anticorps contre la vimentine citrullinée est hautement spécifique de l'arthrite rhumatoïde, c'est-à-dire qu'ils sont retrouvés presque uniquement chez les personnes atteintes de cette maladie. Boire, Ménard *et al.* (1994) indiquent que ces anticorps n'ont été observés que dans un très faible nombre de personnes atteintes d'un type d'arthrite autre que rhumatoïde, et sont complètement absents chez les personnes atteintes d'autres maladies touchant les tissus conjonctifs (Despres *et al.*, 1994). Les anti-Sa peuvent être présents nonobstant le statut séropositif ou séronégatif (pour le facteur rhumatoïde) du malade, ce qui fait de ces anticorps un marqueur sérologique diagnostique indépendant (Despres *et al.*, 1994).

Les anti-Sa sont fortement associés à un pronostic négatif, caractérisé par du dommage structural plus sévère et plus rapide, ce qui en fait un marqueur pronostique particulièrement intéressant ; l'étude de Boire, Daniel, Carrier et al. (2004) indique que la valeur prédictive d'un mauvais pronostic des anti-Sa est significativement plus élevée que celle du facteur rhumatoïde et des anti-CCP (Boire *et al.*, 2005). La méthode commerciale présentement en usage pour le dosage des anti-Sa a été validée en collaboration avec le Dr. H. A. Ménard, qui avait développé la méthode d'origine discutée dans Despres, Boire et al. 1994.

4 Pathogenèse III : Phase clinique

L'arthrite rhumatoïde s'attaque principalement aux petites articulations synoviales des mains et des pieds, et cause du dommage structural aux articulations affectées. Y sont observées notamment la destruction des cartilages, ainsi que l'érosion osseuse.

4.1 Synovite

La synovite, soit l'inflammation de la membrane synoviale, est causée par divers agents faisant partie du volet adaptatif du système immunitaire. L'activité de la maladie est un paramètre utilisé pour mesurer le niveau d'inflammation, qui est intimement lié aux étapes subséquentes de dommage structural.

4.1.1 Rôle du système immunitaire adaptatif

Le rôle du système immunitaire adaptatif dans la pathogenèse de l'arthrite rhumatoïde est complexe, et implique plusieurs compartiments.

La fonction exacte des lymphocytes T dans la pathogenèse de l'arthrite rhumatoïde n'a pas encore été identifiée, mais pourrait avoir trait à la médiation de la réponse humorale autoimmunitaire, ainsi qu'à la présentation antigénique. Les ACPA, qui sont caractéristiques de, et spécifiques à, l'arthrite rhumatoïde, sont généralement retrouvés sous les isotypes IgM et IgG, et ainsi subissent la commutation isotypique, processus impliquant les lymphocytes T auxiliaires (Cantaert *et al.*, 2009, Shinomiya *et al.*, 1989). De plus, l'association documentée entre les allèles HLA-DR et l'arthrite rhumatoïde, soit via le SE ou l'épitope de protection, suggère que la présentation antigénique aux lymphocytes T pourrait être impliquée.

4.1.2 Activité de la maladie

L'activité de la maladie, par exemple une activité soutenue et élevée ou une rémission clinique, est une issue majeure de l'arthrite rhumatoïde. Le niveau d'activité de la maladie reflète notamment le degré d'inflammation, ce qui en fait un paramètre important pour la prédiction de la progression de la maladie chez les individus.

L'activité de la maladie de l'arthrite rhumatoïde est mesurée par le SDAI (*simplified disease activity index*), un indice composé de la somme de plusieurs paramètres numériques visant à évaluer globalement la progression de la maladie. Les paramètres inclus dans le SDAI sont: le nombre d'articulations gonflées (SJC: *swollen joint count*, de 0 à 28), le nombre d'articulations douloureuses (TJC: *tender joint count*, de 0 à 28), deux évaluations visuelles analogiques de la progression globale de la maladie, l'une par le patient et l'autre par un évaluateur qualifié (VAS: *visual analogue scale*, de 0 à 10), et la concentration de protéine C-réactive comme indicateur d'inflammation (de 0,1 à 10,0, en mg/dL²), pour un total possible de 86,0 (Smolen *et al.*, 2003), voir Tableau 3 (p. 23).

² Une concentration CrP de plus de 10,0 mg/dL représente un très haut taux de protéine C-réactive, et est indiquée par un score de 10,0.

Tableau 3: Éléments du SDAI

Élément	Note
Nombre d'articulations gonflées (SJC)	0-28
Nombre d'articulations douloureuses (TJC)	0-28
Évaluation VAS par le patient	0-10
Évaluation VAS par évaluateur qualifié	0-10
Concentration de protéine C-réactive	0-10

adapté de (Smolen *et al.*, 2003)

Les décomptes d'articulations gonflées et douloureuses évaluent 28 articulations: les 5 articulations interphalangiennes proximales et les 5 articulations métacarpo-phalangiennes des doigts, et les articulations du poignet (radio-carpienne), du coude (humérus, radius et ulna), de l'épaule (scapulo-humérale) et du genou (fémoro-patellaire), de chaque côté du corps (Fuchs *et al.*, 1989). Le gonflement des articulations est représentatif d'effusion synoviale et influence l'amplitude de mouvement des articulations affectées; le décompte d'articulations gonflées est qualitatif et est indicatif d'une inflammation synoviale. Le décompte des articulations douloureuses est une mesure qualitative de la présence de douleur dans l'articulation affectée soit au repos et en présence de pression physique appliquée par un évaluateur, ou quand l'articulation est en mouvement; la présence de douleur influence de façon importante l'amplitude de mouvement des articulations affectées (Scott *et al.*, 1996). D'autres décomptes articulaires, impliquant d'autres articulations d'intérêt possible, peuvent être utilisés, mais le SJC28 (*swollen joint count, 28 joints*) et le TJC28 sont préférés lorsqu'il en vient à l'arthrite rhumatoïde, car la majorité du dommage structural observé a lieu au niveau des articulations incluses dans ces décomptes (Sokka *et al.*, 2005).

Une évaluation visuelle analogique (VAS: *visual analogue scale*) permet d'évaluer une caractéristique qui ne peut pas être directement mesurée; dans le cas de l'arthrite rhumatoïde, cette caractéristique est l'état de santé général. Le patient ou l'évaluateur indique, sur une ligne de 100 mm dont les extrémités sont marquées de valeurs opposées (état de santé générale

très bon ou très mauvais), leur perception de la situation au moment de l'évaluation. Le score VAS lui-même est obtenu en mesurant la distance entre l'extrémité de référence (état de santé très bon, ou 0 mm) et le point marqué par le patient ou l'évaluateur (Wewers *et al.*, 1990). Bien que les scores VAS soient subjectifs (notamment, les patients ont tendance à accorder un score plus élevé que les évaluateurs), l'utilisation des deux mesures permet non seulement d'intégrer des éléments objectifs via la contribution de l'évaluateur, mais également d'avoir un suivi des patients plus cohérent (D. Aletaha *et al.*, 2009, D. Aletaha *et al.*, 2006a).

La concentration de protéine C-réactive, une protéine de phase aiguë produite par le foie, est utilisée comme indicateur d'inflammation. Suite à la sécrétion d'IL-6 par les macrophages pendant plusieurs types de réactions inflammatoires, la concentration de protéine C-réactive augmente de façon importante. Le rôle biologique de la protéine C-réactive est d'activer le système du complément, en se liant à la phosphocholine exprimée sur certaines bactéries ainsi que sur les cellules mortes et en apoptose, afin de promouvoir la phagocytose de ces cellules par les macrophages (Pepys *et al.*, 2003). La concentration de protéine C-réactive en mg/dL est ajoutée aux scores numériques des autres composantes du SDAI, pour un total possible de 86,0.

Des seuils catégoriques d'activité de la maladie ont été établis par Smolen *et al.* (2003), où un score SDAI inférieur ou égal à 5,0 représente une rémission clinique, un score SDAI supérieur à 5,0 mais inférieur ou égal à 20,0 représente une faible activité de la maladie, un score SDAI supérieur à 20,0 mais inférieur ou égal à 40,0 représente une activité modérée de la maladie, et enfin un score SDAI supérieur à 40,0 représente une activité élevée de la maladie. Aletaha *et al.* ont proposé, suite à une validation des critères précédents, des seuils différents, soient où un score SDAI inférieur ou égal à 3,3 représente une rémission clinique, un score SDAI supérieur à 3,3 mais inférieur ou égal à 11,0 représente une activité faible de la maladie, un score SDAI supérieur à 11,0 mais inférieur à 26 représente une activité modérée de la maladie, et enfin un score SDAI supérieur à 26,0 représente une activité élevée de la maladie. (D. Aletaha *et al.*, 2005b).

Comme expliqué plus haut, il existe une association significative entre le degré d'activité de la maladie d'un patient atteint d'arthrite rhumatoïde, indiqué par son score SDAI, et le degré d'incapacité fonctionnelle associée à la maladie, indiqué par son score M-HAQ. Ainsi, le niveau d'activité de la maladie, mesuré par le *simple disease activity index*, est un indice important de la progression de l'arthrite rhumatoïde chez les individus, et l'identification de biomarqueurs indiquant une activité de la maladie élevée et prolongée permettrait de mieux cibler les patients

qui bénéficieraient d'un traitement agressif et soutenu. D'autre part, l'identification de marqueurs prédisant une rémission clinique suite aux traitements traditionnels serait bénéfique afin d'éviter à ces patients les effets secondaires des traitements plus agressifs. Il existe une association importante entre l'incapacité fonctionnelle et le dommage structural. L'étude de Smolen et al. (2003) suggère qu'il existe une association linéaire très significative entre le score M-HAQ des personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde et leur score sur deux indices d'activité de la maladie, soient le DAS28 (disease activity score, 28 joints) et le SDAI (Smolen *et al.*, 2003). Aletaha et Smolen (2005) proposent que la corrélation entre le score M-HAQ et les indices d'activité de la maladie est plus significative au fur et à mesure que la maladie progresse (D Aletaha *et al.*, 2005a).

4.2 Dommage structural

Le dommage articulaire radiographique, constitué des pincements articulaires et des érosions osseuses, représente une issue importante de l'arthrite rhumatoïde. Le dommage structural aux articulations est le résultat de la synovite, cause de la douleur chez le patient, et mène souvent à la perte de fonction des articulations affectées (Scott *et al.*, 1984).

Le pincement articulaire (JSN: joint space narrowing) est le rétrécissement de l'interligne articulaire, c'est-à-dire l'espace entre les deux têtes osseuses de l'articulation affectée, et reflète la dégradation du cartilage dans cette articulation. L'érosion osseuse représente la résorption du tissu osseux médiée par les ostéoclastes, un élément caractéristique de l'arthrite rhumatoïde. La technique d'imagerie médicale principalement utilisée pour l'évaluation du dommage structural est la radiographie conventionnelle (rayons x); d'autres techniques dont l'utilisation est de plus en plus commune sont l'imagerie par résonance magnétique (IRM), et l'imagerie par ultrasons (Østergaard *et al.*, 2008).

Le score Sharp/van der Heijde accorde une valeur de sévérité aux pincements articulaires et aux érosions osseuses, examinés sur radiographie conventionnelle. Un score de pincement entre 0 et 4 est accordé à 15 articulations dans chaque main, et 6 articulations dans chaque pied, pour un score total possible de 168. Un score d'érosion entre 0 et 5 est accordé à 16 articulations dans chaque main, et 4 articulations dans chaque pied, pour un score total possible de 280. Le score de pincement et le score d'érosion sont combinés pour obtenir le score Sharp/van der Heijde total, dont la valeur maximale est de 448 (Van der Heijde, 2000), voir Tableau 4 (p.26).

Tableau 4: Score Sharp/van der Heijde

Élément (pour chaque articulation examinée)	Note
A. Pincement articulaire (JSN)	
Rétrécissement minimal ou focalisé	1
Rétrécissement généralisé, >50% d'espace restant	2
Subluxation, <50% d'espace restant	3
Ankylose ou luxation complète	4
B. Érosions osseuses	
Lésion mineure	1
Note accordée selon le pourcentage de la surface articulaire affecté par les lésions	2-4
Articulation complètement effondrée (collapsus osseux)	5

adapté de (<http://rheumatology.usherbrooke.ca/?q=scoressharp>)

L'association entre le dommage structural et l'incapacité fonctionnelle, mesurée par le score M-HAQ, devient plus importante au fur et à mesure que la maladie progresse. Aux étapes hâtives, l'activité de la maladie est élevée, et mène plutôt à l'incapacité fonctionnelle qu'au dommage structural. Par contre aux étapes tardives, une fois le dommage structural établi, ce paramètre devient le principal responsable du déclin de la fonction des articulations affectées (Lillegraven *et al.*, 2012). L'étude d'Aletaha et Smolen (2006) indique que le déclin fonctionnel peut être ralenti, arrêté, ou même renversé, aux étapes hâtives, mais qu'aux étapes tardives le dommage structural et le déclin fonctionnel ont de plus en plus tendance à être irréversibles (Daniel Aletaha *et al.*, 2006b). Relativement peu d'études ont examiné les deux volets du dommage articulaire séparément, soit la contribution individuelle des pincements articulaires ou des érosions au déclin de la fonction de l'articulation: l'étude d'Aletaha (2011) suggère que l'incapacité fonctionnelle est associée de manière plus significative aux pincements articulaires qu'aux érosions osseuses, mais ces résultats sont mis en question par Landéwé et van der

Heijde (2011) (D. Aletaha *et al.*, 2011, Landewe *et al.*, 2011). Smolen et Aletaha (2010) ont présenté une estimation de la corrélation linéaire entre les scores Sharp/van der Heijde et M-HAQ à 0,01 TSS/M-HAQ (TSS: total Sharp score) (Smolen *et al.*, 2010a).

Le score SDAI reflétant le niveau d'inflammation, il existe une corrélation entre le niveau d'activité et la synovite caractéristique à l'arthrite rhumatoïde. Machold et al. (2007) indiquent également une association entre le niveau d'activité de la maladie et la présence d'une maladie érosive, qui devient significative au fur et à mesure que la maladie progresse (Machold *et al.*, 2007).

L'évaluation du dommage articulaire est l'une des mesures les plus importantes de la sévérité de la maladie; un patient atteint d'arthrite présentant un plus grand degré de dommage structural aux étapes hâtives de la maladie a un risque plus élevé de développer une maladie plus grave aux étapes tardives. L'identification de marqueurs indépendants permettant de prédire le degré de dommage structural d'un patient atteint d'arthrite rhumatoïde à l'autre serait bénéfique afin de mieux cibler les traitements, et d'administrer des traitements dont l'effet sur le dommage structural est plus agressif aux patients qui sont plus à risque de développer une maladie causant beaucoup de dommage radiographique.

4.2.1 Dégradation du cartilage

L'une des issues cliniques de l'arthrite rhumatoïde est le dommage structural, qui inclue notamment la destruction du cartilage des articulations affectées. La destruction du cartilage se manifeste sous la forme de pincement articulaire, visible sur radiographie, et le nombre d'articulations présentant un pincement articulaire ainsi que le nombre d'érosions osseuses sont utilisés pour former le score Sharp/van der Heijde, qui est utilisé pour mesurer la progression radiographique du dommage structural, c'est-à-dire de l'activité de la maladie. La destruction du cartilage est médiée par des enzymes protéolytiques produites localement, par les cellules immunitaires provenant du pannus résultant de l'inflammation prolongée de la membrane synoviale et ayant envahi les couches superficielles du cartilage.

Lors de l'inflammation synoviale, des cellules immunitaires, incluant des FLS, macrophages, mastocytes et neutrophiles, sont recrutées au site de l'inflammation articulaire, s'y accumulent et y prolifèrent. L'interface entre le cartilage articulaire et l'avancée de tissu granuleux dite pannus est le lieu du dommage structural le plus prononcé. Les FLS du pannus adhèrent à la surface du cartilage, puis en envahissent les strates supérieures. Des modifications des

propriétés structurales de la surface du cartilage encouragent le processus d'adhésion et d'invasion, notamment une réduction importante dans l'expression de la lubriline (McInnes *et al.*, 2011). Les FLS du pannus sont les cellules qui produisent la majorité des enzymes protéolytiques responsables de la destruction du cartilage en arthrite rhumatoïde, sous la régulation de médiateurs locaux (cytokines, facteurs de croissance, prostaglandines, etc.) produites par les autres cellules immunitaires présentes dans l'articulation affectée (Ainola *et al.*, 2005).

Les enzymes protéolytiques impliquées dans la destruction du cartilage incluent notamment la famille des métalloprotéinases matricielles (particulièrement MMP-1, -3, -8, -13, -14, et -16), ainsi que des sérine protéases, des aspartate protéases et des cystéine protéases. Ces enzymes protéolytiques s'attaquent aux réseaux de collagène et d'agrécan constituant la matrice extracellulaire du cartilage. Le contenu en glycosaminoglycanes de la matrice est affecté, ce qui augmente la quantité d'eau présente dans le tissu et mène au mal fonctionnement biomécanique (James *et al.*, 2001). L'activité des métalloprotéinases matricielles peut être inhibée par les membres de la classe des TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinases), des inhibiteurs endogènes dont le domaine N-terminal lie le domaine catalytique des MMPs, de ce fait en bloquant l'accès de manière irréversible. Par contre, l'effet des TIMPs ne permet pas de faire marche arrière sur le processus de destruction, seulement à en interrompre la progression.

Le cartilage articulaire est un tissu possédant un potentiel de régénération très limité, en raison de la dense matrice extracellulaire qui réduit grandement la mobilité des chondrocytes, du manque relatif d'un réseau vasculaire, neural, ou lymphatique, empêchant l'approvisionnement en ressources, et de l'absence de cellules progénitrices locales (Zhang *et al.*, 2009). Les chondrocytes, cellules composant le cartilage, subissent l'apoptose sous l'influence de cytokines synoviales produites par les FLS et d'intermédiaires réactifs d'azote. Le cartilage articulaire est graduellement détruit suite à la dégradation de la matrice extracellulaire et à l'apoptose massive, et sans remplacement, des chondrocytes, menant à l'apparition radiographique des pincements articulaires.

Le processus de la destruction du cartilage est relativement mal compris, et varie grandement d'un patient atteint d'arthrite rhumatoïde à l'autre. La destruction du cartilage est observée en l'absence d'inflammation chez certains patients, et vice-versa chez d'autres. La destruction du cartilage est associée à l'autre composante du dommage structural, soit la destruction osseuse, mais ces deux composantes représentent des processus distincts.

4.2.2 Érosion osseuse

Outre la dégradation du cartilage, l'autre aspect majeur du dommage structural chez les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde est l'érosion osseuse, qui représente un déséquilibre entre l'ostéolyse, c'est-à-dire la résorption osseuse médiée par les ostéoclastes, et l'ostéogenèse, c'est-à-dire la formation osseuse médiée par les ostéoblastes, où l'ostéolyse est privilégiée. L'érosion osseuse est visible sur radiographie, et se manifeste sous la forme de ruptures dans la surface de l'os cortical, ainsi que d'une perte de masse au niveau de l'os spongieux adjacent. Affectant 80% des personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde, l'érosion osseuse est une issue importante de la maladie qui mène à la perte de fonction de l'articulation affectée, et est associée à une maladie plus sévère.

L'érosion osseuse se produit d'abord dans l'os cortical, c'est-à-dire le tissu osseux dense ayant pour rôle de supporter le corps, de protéger les organes, et de permettre le mouvement. Les ostéoclastes, cellules multinucléées d'origine hématopoïétique et possédant la machinerie enzymatique nécessaire pour la dégradation des tissus minéralisés, particulièrement le tissu osseux sous-jacent au cartilage hyalin minéralisé présent dans les articulations. La destruction osseuse se propage à l'os spongieux, c'est-à-dire le réseau osseux moins dense qui contient la moelle osseuse, via la formation de puits profonds de résorption dans l'os cortical. Les puits de résorption sont graduellement remplis de tissu inflammatoire, qui détruit la barrière entre la cavité de la moelle osseuse et le reste du corps, permettant l'accès éventuel à la moelle osseuse des synovocytes, et cause de l'inflammation et l'agrégation et accumulation de lymphocytes T et B, qui remplacent éventuellement la moelle jaune (McInnes *et al.*, 2011, Schett *et al.*, 2012).

Certains sites anatomiques sont privilégiés pour la résorption osseuse, spécifiquement les articulations synoviales de la main, plus particulièrement le côté radial et la face dorsale. La majorité des érosions osseuses en arthrite rhumatoïde est localisée aux endroits où le synovium est en contact direct avec l'os juxta-articulaire. Plusieurs facteurs anatomiques contribuent à favoriser ces sites pour la formation de puits de résorption, incluant la présence de cartilage minéralisé, la présence d'un site d'insertion de ligaments, qui représente un site de transduction de force mécanique, et l'inflammation d'un tendon et de sa gaine synoviale, ou ténosynovite, reliés à une articulation, qui peuvent permettre la propagation de l'inflammation au synovium adjacent.

Les ostéoclastes sont les cellules responsables de la résorption osseuse. Sous l'influence de M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) et de RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), les ostéoclastes se différencient et envahissent la surface périostale adjacente au cartilage articulaire affecté. M-CSF est un facteur de croissance sécrété par les ostéoblastes suite à leur stimulation par l'hormone parathyroïde, impliqué dans la prolifération, la différenciation, et la survie, de plusieurs cellules d'origine hématopoïétique, incluant les ostéoclastes (Fixe *et al.*, 1997). M-CSF agit sur les ostéoclastes via la stimulation paracrine, induit leur différenciation, et mène, via la résorption osseuse, à des niveaux plus élevés de calcium dans le plasma sanguin. RANKL est une protéine membranaire de type II exprimée par les ostéoblastes, dont le ligand principal est RANK (receptor activator of nuclear factor kappa-B), exprimé sur les ostéoclastes. OPG (osteoprotegerin) est un récepteur-leurre de RANKL, qui, en liant RANKL, empêche l'activation de RANK, inhibant ainsi la différenciation des précurseurs des ostéoclastes en ostéoclastes matures (Krakauer, 2008). Des cellules d'origine hématopoïétique migrent d'abord dans les organes lymphoïdes secondaires, puis dans les articulations. La différenciation en ostéoclastes a lieu sous l'influence de M-CSF et RANKL, et les ostéoclastes matures deviennent activés lorsqu'ils entrent en contact avec la surface osseuse.

Les ostéoclastes forment une jonction étanche avec les cellules osseuses via des interactions entre les intégrines des ostéoclastes, présentes dans les podosomes, et les protéines matricielles des cellules osseuses. La dégradation du tissu osseux est effectuée par l'action de pompes à protons, qui réduisent le pH local, ainsi que par l'action d'enzymes protéolytiques sécrétées, incluant la cathepsine K, la métalloprotéinase matricielle 9 (MMP-9), et TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase). La combinaison des actions du pH faible et des enzymes protéolytiques mène à la dégradation de la trame osseuse, qui commence à l'interface entre le tissu synovial inflammatoire, dit pannus, et la surface osseuse périarticulaire.

La présence d'ACPA est un prédicteur important de l'érosion osseuse chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde, et est associée à une maladie plus sévère et présentant du dommage structural plus grave (van der Helm-van Mil *et al.*, 2005b, van Steenberg *et al.*, 2015). Les ACPA se lient aux cellules de lignée hématopoïétique, contribuent à leur déplacement de la moelle osseuse aux organes lymphoïdes secondaires, induisent leur production de TNF- α , et favorisent leur différenciation en ostéoclastes en induisant les récepteurs de M-CSF et RANKL, facteurs-clés de différenciation des ostéoclastes, menant à la résorption osseuse (Harre *et al.*, 2012, Hecht *et al.*, 2014).

L'érosion osseuse chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde est influencée par de multiples éléments des systèmes immunitaires inné et adaptatif. Les ostéoclastes expriment à leur surface des récepteurs ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif), éléments de l'immunité innée qui fournissent un signal co-stimulateur pour l'ostéoclastogénèse, avec M-CSF et RANKL (Koga *et al.*, 2004). Le système immunitaire est impliqué via les lymphocytes T CD4+, qui peuvent sécréter ou exprimer à leur surface RANKL et ainsi induire l'ostéoclastogénèse médiée par RANK (Kong *et al.*, 1999, Tanaka, 2013).

L'érosion osseuse chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde est le résultat d'une inflammation soutenue et persistante dans le synovium des articulations affectées. La synovite fournit un microenvironnement riche en cytokines proinflammatoires, notamment TNF, IL-1, IL-6, et IL-17, qui favorisent la différenciation et l'activité des ostéoclastes en stimulant l'expression de RANKL par les synovocytes (McInnes *et al.*, 2011, Schett *et al.*, 2012).

En plus de leurs effets directs sur les précurseurs des ostéoclastes, les cytokines TNF, IL-1, IL-6 ont également des effets indirects sur la résorption osseuse, en permettant l'expression de RANKL par les cellules du mésenchyme pour favoriser et amplifier la différenciation et l'activation des ostéoclastes. De plus, l'érosion osseuse peut être détectée peu de temps après le début de la maladie, ainsi que progresser même chez les patients en rémission clinique ou présentant une faible activité de la maladie, ce qui suggère qu'une synovite sous-clinique, résiduelle ou pré-clinique, peut être en cause. Il est également possible que les processus d'inflammation et de résorption osseuse puissent se dissocier, et que l'érosion osseuse puisse progresser de manière indépendante à l'inflammation (AK Brown *et al.*, 2008, G. Cohen *et al.*, 2007). L'IL-17, produite entre autres par les lymphocytes Th17 et les mastocytes, joue plusieurs rôles dans la résorption osseuse : elle est un important inducteur de l'expression de RANKL à la surface des fibroblastes et ostéoclastes, bloque le fonctionnement de plusieurs facteurs antiostéoclastogéniques, et induit la production d'IL-1 et de TNF chez les fibroblastes et macrophages synoviaux. Enfin, certaines cytokines proinflammatoires retrouvées dans le synovium rhumatoïde semblent avoir des effets suppresseurs sur le processus d'ostéoclastogénèse ; par contre, les effets anti-ostéoclastogéniques ne parviennent pas à empêcher la résorption osseuse.

Il ne se produit que très peu de réparation du dommage érosif osseux chez les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde, ce qui est similaire à la situation dans le cartilage, si bien que le dommage structural est généralement considéré permanent et irréparable. Si une réparation du tissu osseux érodé a lieu, ceci se manifeste généralement sous la forme d'apparition de

nouveau tissu osseux. Il est probable que des médiateurs cytokiniques inhibent la différenciation des précurseurs mésenchymaux en chondroblastes et en ostéoblastes.

Les traitements standards utilisés pour les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde visent à réduire la synovite, dont le contrôle incomplet permet la progression du dommage structural sous forme de résorption osseuse médiée par les ostéoclastes. L'inhibition de M-CSF et/ou de RANKL bloque la différenciation en ostéoclastes sans avoir d'effet direct sur l'inflammation. La synovite et le dommage articulaire sont des processus distincts, mais leurs produits agissent en boucles de rétroaction positive sur l'autre processus, et propagent ainsi l'inflammation. L'utilisation d'inhibiteurs biologiques de certaines cytokines peut réduire l'inflammation et l'érosion osseuse, notamment l'administration de bloqueurs du TNF (infliximab, etanercept), ou de bloqueurs du récepteur de l'IL-6 (tocilizumab), ou de bloqueurs de protéines kinases intercellulaires (inhibiteurs de JAK, SYK). L'inhibition de l'IL-1, un déclencheur important pour l'ostéoclastogénèse, est relativement peu efficace. La voie de co-stimulation CD28-CD80/CD86 des lymphocytes T peut également être bloquée par l'utilisation de CTLA4-Ig (atabcept), qui lie également CD80 et CD86, empêchant ainsi la différenciation des ostéoclastes nonobstant la présence de M-CSF et RANKL, inhibant l'inflammation et l'érosion de manière importante.

Pour conclure cette section, la détection et la quantification des érosions osseuses sont des instruments majeurs pour le diagnostic de l'arthrite rhumatoïde. Le nombre et la sévérité de l'érosion osseuse sont d'excellents prédicteurs de la progression de la maladie, et sont généralement indicateurs d'une maladie plus sévère, c'est-à-dire associée à plus de dommage articulaire, à un plus grand degré de handicap, et à une mortalité plus élevée chez les personnes atteintes. L'analyse des érosions osseuses est également d'importance majeure pour l'analyse du degré d'efficacité des traitements pharmacologiques: les essais cliniques d'agents anti-rhumatoïdes modificateurs de la maladie visent à évaluer la capacité du traitement à retarder ou même à interrompre la progression du dommage structural. En plus de la douleur et de l'ankylose des articulations affectées, la résorption osseuse a des conséquences systémiques, notamment l'hypercalcémie, l'ostéoporose, et un risque accru de fractures osseuses.

4.3 Manifestations systémiques

L'arthrite rhumatoïde est une maladie systémique comprenant, en plus de l'inflammation articulaire, des manifestations extra-articulaires et des complications systémiques, qui sont

observées chez environ 40% des personnes atteintes, plus fréquemment chez les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde séropositive que séronégative. Ces manifestations sont généralement reliées à des vascularites, reflètent souvent une inflammation de longue date, et comprennent des maladies cardiovasculaires et pulmonaires, des troubles musculo-squelettiques, et des manifestations gastrointestinales, rénales, neurologiques, hématologiques, et hépatiques (Cojocaru *et al.*, 2010, McInnes *et al.*, 2011).

Les maladies cardiovasculaires observées chez les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïdes incluent l'athérosclérose, les infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux, l'insuffisance cardiaque, la péricardite, l'endocardite, et la rigidité artérielle. Le taux élevé de maladies cardiovasculaires chez les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde n'est pas expliqué par les facteurs traditionnels de risque de maladie cardiovasculaire, soient l'âge, le statut diabétique, la tabagie, l'hypertension, la dyslipidémie, l'obésité, le manque d'exercice physique, et la tendance familiale vers les maladies coronariennes (del Rincon *et al.*, 2001). Les maladies cardiovasculaires chez les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde seraient plutôt dues à des molécules présentes dans la circulation, soient des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6), des protéines de phase aigüe, des complexes immuns, des particules lipidiques altérées provenant du foie. Ces molécules mènent à une activation endothéliale élevée, ce qui pourrait rendre instable les plaques athéromateuses (Sattar *et al.*, 2005).

Des maladies pulmonaires inflammatoires et fibrotiques sont également observées chez un grand nombre de personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde, spécifiquement l'épanchement pleural, ainsi que la pneumopathie interstitielle. Les manifestations pulmonaires sont fréquentes (observées chez environ 50% des patients atteints), mais rarement cliniquement détectées (environ 10%) car elles sont souvent asymptomatiques (Provenzano, 2002). Les manifestations pulmonaires chez les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde sont généralement liées à la vascularite, ainsi qu'à des nodules dans le parenchyme pulmonaire (Cojocaru *et al.*, 2010). L'arthrite rhumatoïde est également associée à un risque plus élevé de cancer du poumon que dans la population générale, possiblement à cause de l'association avec le tabagisme ou lié à l'inflammation pulmonaire menant au remodelage fibrotique du tissu pulmonaire interstitiel (McInnes *et al.*, 2011)

L'arthrite rhumatoïde est associée à des manifestations musculo-squelettiques, soient la sarcopénie et l'ostéoporose, menant à la faiblesse musculaire et la perte de fonction, ainsi qu'un risque accru de fractures (Guler-Yuksel *et al.*, 2009, Matschke *et al.*, 2010, Rall *et al.*, 2004). Sont également observées des manifestations dans le système tégumentaire,

particulièrement la présence de nodules rhumatoïdes chez environ 20% des patients; ces manifestations sont causées pour la plupart par une vascularite des petits vaisseaux sanguins, particulièrement dans les extrémités, et mènent à de la douleur, ainsi qu'à une difficulté accrue à effectuer des tâches délicates (C. Turesson *et al.*, 2004b). L'arthrite rhumatoïde se manifeste également dans les glandes exocrines, spécifiquement les glandes lacrimales et salivaires; ces manifestations sont principalement causées par des vascularites des petits vaisseaux sanguins. Les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde sont à risque particulier de développer le syndrome de Sjögren secondaire, c'est-à-dire la destruction autoimmune des glandes exocrines par les leucocytes (He *et al.*, 2013).

Quoique l'implication primaire du système gastrointestinal est assez rare, une vascularite mésentérique peut mener à un infarctus intestinal, qui est souvent fatal pour les personnes atteintes. D'autres manifestations gastrointestinales sont fréquemment observées chez les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïdes, telles que des saignements et des perforations intestinaux, mais ces manifestations sont typiquement iatrogènes, c'est-à-dire qu'elles sont des effets secondaires du traitement prescrit (Cojocar *et al.*, 2010). Les manifestations gastrointestinales sont souvent accompagnées de manifestations rénales, également iatrogènes.

Les manifestations neurologiques principales sont la polyneuropathie diffuse du système nerveux périphérique, ainsi que la mononévrite multiple, causées par la vascularite des petits vaisseaux sanguins irriguant les nerfs (Ramos-Remus *et al.*, 2012). Les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde ont également un risque accru de désordres psychologiques, spécifiquement l'anxiété et la dépression, associées à la perte de la capacité à effectuer les activités quotidiennes et que la perception de la maladie par le patient (Gettings, 2010).

Les manifestations hématologiques de l'arthrite rhumatoïde incluent l'anémie, généralement causée par l'activité multifactorielle de la maladie, par les saignements gastrointestinaux iatrogènes et dus à la malnutrition, ou par la suppression de la moelle osseuse et l'érythropoïèse inadéquate associés à la nature immunosuppressive des traitements (Cojocar *et al.*, 2010). Sont également observées chez un nombre important de patients la neutropénie, la thrombocytopénie, et l'éosinophilie généralement associées aux traitements immunosuppresseurs.

Les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde sont à risque élevé de développer des hémopathies malignes, spécifiquement des lymphomes. Plusieurs mécanismes ont été postulés, notamment des dérangements dans la sélection clonale des lymphocytes B, dans

l'immunosurveillance suite à des facultés affaiblies des lymphocytes T régulateurs, ainsi qu'au mal fonctionnement des cellules NK. Les personnes atteintes de syndrome de Sjögren secondaire à l'arthrite rhumatoïde sont à risque accru de développer des lymphomes non-hodgkiniens. Les mécanismes menant à cette association ont trait à la surstimulation chronique des lymphocytes B, menant à l'augmentation de la fréquence des mutations oncogènes et ainsi à un mal fonctionnement des *checkpoints* de l'activation des lymphocytes B, menant éventuellement à la transformation en une lignée maligne.

Pour conclure cette section, les personnes atteintes de manifestations extra-articulaires et de complications systémiques de l'arthrite rhumatoïde ont un risque élevé de morbidité et de mortalité prématurées. Il n'existe présentement pas de prédicteurs fiables indépendants pour les manifestations extra-articulaires, et ces dernières indiquent généralement un pronostic négatif. Par contre, nous observons une diminution de la prévalence des manifestations extra-articulaires au fil du temps; le motif temporel de cette réduction suggère que le traitement *disease-modifying* de l'arthrite rhumatoïde exerce également une fonction importante sur les manifestations extra-articulaires et les complications systémiques.

5 Traitement de l'arthrite rhumatoïde

Le traitement de la polyarthrite rhumatoïde implique généralement plusieurs volets, incluant des traitements non-pharmacologiques visant à améliorer la qualité de vie des personnes atteintes, ainsi que des traitements pharmacologiques visant différents objectifs.

5.1 Traitements non-pharmacologiques

Les options de traitement non-pharmacologique de l'arthrite rhumatoïde consistent principalement en des modifications du mode de vie du patient, visant à réduire l'inconfort et la douleur associés aux symptômes. Le niveau d'efficacité de ces traitements varie énormément d'un patient à l'autre (Vliet Vlieland, 2007).

Le traitement par physiothérapie vise la réadaptation des déficiences et incapacités touchant les articulations affectées. L'amplitude réduite du mouvement des articulations affectées, ainsi que la raideur matinale rapportée par un grand nombre de patients, peuvent être atténuées par des

traitements physiothérapeutiques tels que la thérapie manuelle ou assistée, ainsi que par l'exécution d'étirements spécialisés et le massage des zones affectées (Ernst, 2004).

L'adoption d'un régime d'exercice physique vise la restauration, la préservation, et l'amélioration de l'amplitude de mouvement ainsi que la force et l'endurance musculaire (Van Den Ende *et al.*, 2000). Cette méthode de traitement a également un effet positif sur la capacité à effectuer certaines tâches, la densité osseuse, et l'état émotionnel des patients (Stenstrom *et al.*, 2003).

L'ergothérapie pour les patients atteints d'arthrite rhumatoïde consiste principalement en l'adaptation de différentes activités quotidiennes afin de faciliter leur exécution par les personnes atteintes, et vise à réduire la douleur, à surmonter les limitations articulaires et la faiblesse musculaire, et à améliorer la sécurité lors de certaines tâches (Steultjens *et al.*, 2002). L'ergothérapie comprend l'utilisation de dispositifs facilitant certaines tâches plus difficiles pour les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde, par exemple des ouvre-bocaux, sièges de toilette surélevés, et lits adaptés (Veehof *et al.*, 2006).

Le port d'orthèses permet de stabiliser ou d'immobiliser les articulations affectées lors de périodes de repos (pour diminuer la douleur et l'inflammation articulaires), ou de compenser ou corriger des déficiences articulaires ou augmenter le rendement de l'articulation pendant certaines activités, en stabilisant l'articulation lors des efforts. Les orthèses spécialisées fréquemment employées par les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde incluent les attelles pour poignets, doigts et pouces, le port de souliers et d'inserts spécialisés, et les orthèses cervicales (Egan *et al.*, 2003).

La thérapie nutritionnelle consiste en la prescription d'une diète adaptée aux besoins spécifiques des patients atteints d'arthrite rhumatoïde. Les patients atteints d'arthrite rhumatoïdes sont considérés comme étant une population à haut risque de malnutrition (Rennie *et al.*, 2003). Sont principalement en cause le catabolisme protéinique excessif causé par plusieurs cytokines inflammatoires, menant à une cachexie musculaire importante, ainsi que l'atrophie par inactivité causée par la diminution fonctionnelle (Fukuda *et al.*, 2005). Entrent également en jeu les effets anorexigènes et les effets secondaires gastrointestinaux de plusieurs traitements pharmacologiques de l'arthrite rhumatoïde, de même que les difficultés associées à la préparation manuelle d'une alimentation saine.

5.2 Traitements pharmacologiques

Les thérapies pharmacologiques présentement en usage pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde incluent l'administration d'antidouleurs et anti-inflammatoires non-stéroïdiens, de corticostéroïdes, de DMARD (disease-modifying antirheumatic drugs), et d'agents biologiques. Ces approches visent des effets différents et peuvent être utilisées individuellement, simultanément, et en complément aux traitements non-pharmacologiques mentionnés ci-dessus (Iannuzzi *et al.*, 1983, Scott *et al.*, 1987). Le modèle de traitement ciblé (T2T, *treat to target*), vise à ajuster au besoin les traitements administrés aux patients individuels, en réponse à des suivis fréquents et tenant compte des critères de rémission les plus récents (Smolen, 2016, Smolen *et al.*, 2016).

5.2.1 Anti-inflammatoires non-stéroïdiens

L'administration d'antidouleurs et d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens vise à réduire la douleur, l'inflammation, et la raideur associées à l'arthrite rhumatoïde, mais n'affectent pas la réponse immunitaire ou la progression de la maladie de façon significative. Les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde souffrent de douleur chronique, pouvant être intense, et qui peut être déclenchée par une stimulation délicate ou un mouvement léger. L'inflammation articulaire libère des cytokines pro-inflammatoires, histamines, bradykinines, et autres facteurs, menant à un profil cytokinique local altéré, ce qui sensibilise les nocicepteurs périphériques (van Laar *et al.*, 2012). Des cascades cellulaires mènent ensuite à une sensibilisation centrale, c'est-à-dire une hypersensibilité généralisée à la douleur (Woolf, 2011).

Le traitement pharmacologique de la douleur chez les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde peut être direct, via l'administration d'agents analgésiques, dont l'acétaminophène ainsi que les opioïdes. Les agents analgésiques présentent un risque important de dépendance (particulièrement les opioïdes), de toxicité, et d'interactions néfastes avec autres substances. L'administration d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens représente un traitement direct de l'inflammation, et indirect de la douleur; les AINS réduisent relativement l'inflammation locale et généralisée, ce qui a pour effet d'atténuer la sensibilisation des nocicepteurs; un effet additionnel consiste en la réduction importante de la raideur matinale. Les AINS ont également des effets indésirables, notamment des effets secondaires gastrointestinaux et cardiovasculaires.

D'autres thérapies sont utilisées en complément aux traitements classiques, incluant des antidépresseurs tricycliques, des agents antiépileptiques, des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, et agents topiques comme la lidocaïne (van Laar *et al.*, 2012). L'administration d'antidouleurs et d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens chez les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde est généralement complémentaire à des traitements visant à ralentir la progression de la maladie.

5.2.2 Corticostéroïdes

L'administration de corticostéroïdes vise à réduire l'inflammation associée à l'arthrite rhumatoïde, en atténuant l'activité du système immunitaire. Leur efficacité à apaiser les désordres inflammatoires est le résultat des effets pléiotropiques du récepteur glucocorticoïde sur plusieurs voies de signalisation, spécifiquement le blocage de la transcription de plusieurs protéines inflammatoires par NF- κ B et par AP-1, ainsi que l'induction de protéines anti-inflammatoires comme I κ B, l'annexine 1, et la MAPK phosphatase I (Coutinho *et al.*, 2011, Rhen *et al.*, 2005).

La pléiotropie du récepteur glucocorticoïde, par contre, peut mener à des effets néfastes, notamment l'immunosuppression, l'hypertension, l'inhibition de la réparation des blessures, et des dérangements métaboliques. La résistance acquise aux glucocorticoïdes est également commune chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Chikanza, 2002). Ces propriétés nocives contre-indiquent la thérapie aux glucocorticoïdes prolongée. L'administration de corticostéroïdes n'affecte pas la progression de la maladie.

5.3 DMARDs

Les DMARDs (disease-modifying antirheumatic drugs) sont une catégorie de traitements qui ont un effet direct sur le cours de la maladie chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde, par exemple en inhibant la progression du dommage structural ou en réduisant les niveaux d'anticorps autoréactifs, en amont comparativement aux autres types de traitements, qui visent plutôt à traiter les symptômes engendrés par la maladie (Kirwan *et al.*, 1983, Smolen *et al.*, 2015, V. Wright *et al.*, 1980a). Les DMARDs peuvent être caractérisés par leur origine synthétique ou biologique (Smolen *et al.*, 2014b).

5.3.1 DMARDs synthétiques

Les DMARDs d'origine synthétique sont des agents chimiques utilisés pour traiter la polyarthrite rhumatoïde. Ces traitements peuvent être catégorisés selon qu'ils sont conventionnels (csDMARD) ou ciblés (tsDMARD). Les csDMARD sont des DMARDs synthétiques dont la capacité à modifier le cours de l'arthrite rhumatoïde a été déterminée de manière empirique, soit de manière fortuite ou suite à des hypothèses concernant des aspects spécifiques de la pathogenèse (Kirwan *et al.*, 1983).

5.3.2 Méthotrexate

Le méthotrexate est un DMARD synthétique dit conventionnel, csDMARD (Smolen *et al.*, 2014b), dont l'administration pour traiter l'arthrite rhumatoïde est d'usage commun depuis une trentaine d'années (Michael E Weinblatt *et al.*, 1985). Le méthotrexate est généralement considéré comme étant le DMARD le plus efficace et sécuritaire à long terme (Pincus *et al.*, 2003), et est le traitement de première ligne recommandé par l'EULAR (Smolen *et al.*, 2010b). Le mécanisme d'action précis du méthotrexate dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde n'a pas encore été identifié, mais plusieurs rôles ont été proposés : l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T ainsi que la promotion de leur apoptose, la libération d'adénosine anti-inflammatoire, et un effet sur l'expression de molécules d'adhésion et la production de cytokines (Schnabel *et al.*, 1994, Wessels *et al.*, 2008). Le méthotrexate peut être administré en monothérapie ou en combinaison avec d'autres DMARDs, auquel cas il augmente leur efficacité (Smolen *et al.*, 2010b). Outre le traitement de l'arthrite rhumatoïde, le méthotrexate est utilisé comme agent de chimiothérapie dans le traitement de plusieurs cancers (Rajagopalan *et al.*, 2002), et peut également être administré dans les cas où il est nécessaire de mettre fin à une grossesse extra-utérine (Mol *et al.*, 2008). Dans les cas où il existe une contre-indication ou une intolérance au méthotrexate, l'EULAR recommande l'administration d'autres DMARDs synthétiques tels que leflunomide, sulfasalazine, ou sels d'or (Smolen *et al.*, 2010b).

5.3.3 Autres csDMARDs

Le leflunomide est un csDMARD ayant un effet inhibiteur sur l'enzyme dihydroorotate déshydrogénase, qui participe à la synthèse d'uridine monophosphate, empêchant ainsi la

synthèse de l'ARN (Greene *et al.*, 1995). La sulfasalazine est un csDMARD dont l'effet exact dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde n'a pas encore été identifié, mais qui est probablement relié à une inhibition de la voie de signalisation par NF- κ B (Wahl *et al.*, 1998). L'injection intramusculaire d'or métallique est considérée comme un csDMARD et dont le rôle dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde n'a pas encore été identifié (Wolfe *et al.*, 1993).

5.3.4 tsDMARDs

Les DMARDs synthétiques ciblés (tsDMARDs, targeted synthetic disease-modifying antirheumatic drugs), diffèrent de la catégorie des csDMARDs par leur méthode de développement, qui ciblait une structure moléculaire particulière en vue de la neutraliser (Smolen *et al.*, 2014b). La catégorie des tsDMARDs comprend les traitements au tofacitinib, fostamatinib, et apremilast, dont les cibles moléculaires sont la classe des kinases janus, la tyrosine kinase splénique, et la phosphodiesterase-4, respectivement (Brasemann *et al.*, 2006, Genovese *et al.*, 2015, Kremer *et al.*, 2009).

5.3.5 Agents biologiques

Les agents biologiques sont une catégorie de DMARDs qui diffèrent des agents synthétiques de par leur nature biologique et non synthétique. Les agents biologiques sont catégorisés selon qu'ils sont des agents biologiques d'origine (boDMARD) ou des agents biosimilaires (bsDMARD) (Smolen *et al.*, 2014b).

Les agents biologiques d'origine sont généralement des anticorps monoclonaux contre des protéines extracellulaires spécifiques, ou sont des formes recombinantes de molécules inhibitrices naturelles de cytokines impliquées dans la réponse immunitaire (King *et al.*, 2012, Moreland *et al.*, 1997). La principale cytokine ciblée par plusieurs traitements boDMARD est le facteur de nécrose tumorale (TNF, *tumor necrosis factor*), qui est surexprimé chez les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde et participe de manière importante à la réponse inflammatoire (Feldmann *et al.*, 2003, E. M. Ruderman, 2012b, Tracey *et al.*, 2008). Plusieurs boDMARD visent à inhiber l'action du TNF : adalimumab, certolizumab, etanercept, golimumab, infliximab (Kempeni, 1999, Maini *et al.*, 1999, Mazumdar *et al.*, 2009, Peppel *et al.*, 1991, Ruiz Garcia *et al.*, 2011). Certains boDMARD ciblent d'autres cytokines, comme l'IL-1 (anakinra), ou l'IL-6 (tocilizumab) (Mertens *et al.*, 2009, Venkiteshwaran, 2009). D'autres traitements de cette

catégorie ciblent plutôt une population cellulaire spécifique, comme les lymphocytes B (le rituximab inhibe CD20 et détruit ainsi les lymphocytes B qui expriment cette molécule) ou les lymphocytes T (l'abatacept inhibe le signal de costimulation par la protéine B7 exprimée sur les cellules présentatrices d'antigènes et requis pour l'activation des lymphocytes T) (Edwards *et al.*, 2004, Teng *et al.*, 2005).

Plusieurs nouveaux agents biologiques sont présentement à différentes étapes de développement, ciblant d'autres molécules telles l'IL-6R, BAFF (*B-cell activating factor*), IL-17 et son récepteur, IL12/23, GM-CSF, IL-21, et IL-20 (Avci *et al.*, 2015).

Les bsDMARD sont des versions alternatives de molécules biologiques où les structures primaires, secondaires, tertiaires, et parfois même les modifications post-traductionnelles, ont été reproduites, et qui ont un effet similaire à la molécule d'origine (Dörner *et al.*, 2012). Les agents biosimilaires sont l'équivalent des versions génériques de produits pharmaceutiques produits par des compagnies autres que celles qui ont développé la molécule d'origine, et sont généralement moins coûteux que les agents biologiques d'origine (Huub Schellekens, 2004). Par exemple, l'Etacept est un biosimilaire de l'etanercept produit par la compagnie pharmaceutique Indienne Cipla.

L'administration de DMARDs aux personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde présente un certain nombre d'inconvénients importants, notamment des effets secondaires graves et un lourd fardeau financier.

5.3.6 Effets secondaires des DMARDs

De façon générale, l'effet secondaire principal associé aux DMARDs, qu'il s'agisse d'agents synthétiques ou d'agents biologiques, est un risque augmenté d'infections, à cause de la nature immunosuppressive de ces agents (Caporali *et al.*, 2008). Par contre, il est à noter que le risque d'infections est augmenté chez les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde comparativement à la population générale, nonobstant le type de traitement que ces personnes reçoivent (Doran *et al.*, 2002).

L'administration de méthotrexate est associée, à de l'hépatotoxicité ainsi qu'à des fonctions hépatiques, hématopoïétiques, et rénales diminuées (K. Visser *et al.*, 2009, Wiela-Hojenska *et al.*, 2004). Un risque plus élevé d'infections pulmonaires est également associé à ce traitement

(Sathi *et al.*, 2012). Malgré ces associations, le méthotrexate reste considéré comme étant le traitement le plus sécuritaire (Pincus *et al.*, 2013).

Le leflunomide est associé à des effets secondaires similaires à ceux du méthotrexate (Osiri *et al.*, 2003). L'hydroxychloroquine est associée à du dommage significatif à la rétine et pouvant mener à la cécité (Marmor *et al.*, 2011). La sulfasalazine est associée à un faible risque de leucopénie (Jick *et al.*, 1995). Les patients traités avec les DMARDs synthétiques rapportent fréquemment de la nausée et des troubles gastrointestinaux.

5.3.7 Effets secondaires des bDMARDs

Les agents biologiques inhibiteurs du TNF sont associés à une réduction importante de la capacité du système immunitaire à monter une réponse contre les infections, puisque le TNF est une protéine de signalisation importante pour la réponse immunitaire (Bongartz *et al.*, 2006). Le risque de développer la tuberculose (infection par *Mycobacterium tuberculosis*) est augmenté chez les patients traités avec des agents biologiques inhibiteurs du TNF, ainsi que le risque de réactivation d'une infection par *M. tuberculosis* dormante (Carmona *et al.*, 2005, Gomez-Reino *et al.*, 2003). Cette tendance se maintient pour d'autres infections, incluant l'hépatite B et le zona (réactivation d'une infection par le virus varicelle-zona) (Eric M Ruderman, 2012a). Plusieurs études ont été effectuées portant sur le risque plus élevé de développer des lymphomes pour les patients traités avec des agents biologiques anti-TNF, mais la conclusion générale semble être que cette augmentation est associée à la maladie elle-même, et non au traitement anti-TNF (Baecklund *et al.*, 2006, Setoguchi *et al.*, 2006).

Le traitement par inhibiteur de l'IL-1 anankira est associé à une augmentation moyenne du risque d'infections (Salliot *et al.*, 2009). Le traitement par l'inhibiteur du récepteur de l'IL-6 tocilizumab est associé à un risque de perforations gastrointestinales, qui peuvent être fatales (Gout *et al.*, 2011). Le traitement par le modulateur de costimulation des lymphocytes T abatacept est associé à un risque plus élevé d'infections pulmonaires (M Weinblatt *et al.*, 2006). Le traitement par le rituximab n'a pas été associé à un risque plus élevé d'infections opportunistes ou de cancer jusqu'à présent (Jasvinder A Singh *et al.*, 2011b).

Malgré les associations avec des effets secondaires graves, le traitement de l'arthrite rhumatoïde à l'aide d'agents biologiques est généralement considéré sécuritaire chez les patients n'ayant pas de contre-indications, particulièrement si l'on tient compte de leur efficacité pour modifier le cours de la maladie.

CHAPITRE 2: Single-nucleotide polymorphism (SNP) alleles in IL4R, IL4 promoter and CD40, and HLA-DR alleles, provide insight into progression of structural damage and joint function, and likelihood of remission in patients with early immune-mediated inflammatory arthritis

6 Contributions des auteurs

6.1 Auteurs

Gabrielle Sauvageau, étudiante à la maîtrise en virologie et immunologie, INRS-Institut Armand-Frappier

Nathalie Carrier, biostatisticienne de l'équipe de rhumatologie, Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke

Gilles Boire, professeur au Département de médecine - Service de rhumatologie, Université de Sherbrooke

Claude Daniel, directeur de recherche, INRS-Institut Armand-Frappier

6.2 Contributions des auteurs

Les expériences contribuant au développement de cet article, incluant le développement de la méthode ASPE, ont été effectuées par Gabrielle Sauvageau, à l'exception des expériences ayant fait partie du projet-pilote. Les analyses statistiques ont été effectuées en collaboration avec Nathalie Carrier. L'article a été rédigé par Gabrielle Sauvageau, en collaboration avec Claude Daniel et Gilles Boire. Le directeur de recherche Claude Daniel a supervisé l'avancement de ce projet.

7 Résumé de l'article

Titre en français: Des allèles de polymorphismes nucléotidiques (SNP) dans IL4R, le promoteur d'IL4 et CD40, et allèles HLA-DR, donnent un aperçu de la progression du dommage

structural, de la fonction articulaire, et de la probabilité de rémission chez les patients atteints de polyarthrite inflammatoire d'installation récente

Notre projet vise à identifier un ensemble de biomarqueurs fiables permettant aux cliniciens de prédire l'évolution de la maladie dans l'optique de mieux cibler les traitements aux patients individuels atteints de polyarthrite inflammatoire d'inflammation récente. Spécifiquement, nous cherchions à déterminer si des allèles de polymorphismes nucléotidiques (SNP) dans les gènes de l'IL 4 et de son récepteur et du corécepteur CD40, ainsi que certains allèles HLA-DR, sont associés à des issues particulières de la maladie. Notre étude portait sur les patients de la cohorte EUPA (Early Undifferentiated PolyArthritis), qui étaient suivis à intervalle prédéterminés pendant 5 ans par un groupe de rhumatologues selon des protocoles uniformisés et traités en visant la rémission. Un score de dommage radiographique total et d'érosions osseuse a été accordé à des radiographies des mains et des pieds selon la méthode Sharp/van der Heijde (dommage significatif: ≥ 5). Les polymorphismes nucléotidiques ont été génotypés par une technique d'extension d'amorce spécifique de l'allèle et en utilisant l'instrument Luminex LX100. Les allèles HLA-DR ont été typés en basse résolution via la méthode LABType rSSP (instrument Luminex LX100) et en haute résolution via la méthode DRB1 SSP UniTray (PCR). Les issues de la maladie d'intérêt pour cette étude étaient les scores de dommage articulaire total (SvH ≥ 5) et érosif (érosions ≥ 5), l'incapacité fonctionnelle (score Modified Health Assessment Questionnaire (M-HAQ) $\geq 1,0$) et la rémission selon le score d'activité de la maladie (Simplified disease activity index (SDAI) $\leq 3,3$). Les corrélations avec les issues catégoriques ont été obtenues via l'équation d'estimation généralisée (GEE) avec mesures répétées pendant 60 mois; les résultats sont présentés avec le risque relatif (RR) et l'intervalle de confiance de 95%. Les corrélations avec des mesures continues ont été obtenues via le modèle linéaire général (GLM). Nous avons démontré que l'allèle atypique G au polymorphisme rs1801275 (IL4R) est associé de manière significative avec une réduction du dommage radiographique, que l'allèle atypique T aux polymorphismes rs2243250 et rs2070874 (IL4) est associé significativement à une augmentation du dommage érosif et à une capacité fonctionnelle réduite, que l'allèle T au polymorphisme rs1883832 (CD40) est associé à une capacité fonctionnelle réduite, et que l'allèle T au polymorphisme rs4810485 (CD40) est associé à une probabilité plus élevée de rémission. Nous avons également démontré que les allèles HLA contenant l'épitope protecteur DERA est associé de manière significative à une réduction du dommage érosif et à une probabilité augmentée de rémission. Finalement, nous avons

démontré que la combinaison de deux biomarqueurs, IL4 C/C et DERA, est associée à du dommage érosif réduit et à une probabilité accrue de rémission, et ce, de manière plus significative que chaque marqueur individuel. Pour conclure, le génotypage de certains polymorphismes au niveau d'IL4R, IL4 et CD40, ainsi que des allèles HLA-DR des patients de la cohorte EUPA, identifie des biomarqueurs immunogénétiques permettant de prédire la progression de la polyarthrite rhumatoïde d'installation récente chez les patients individuels, et ainsi de mieux personnaliser les traitements administrés.

8 Article tel que soumis

Single nucleotide polymorphism (SNP) alleles in the IL-4 receptor, IL-4, and CD40 loci and outcome prediction in patients with early immune-mediated inflammatory polyarthritis

Gabrielle Sauvageau¹, Nathalie Carrier², Gilles Boire³, Claude Daniel¹

1 INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

2 Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

3 Université de Sherbrooke, Québec, Canada

8.1 Abstract

The aim of this project was to identify a set of reliable biomarkers which would allow clinicians to predict disease evolution, in order to better target treatment to individual recent-onset polyarthritis patients. Specifically, we aimed to determine whether alleles of single nucleotide polymorphisms in the interleukin-4, IL4 receptor, and CD40 genes, as well as certain HLA-DR alleles, were associated with specific disease outcomes. The subjects of our study were patients from the Early Undifferentiated PolyArthritis (EUPA) cohort, who were followed regularly over five years by a team of rheumatologists, using standardized protocols and treating towards remission. A Sharp/van der Heijde total damage and bone erosion score was given to radiographs of hands and feet (SDD, *smallest detectable difference*): ≥ 5 . Single nucleotide polymorphisms were genotyped using an allele-specific primer extension method, and the Luminex LX100 instrument was used for readings. HLA-DR alleles were genotyped in low resolution using the LABType rSSO PCR-based method (Luminex LX100 instrument for readings), and in high resolution using the DRB1 SSP UniTray PCR-based method. The

disease outcomes of interest were the total radiographic damage (SvH ≥ 5) and erosion Sharp/van der Heijde score (Erosions ≥ 5), functional incapacity (Modified Health Assessment Questionnaire (M-HAQ) score ≥ 1.0), and remission as defined by the Simplified disease activity index score (SDAI) ≤ 3.3). Correlations with binary outcomes were obtained via the generalized estimating equation (GEE) with repeated measures over 60 months; results are presented with relative risk (RR) and 95% confidence interval. Correlations with continuous measures were obtained via the general linear model (GLM). We show that the minor G allele at rs1801275 (IL4R) is associated with reduced radiographic damage, that the minor T allele at rs2243250/rs2070874 (IL4) is associated with increased erosive damage and decreased joint function, that the minor T allele at rs1883832 (CD40) is associated with decreased joint function, and that the minor T allele at rs4810485 (CD40) is associated with an increased likelihood of reaching clinical remission with treatment. We also show that the HLA-DR alleles containing the DERA protective epitope are significantly associated with reduced erosive damage and an increased likelihood of remission. Combining the DERA-containing HLA-DR alleles and the major IL4 C/C genotype further increased predictive power. To conclude, the genotyping of certain SNPs in IL4R, IL4 and CD40, as well as the HLA-DR alleles of patients of the EUPA cohort, provides a set of immunogenetic biomarkers which helps to predict disease progression in individual recent-onset polyarthritis, which in turn will help personalize administered treatments.

8.2 Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a common autoimmune disease characterized by persistent inflammation of the synovial membrane, leading to radiographic damage in the form of joint space narrowing and bone erosion, as well as loss of function (Firestein, 2003). The current recommended therapeutic approach for rheumatoid approach is aggressive therapy with disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) soon after the patient is diagnosed (J. A. Singh *et al.*, 2012, Smolen *et al.*, 2014a). This treatment strategy has been shown to foster decreased permanent joint damage and lower disease activity in RA patients (Bukhari *et al.*, 2003). DMARDs influence the course of the disease by interfering with the underlying processes that lead to radiographic damage (Kirwan *et al.*, 1983, Smolen *et al.*, 2015, V Wright *et al.*, 1980b). However, they are associated with severe side-effects (J. A. Singh *et al.*, 2011a), as

well as being costly; hence, their usage is only advisable in the cases where the predicted benefits outweigh the risks of side-effects.

The specific diagnosis of RA as opposed to other inflammatory arthritides is difficult to establish in the early stages of the disease, as the defining characteristics of RA tend to appear at later stages (Dixon *et al.*, 2005, Henk Visser, 2005). Because of this, as well as the aforementioned disadvantages associated with DMARD treatment, clinicians often adopt a watch-and-see approach to treatment, in order to reduce unnecessary exposure to aggressive therapy. The persistent synovial inflammation that characterizes the early stages of RA eventually leads to pannus formation at later stages, leading to irreversible joint destruction. Early aggressive DMARD therapy can help retard or altogether prevent this process; however, once the pannus is established the destruction processes may progress regardless of treatment, hence the notion of a therapeutic window of opportunity in RA (Kahlenberg *et al.*, 2011, O'Dell, 2002, Quinn *et al.*, 2003).

Clinicians are still lacking reliable independent biomarkers that would allow them to predict disease progression in individual patients, in order to target personalized, cost-effective treatments. These markers would facilitate the identification of which patients are more likely to develop destructive disease and would benefit from aggressive therapy, as well as which patients would tend towards remission and may be spared the unnecessary side-effects of DMARD treatment. Prognostic markers in use include HLA-DR alleles and presence of RA-specific autoantibodies such as the anti-Sa system (Boire *et al.*, 2005, Choy *et al.*, 1995, Thomson *et al.*, 1999, van Boekel *et al.*, 2002, Van Jaarsveld *et al.*, 1998, Weyand *et al.*, 1992).

The association between RA and HLA-DR alleles has previously been documented. HLA-DR alleles featuring the highly conserved QKRAA/QRRRAA/RRRAA shared epitope in the third hypervariable region of HLA-DRB1 (Gregersen *et al.*, 1987) are associated with both increased susceptibility to RA, and with more severe disease in established RA (De Almeida *et al.*, 2010). Another amino acid sequence at the same positions, DERA, has been deemed the RA protective epitope, and is associated with decreased joint damage and increased clinical remission (Carrier *et al.*, 2009). RA-associated autoantibodies include the rheumatoid factor (RF), anti-citrullinated protein antibodies (ACPA), including anti-cyclic citrullinated peptide antibodies (anti-CCP), and anti-citrullinated vimentin antibodies (anti-Sa) (van Boekel *et al.*, 2002). The presence of anti-Sa antibodies has been identified as a predictor of poor disease outcomes (Boire *et al.*, 2005).

Polymorphisms in several immune regulation-related genes have been associated with certain RA outcomes. Interleukin-4 (IL-4) is a cytokine whose anti-inflammatory effects stem from its activation of macrophages into M2 cells (Mia *et al.*, 2014). Polymorphisms in this gene's 5'-UTR, as well as in the coding portion of this cytokine's receptor (IL-4R), have been associated with RA susceptibility and severity (Krabben *et al.*, 2013). CD40 is a coreceptor expressed on antigen-presenting cells (APCs) that is required for their activation. Polymorphisms in noncoding regions of CD40 have been associated with RA severity (Van Der Linden *et al.*, 2009). Other genes containing polymorphisms that have been associated with disease severity include PTPN22 (Begovich *et al.*, 2004), as well as TNF- α , IL-1, IL-6, and IL-10 (Rego-Perez *et al.*, 2008).

Our study aimed to determine whether single-nucleotide polymorphism (SNP) alleles in the IL4/IL4R and CD40 genes, as well as HLA-DR alleles, are associated with specific disease outcomes.

8.3 Patients and Methods

8.3.1 Patient cohort

The EUPA (Early Undifferentiated PolyArthritis) patient cohort followed in this study has been previously described (Boire *et al.*, 2005, Carrier *et al.*, 2009, Carrier *et al.*, 2016, Challener *et al.*, 2016, Dobkin *et al.*, 2013, Guzian *et al.*, 2010, Jones *et al.*, 2014, Leblanc-Trudeau *et al.*, 2015, Maksymowych *et al.*, 2015). Briefly, consenting consecutive adult patients with synovitis in at least three joints for 1-12 months, being evaluated at the CIUSSS de l'Estrie - CHUS were regularly followed up by rheumatologists and treated toward remission using the current approach of aggressive treatment with DMARDs early after diagnosis. The exclusion criteria for this cohort included incorrect disease duration, an insufficient number of joints affected by synovitis, arthritis symptoms associated with crystals or an infection, severe comorbidity affecting life expectancy or functional incapacity, and non-consent. Clinicians were blinded to the patients' HLA-DR alleles, anti-Sa, etc., status. Characteristics of the patients at inclusion are presented in Table 5a.

8.3.2 Disease variables and predefined outcomes

The disease variables assessed in this study were previously described in (Carrier *et al.*, 2009) and (Boire *et al.*, 2005). Briefly, demographics, tender and swollen joint counts, erythrocyte sedimentation rate (ESR), radiographs scored according to the Sharp/van der Heijde method by two evaluators (Van der Heijde, 1999), response to the Modified Health-Assessment Questionnaire (M-HAQ), and autoantibody levels, among other clinical measures, were obtained at inclusion and at each follow-up visit. Genomic DNA was obtained from whole blood samples collected at inclusion and/or at follow-up visits. Disease activity was scored according to multiple indices, including the Simplified Disease Activity Index (SDAI). Characteristics of the patients at inclusion and at the 18, 30, 42, and 60 month follow-up visits, are presented in Table 5b.

Erosive disease was defined as a score of 5 or higher on the erosive component of the Sharp/van der Heijde scale. Functional incapacity was defined as a score of 1.0 or higher on the M-HAQ. Remission per the SDAI was defined as a score of 3.3 or higher.

8.3.3 SNP Genotyping

PCR primers were designed using the Primer3 online tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Allele-specific primer extension primers were designed using the PrimerPlex online tool (<http://www.premierbiosoft.com/primerplex/>). Oligonucleotides were obtained from Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/site>). Genomic DNA was extracted from 2.5 mL of EDTA-treated whole blood using the Wizard DNA kit from Promega (Madison, WI, USA). PCR was performed using the standard protocol for Platinum Taq DNA Polymerase, adjusting the annealing time and temperature according to the gene of interest. The PCR program for IL4R, IL4, and PTPN22 amplification was a 15-minute holding period at 95°C, followed by 35 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 63°C, and 30 seconds at 72°C. The PCR program for CD40 amplification was a 15-minute holding period at 95°C, followed by 30 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 67°C, and 1 minute 12 seconds at 72°C, with one final elongation period of 10 minutes at 72°C. PCR products were kept at 4°C until they were used in the subsequent ASPE reactions. The allele-specific primer extension reaction was performed according to the Applied Cytometry Standard No-Wash ASPE Protocol (http://www.appliedcytometry.com/Sample_Protocols/FlexMAP_beads/FlexMAP_ASPE_Protoc

ol.pdf). The ASPE reaction products were hybridized to MagPlex-TAG microspheres from Luminex (Austin, TX, USA) following the previous protocol. The hybridized ASPE products were analyzed at 37°C on the Luminex 100 instrument and using the xPONENT software (<https://www.luminexcorp.com/research/instruments/luminex-100200/>, <https://www.luminexcorp.com/research/instruments/xponent/>, <https://www.luminexcorp.com/research/reagents-and-accessories/magplex-tag-microspheres/>). Genotype discrimination was obtained using the MFI ratio between the signal of the normal allele and that of the mutant allele (Pastinen *et al.*, 2000). DNA samples where the SNPs of interest had previously been genotyped using qPCR or enzymatic digestion (BsmI) were used as controls for the genotyping of rs1801275, rs2243250 and rs2070874. Controls for the genotyping of rs1883832 and rs4810485 were obtained by site-directed mutagenesis using the Q5 kit from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) and the NEBaseChanger online tool (<https://www.neb.com/products/e0554-q5-site-directed-mutagenesis-kit>) and the PCR Cloning Kit from QIAGEN (Mississauga, ON); the sequence of the mutant controls was confirmed by sequencing at the McGill University and Genome Quebec Innovation Centre (<http://gqinnovationcenter.com/index.aspx>). Allelic distribution of the SNPs is presented in Table 6a.

8.3.4 HLA-DR typing

Genomic DNA was obtained using the techniques described in “SNP Genotyping”. Low-resolution HLA-DRB1 typing was performed using the LABType sequence-specific oligonucleotides (SSO)—based Luminex method (<https://www.onelambda.com/en/product/labtype-ss0.html>). High-resolution HLA-DRB1 typing was performed using the Class II High Resolution SSP UniTray Kits from One Lambda/ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). The following alleles were considered as containing the shared epitope (SE): DRB1*01:01, *01:02, *01:05, *04:04, *04:05, *04:08, *14:02, *04:01, *04:09, *10:01. The following alleles were considered as containing the DERA protective epitope: DRB1*01:03, *04:02, *11:02, *11:03, *13:01, *13:02. Allelic distribution of the HLA-DR alleles is presented in Table 6b.

8.3.5 Statistical analysis

Descriptive analyses were performed. Categorical variables were presented as frequency and percentage. Continuous variables normally distributed were presented with means and standard deviation, otherwise median (interquartile range (IQR) or 25th-75th percentiles) were used. The general linear models (GLM) and generalized estimating equations (GEE) with repeated measures were used to compare evolution of continuous and categorical outcomes respectively over five years. GLM were used to evaluate the effect of the different SNP and HLA-DR alleles on continuous joint damage (total (SvH) or erosive (Erosion)), functional incapacity (M-HAQ), and disease activity (SDAI) over time. GEE were used to estimate the relative risk (RR) of attaining the categorical outcomes of interest for this study related to joint damage (total (SvH ≥ 5) or erosive (Erosion ≥ 5)), functional incapacity (M-HAQ ≥ 1.0), or clinical remission (SDAI ≤ 3.3) according to patients' SNP and HLA-DR alleles; GEE results are presented with 95% confidence intervals (CI). SPSS version 23.0 software was used to describe quantitative and categorical variables. SAS version 9.3 software was used to perform GLM and GEE analyses. GraphPad Prism version 6.00 software was used for the graphical representations. The traditional threshold of statistical significance ($p < 0.05$) was used. A p value < 0.1 but > 0.05 denoted a tendency, while p values of < 0.01 and < 0.001 were considered very and highly significant respectively.

8.4 Results

8.4.1 Characteristics of the patients of the cohort at inclusion and follow-up visits

Patient characteristics at inclusion and during 5 years of follow-up are presented in Table 5. At inclusion, 90.8% of the patients fulfilled either the 1987 or 2010 ACR criteria for RA. 35.3%, 19.2%, and 38.9% were positive for anti-CCP-2, anti-Sa, and RF, respectively. The medians of both Sharp/van der Heijde total and erosive scores were low at baseline (3 and 1, respectively), and slowly increased over time, reflecting the progressive and destructive nature of the disease. Functional incapacity was highest during the early stages of the disease and improved over time, as patients received effective treatment and adapted their daily activities. Disease activity as defined by the SDAI also followed this pattern, with a high median and IQR for SDAI score at

inclusion and much lower values at follow-up visits, as well as a steadily increasing proportion of patients in remission (SDAI \leq 3.3) over time.

8.4.2 Results from a pilot study using multicytokine assays

A preliminary study using the Pel-Freez Cytokine Genotyping Kit (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/7892010>) was conducted on a smaller group of EUPA patients (sample size: 102 patients). The Pel-Freez Cytokine Genotyping Kit uses a standard SSP technique, in which primers that match the matrix sequence in their 3'-end lead to amplification, while mismatched primers do not (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/2953_SSP%20Flyer.pdf). Following gel electrophoresis of PCR products, positive lanes are compared to a worksheet (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/sspunitrays/1437_Cytokine00106986wrksht.pdf), which defines the results of the assay.

Selected polymorphisms in the PTPN22, IL α , IL1 β , IL1R, IL1RA, IL4R α , IL12, IFN γ , TGF β , TNF α , IL2, IL4, IL6, and IL10 genes, were genotyped for these patients. These polymorphisms were mostly located in the promoter region of the genes of interests, and had previously been hypothesized to be functionally and clinically relevant in immunity-related contexts. The disease outcomes of interest for this pilot experiment were the presence of RA-associated antibodies, disease severity, erosions, disease persistence, steroid treatment, and fulfilling of the ACR criteria for RA.

Of these, only the results concerning two of the polymorphisms in the IL4 promoter region, rs2243250 and rs2070874, as well as the polymorphism in IL4R α , rs4810485, were promising. The minor (T) allele at the IL4 promoter SNPs was significantly associated with severe disease at 30 months after inclusion. The minor (G) allele at the polymorphism in IL4R α was significantly associated with fulfillment of the ACR criteria for RA, as well as with the presence of anti-CCP antibodies.

These polymorphisms were then genotyped for a larger group of patients (up to 313 patients) using qPCR and enzymatic digestion by *Bsmal*, in a second phase of this study. Similar results were obtained for the two IL4 promoter SNPs, which were both found to be associated with increased disease severity. A trend towards increased erosive damage was also observed for patients with minor (T) alleles at these positions.

The results of this preliminary study informed the focus of our larger-scale study on the IL4R α and IL4 promoter SNPs (Lancaster *et al.*, 2004, Leon *et al.*, 2011).

8.4.3 Distribution of SNP and HLA-DR alleles among patients in the EUPA cohort

The allelic distributions of the SNPs of interest and of the HLA-DR in our patients are presented in Table 6. A (G) allele at rs1801275 (IL4R) was detected in 41.0% (272/662) of patients, with only 32 (4.8%) having the G/G genotype. A (T) allele at rs2243250 (IL4) was detected in 28.4% (188/662) of patients, with only 16 (2.4%) having the T/T genotype. The two SNPs tested in IL4, rs2243250 and rs2070874, were highly correlated ($r^2=0.99$), so only rs2243250 is presented. A (T) allele at rs1883832 (CD40) was detected in 42.8% (239/559) of patients, with 104 (18.6%) having the T/T genotype. A (T) allele at rs4810485 (CD40) was detected in 42.4% (237/559) of patients, with 105 (18.8%) having the T/T genotype.

The alleles identified as containing the shared epitope and the DERA protective epitope are listed in the 8.3 Patients and Methods section. At least one allele featuring the shared epitope was detected in 44.6% (274/615) of patients, with 53 (8.6%) having two shared epitope alleles. At least one allele of the DERA protective epitope was detected in 26.8% (165/615) of patients, with only 14 (2.3%) having two DERA alleles. The results of the general linear model and generalized estimating equation, which are discussed below, are presented in Tables 7 and 8.

8.4.4 Correlation of the (G) allele at rs1801275 (IL4R) with radiographic damage

The (G) allele at rs1801275 (IL4R) was associated with increased radiographic damage as measured by the Sharp/van der Heijde score, as revealed by GLM analysis with repeated measures over 5 years (Estimate (SE), 0.035 (0.017), $p=0.043$). A trend towards an increased Sharp/van der Heijde score was also discovered using GLM, combining the heterozygous and minor homozygous (A/G and G/G) genotypes (0.041 (0.021), $p=0.051$), as well as a trend towards an higher Erosion score with A/G and G/G both distinct (0.029 (0.016), $p=0.067$) and combined (0.031 (0.019), $p=0.095$). There was no evidence of correlation between alleles at rs1801275 (IL4R) and subsequent functional incapacity, disease activity or remission.

8.4.5 Correlation of the (T) allele at rs2243250 (IL4) with subsequent radiographic damage, functional incapacity, and disease activity

The GLM analysis revealed that a (T) allele at rs2243250 and rs2070874 (IL4) was significantly associated with an increased Sharp/van der Heijde score, both with C/C, C/T and T/T as distinct genotypes (0.079 (0.020), $p < 0.001$), and with C/T and T/T combined (0.088 (0.023), $p < 0.001$). The GEE analysis with repeated measures over 5 years also revealed a significant association when combining the C/T and T/T genotypes (RR (95% CI): 1.17 (1.02-1.35), $p = 0.030$), though this association was only on the verge of significance when analysing the heterozygous and minor homozygous genotypes separately (1.16 (1.00-1.34), $p = 0.054$ and 1.35 (0.95-1.92), $p = 0.099$, respectively).

GLM analysis revealed that a (T) allele at the two SNPs in IL4 is also associated with an increased Erosion score, again with each distinct genotypes (0.072 (0.018), $p < 0.001$) and combining the heterozygous and minor homozygous alleles (0.080 (0.021), $p < 0.001$). GEE analysis revealed that this significant association was maintained for the heterozygous C/T genotype (1.25 (1.00-1.55), $p = 0.0485$) and when combining C/T and T/T (1.26 (1.02-1.55), $p = 0.0344$); the association for T/T alone did not reach statistical significance.

The (T) allele at the two SNPs in IL4 was also associated with an increased score on the Modified Health Assessment questionnaire (M-HAQ), which evaluates the patients' difficulties encountered during daily activities; the association was statistically significant both with the three possible genotypes analysed separately (0.016 (0.006), $p = 0.008$), and with the C/T and T/T genotypes combined (0.017 (0.006), $p = 0.007$). The GEE revealed similarly significant results when combining the C/T and T/T alleles (1.25 (1.00-1.55), $p = 0.0479$).

A trend was determined between the (T) allele at the SNPs in IL4 and higher subsequent disease activity as measured by the Simplified disease activity index (SDAI) (0.032 (0.019, $p = 0.092$). This association was also highlighted by the GEE analysis for the T/T genotype (0.040 (0.017-0.090, $p = 0.0277$), indicating a decreased likelihood of reaching clinical remission for patients with this genotype.

The percentages of patients with the C/C genotype and the patients with the C/T or T/T genotype who presented with erosive disease, as defined by an erosion score of 5 or higher, at inclusion and at follow-up visits, are illustrated in Figure 1 (a), while the percentages of patients

from these groups who presented with incapacitating disease at the same time points is illustrated in Figure 1 (b).

8.4.6 Correlation of the (T) allele at rs1883832 (CD40) with functional incapacity

The GLM revealed a significant (0.015 (0.006), $p=0.016$) association between a (T) allele at rs1883832 (CD40) and decreased function as measured by the M-HAQ, when combining the C/T and T/T genotypes into one group. Similar significant results are obtained using the GEE for the C/T genotype (1.39 (1.08-1.79), $p=0.0094$), as well as a trend when combining the heterozygous and minor homozygous genotypes. No correlation was found with disease activity, remission or radiographic damage (Tables 7-8).

8.4.7 Correlation of the (T) allele at rs4810485 (CD40) with disease activity and likelihood of clinical remission

A (T) allele at rs4810485 in CD40 was shown by the GLM to trend towards decreased disease activity (-0.025 (0.013), $p=0.053$). However, using the GEE yielded a highly significant association between the T/T genotype and clinical remission as defined by an SDAI score ≤ 3.3 (1.36 (1.13-1.64), $p<0.001$). No correlation was found with joint damage or functional incapacity.

8.4.8 Correlation of the shared epitope with radiographic damage and disease activity

Patients with at least one HLA-DR allele containing the shared epitope trended to suffer increased erosive damage, as demonstrated by the GLM (0.048 (0.027), $p=0.084$). The generalized estimating equation also indicated that patients with two shared epitope alleles trended towards a decreased likelihood of reaching clinical remission (0.70 (0.47-1.04), $p=0.0783$).

8.4.9 Correlation of the DERAA shared epitope on radiographic damage, functional incapacity, and disease activity

The GLM revealed that patients with one or both HLA-DR alleles containing the DERAA protective epitope suffered reduced radiographic damaged as measured by the Sharp/van der Heijde method (-0.198 (0.059), $p < 0.001$ and -0.222 (0.063), $p < 0.001$, respectively), as well as measured by their Erosion score (-0.170 (0.052), $p = 0.001$ and -0.196 (0.056), $p < 0.001$, respectively). GEE analysis revealed similar highly significant associations, in which patients with at least one copy of the DERAA protective epitope suffered decreased erosive damage (0.77 (0.59-0.99), $p < 0.05$).

Patients with at least one copy of the DERAA protective allele experienced less limitation of their daily activities, as indicated by overall reduced M-HAQ scores (0.063 (0.90-1.17), $p < 0.05$).

The GEE revealed that patients with at least one copy of the DERAA protective epitope trended to reach clinical remission as defined by the SDAI (1.19 (1.01-1.40), $p = 0,0434$). A highly significant association with clinical remission was observed for patients who had two copies of the DERAA protective epitope (2.42 (1.74-3.38), $p < 0.001$), though it should be noted that only 2.3% (14/615) of our patients met these criteria.

The percentages of DERAA-negative and positive patients who presented with erosive disease at inclusion and at follow-up visits, are illustrated in Figure 1 (c), while the percentages of patients from these groups who had reached a state of clinical remission following treatment at the same time points is illustrated in Figure 1 (d).

8.4.10 Effects of combined biomarkers

GEE analyses were also conducted on subgroups of patients with combined biomarkers. Among these, the most interesting combination was observed in patients who were positive for the DERAA protective epitope and had the major C/C genotype at the polymorphisms in the IL4 promoter. This subgroup, which comprised of 128 patients, showed a highly significant association with reduced erosive damage (0.67 (0.51-0.90), $p = 0.007$), as well as a significantly increased likelihood of reaching clinical remission with treatment (1.21 (1.02-1.44), $p = 0.032$). A trend very near the threshold of statistical significance was also observed towards a M-HAQ

score below 1.0 (0.75 (0.56-1.00), $p=0.051$). The association of the combined biomarkers with these outcomes was stronger than that of each marker alone (Table 9).

Another subgroup of patients that yielded interesting result was that of the 91 patients in our cohort who were positive for the DERA protective epitope and had the major A/A genotype at the polymorphism in IL4R. For these patients, a significant association was observed with reduced erosive damage (0.69 (0.50-0.96), $p=0.027$), as well as a significantly increased likelihood of remission (1.24 (1.03-1.50), $p=0.027$). No association was found relating to M-HAQ score. Again, the association of the combined biomarkers with the selected outcomes were stronger than that of each marker individually, though to a slightly lesser degree than the previous (DERA -/+ or +/+ and IL4 C/C) combination.

The combination of the C/C genotype at the IL4 SNPs and the A/A genotype at the SNP in IL4R, which was observed in 277 patients, was significantly associated with reduced erosive damage (0.80 (0.65-0.99), $p=0.040$); however this association was not stronger than for either biomarker individually. No association was observed relating to M-HAQ score or likelihood of SDAI remission.

For the 87 patients who were positive for DERA and had the major C/C genotype at the rs1883832 polymorphism in CD40, a significant association was found with an decreased M-HAQ score (0.68 (0.46-0.98), $p=0.040$). This association was stronger for the combined biomarkers than that for each biomarker individually. A trend was also observed for the patient subgroup with both biomarkers towards an increased likelihood of remission, though this association was weaker than that of the DERA-positive marker alone. No association was found with erosive damage, while the DERA-positive marker alone was strongly associated with decreased erosive damage.

In a yet smaller subgroup of 26 patients, who were DERA-positive and had the minor T/T genotype at rs1883832 in CD40, a significant association was found with reduced erosive damage (0.32 (0.12-0.88), $p=0.026$). This association was stronger than that of either biomarker individually. However it should be noted that this group represented only 4.7% of our cohort. No association was found for that group relating to M-HAQ or SDAI scores, while the DERA-positive marker alone yielded a trend towards a decreased M-HAQ score, and a significant association with SDAI remission.

In a subgroup of 89 patients who were DERA-positive and had the major G/G genotype at the rs4810845 SNP in CD40, a significant association with a lower M-HAQ score (0.69 (0.48-0.99),

p=0.045). This association was stronger than that for either biomarker individually. No association was observed between these combined biomarkers and erosive damage or likelihood of remission, though the DERAA-positive marker alone was significantly associated with both.

In a yet smaller subgroup of 25 patients who were DERAA-positive and had the minor T/T genotype at rs4810485, a significant association was observed with decreased erosive damage (0.43 (0.18-0.99), p=0.048) and with an increased likelihood of remission (1.39 (1.02-1.88), p=0.035). These associations were stronger than those of each individual biomarker. However, it should be noted that this subgroup represented only 4.5% of EUPA patients. No association was found relating to functional incapacity; however the DERAA-positive marker alone showed a trend toward a lower M-HAQ score.

The percentages of patients who were positive and negative for both of these biomarkers who presented with erosive disease at inclusion and at follow-up visits, are illustrated in Figure 1: Effect of polymorphism alleles in the IL4 promoter on (a) erosive damage and (b) functional incapacity; Effect of DERAA status on (c) erosive damage and (d) likelihood of remission; Effect of combined IL4 and DERAA status on (e) erosive damage and (f) likelihood of remission., while the percentages of patients from these groups who had reached a state of clinical remission following treatment at the same time points is illustrated in Figure 1 (d).

8.5 Discussion and conclusion

This study shows that certain alleles at SNPs in IL4, IL4R, and CD40, HLA-DR alleles, and combinations of these biomarkers in EPA patients, can be used to help predict which patients are likely to suffer additional radiographic damage, experience increased difficulty with their daily activities, or experience clinical remission. These biomarkers may help to better target treatment to individual patients.

The minor (G) allele at rs1801275 was shown to be associated with increased structural damage. This nonsynonymous single nucleotide polymorphism occurs in a coding region of IL4R, and induces the mutation of a glutamine residue at position 551 into an arginine residue. IL4R α forms a type I receptor complex with the common γ chain and is expressed on a variety of cell types, both of hematopoietic and nonhematopoietic lineages. This receptor complex must

recruit intracellular kinases and adaptor proteins as it possesses no endogenous kinase activity. IL4R α recruits Jak-1 via a box-1 motif near the transmembrane region, which phosphorylates several tyrosine residues on the IL4R α chain, including Y550, the residue neighbouring Q551. These newly phosphorylated tyrosine residues act as binding sites for the SH2 domain of STAT6, which is in turn phosphorylated by Jaks, at which point it dissociates from the receptor complex and translocates to the cell nucleus, where it acts as a transcription factor involved in the regulation of genes associated with allergic reactions, among others (Bürgis, 2006, Takeda *et al.*, 1997). Q551R, which involves the mutation of a polar residue into a basic residue, may affect the phosphorylation of Y550 by Jak-1, which potentially affects the subsequent binding of STAT6 to the IL4R α chain and downstream actions (Kruse *et al.*, 2002). Q551R has been associated with increased risk for several autoimmune disorders, where it is postulated to lead to a decreased Th1/Th2 ratio, which may promote B cell-mediated autoimmunity (Ram Raj Singh, 2003). It has been suggested that Q551R may promote or enhance STAT6 signaling, which leads to a gain of function by maintaining STAT6 in a phosphorylated state (Al-Muhsen *et al.*, 2014). The role of Q551R in rheumatoid arthritis susceptibility and severity has previously been investigated, with inconclusive and sometimes contradictory results (Burgos *et al.*, 2010, Marinou *et al.*, 2008, Prots *et al.*, 2006). These results revealed a significant association between a (G) allele at rs1801275 and increased radiographic damage, suggesting a pervasive state of inflammation leading to joint-space narrowing and erosions, possibly caused by poor regulatory function. Further studies would be beneficial to investigate the role of the Q551R mutation on the function of IL4R.

A minor (T) allele at both polymorphisms of interest in IL4, rs2243250 and 2070874 was shown to be associated with increased radiographic damage, increased functional disability, and increased disease activity. Both of these polymorphisms are noncoding, and are situated in the 5'-UTR of the IL4 gene. SNPs in noncoding regions may modulate gene expression, typically by affecting transcription factor binding, gene splicing, or noncoding RNA sequence. The precise role of IL4 in RA pathogenesis has not been identified, however it has been postulated that an increased proportion of CD4⁺ T cells of the Th2 phenotype may lead to the production of autoreactive antibodies via overstimulation of B-cells and plasma cells (Krabben *et al.*, 2013). It has been found that the levels of IL4 vary greatly in RA patients depending on the stage of the disease, with increased IL4 levels at early stages of the disease, but low levels of IL4 at later stages (Raza *et al.*, 2005). IL4 has also been shown to inhibit RANK-mediated erosive damage in mice, suggesting that low levels of IL4 may be conducive to bone erosion (Tunyogi-Csapo *et al.*, 2008). The minor (T) allele at rs2243250 is situated within the contact site of the

transcription factor NFAT, and has been associated with increased promoter activity and increased disease severity (Pawlik *et al.*, 2005). This polymorphism is in linkage disequilibrium with rs2070874 (our study obtained an $r^2=0.99$), as well as with several other polymorphisms in immunity-related genes. The role of rs2070874 in radiographic damage in RA has not been elucidated. Our study revealed that patients with a (T) allele at rs2243250 and rs2070874 suffered significantly more radiographic damage, as measured by Sharp/van der Heijde score and Erosion score, making the (T) genotype an interesting biomarker for more erosive disease, therefore a good indicator of which patients would benefit from aggressive treatment. It is probable that the role of IL4 in RA is two-fold: the promotion of the Th2 phenotype at early stages may contribute to initiate B cell-mediated immunity, while the low levels of IL4 at later stages of the disease may contribute to bone erosion by reduced inhibitor activity on the RANK/RANKL pathway. Additional studies investigating the effect of the IL4 promoter on IL4 levels would be beneficial to pinpoint the exact role of this cytokine in disease severity. The (T) genotype was also associated with increased functional disability, which is likely due to increased inflammation, leading to more pain and more restriction of motion. The (T) genotype was also associated with a decreased likelihood of reaching clinical remission, which may be due to increased and more pervasive inflammation in RA joints.

A (T) allele at rs1883832 in CD40 was associated with increased functional disability. The interaction between CD40, expressed on helper T cells, and its ligand CD40L, expressed on antigen-presenting cells, is required for their activation. In B cells, CD40-CD40L binding stimulates proliferation and germinal center formation, plasmocyte differentiation, and class-switching, while in monocytes and dendritic cells it increases cytokine production (van Kooten *et al.*, 1997). Though the exact role of CD40 in RA has not yet been identified, given its role in humoral immune responses it is likely that this CD40-CD40L interaction may be involved. The rs1883832 polymorphism is situated in the 5'-UTR of the CD40 gene, within a Kozak sequence, and as such may disrupt initiation of translation of CD40 (Jacobson *et al.*, 2007). Functional disability is a major negative outcome of RA, and may be associated with higher degrees of pain and swelling. Our study found that the (T) allele at rs1883832 was associated with increased risk of functional disability, making this an interesting biomarker to help target treatment. Our study also found that the minor (T) allele at another polymorphism in CD40, rs4810485, situated within the first intron, was associated with decreased disease activity and an increased likelihood of reaching remission with treatment. This was surprising, considering that previous studies have found associations between the (T) allele at rs4810485 and increased radiographic damage (Van Der Linden *et al.*, 2009). This result was also surprising given that the two SNPs

in CD40, rs1883832 and rs4810485, were in somewhat strong linkage disequilibrium. Further studies into the role of CD40 into RA, as well as the exact function of these polymorphisms on gene expression and gene splicing, would be beneficial.

Our study found that patients possessing at least one copy of the RA shared epitope tended to experience increased radiographic damage and a decreased likelihood of remission. The implication of these HLA-DR alleles in RA susceptibility and severity has been the subject of multiple studies, with results typically indicating an association with increased radiographic damage and disease activity (Gonzalez-Gay *et al.*, 2002, Moreno *et al.*, 1996). Though the exact role of the shared epitope in RA still remains to be identified, multiple hypotheses have been proposed linking it to altered promotion of adaptive immune responses (De Almeida *et al.*, 2010). While the results our analyses yielded did not quite reach the traditional threshold of statistical significance, we still observed marked tendencies toward increased structural damage and disease severity, maintaining the shared epitope as a solid marker for more severe disease. Our study showed that patients possessing at least one copy of an HLA-DR allele containing the DERAA protective epitope experienced significantly reduced radiographic damage and functional impairment, as well as an increased likelihood of reaching clinical remission. These results are concordant with previous studies involving this cohort of patients (Carrier *et al.*, 2009). The protective effect of the DERAA protective epitope was observed both in patients with a copy of the shared epitope, and in patients without, which suggests that the protective effect of the DERAA epitope outweighs the negative associations of the shared epitope. J. van Heemst *et al.* (2015) propose that the protective role of DERAA in ACPA-positive RA may be due to the presentation by HLA-DRB1*13 (and potentially other DERAA-containing HLA-DR molecules) of peptides from DERAA-containing self protein vinculin, in the thymus, leading to a tolerization of T cell response to this antigen; in these patients, DERAA-directed T cells would be unable to help activate B cells to secrete ACPA, hence these patients would not develop ACPA-positive RA (van Heemst *et al.*, 2015). Our results, combined with those obtained previously for this cohort, confirm that early HLA-DR typing of EUPA patients is beneficial in order to target treatment, as these patients may be spared the severe side-effects of the more aggressive DMARD treatments.

The presence of at least one copy of the DERAA protective epitope, when combined with the major homozygous C/C genotype at the rs2243250/rs2070874 polymorphisms in the IL4 promoter, was associated with reduced erosive damage and a higher likelihood of reaching clinical remission with treatment, and these associations were stronger than those for each

biomarker alone. While this could be due to each of these biomarkers having individual, unrelated effects on disease progression, given that the functions of both interleukin-4 and the HLA-DR molecules are intimately linked with T cell-mediated immunity, an interaction between these resulting in a compound effect on disease progression is plausible. Further investigation into the potential interaction of the polymorphisms in the IL4 promoter, which may potentially result in differential IL4 expression and lead to an alteration in Th1/Th2 cell ratio, and the DERA protective epitope, which may inhibit autoreactive T cell activity, will be beneficial. Similarly, the compounded effect of the A/A genotype at the polymorphism in IL4R combined with the C/C genotype at the polymorphisms in IL4 on erosive damage and disease activity was stronger than the effect of each of these markers individually, albeit to a lesser degree than the previous combination. Given that the IL4R polymorphism may affect the activity of the IL4 receptor, and that the IL4 polymorphisms may affect IL4 expression, it is probable that the overall effect would be generally reduced IL4 activity, which could lead to decreased erosive damage, as well as a generally lower level of disease activity, as we observed in our study.

The strengths of this study include the large number of patients in our cohort, the long-term, regular, and exhaustive follow-ups of these patients by a team of rheumatology specialists, and the standardized treatment strategies, aimed at clinical remission, adopted for all patients. Limited genetic diversity (almost all patients were Caucasian) allows for strong immunogenetic associations for this ethnic group. To our knowledge, this study is the first of this scale to investigate the association between the disease outcomes of interest and the aforementioned potential biomarkers.

In conclusion, we were able to identify a number of significant biomarkers for disease outcomes in rheumatoid arthritis. Atypical alleles at polymorphisms in IL4, IL4R, and CD40, as well as certain HLA-DR alleles, were found to be associated with outcomes related to structural damage, functional impairment, and disease activity. We identified excellent indicators of increased erosive damage (minor (G) allele at rs1801275 in IL4R, minor (T) allele at rs2070874 and rs2243250 in IL4, HLA-DR allele containing the RA shared epitope), increased (minor (T) allele at rs1883832 in CD40) and decreased (HLA-DR allele containing the DERA protective epitope) functional impairment, and increased (minor (T) allele at rs2243250 and rs2070874 in IL4) and decreased (minor (T) allele at rs4810485 in CD40, HLA-DR allele containing the DERA protective epitope) disease activity. Further studies investigating the role of polymorphisms in other immune-related genes, such as PTPN22 and the genes of the RANK/RANKL/OPG pathway of bone erosion, will be beneficial in order to expand the repertoire

of independent immunogenetic biomarkers available to clinicians in order to better target treatment to individual RA patients.

8.6 Tables and Figures

Table 5: Selected characteristics of the cohort patients at inclusion and at follow-up visits

a	Characteristic	Inclusion				
	Female, n (%)	449 (59.9)				
	Age, mean \pm SD	59 \pm 12				
	Duration of symptoms, mean \pm SD months	4.3 \pm 2.9				
	Patients fulfilling \geq ACR criteria, n (%)	576 (81.0)				
	Antibodies					
	anti-CCP-2 positive, n (%)	254 (35.3)				
	anti-Sa positive, n (%)	137 (19.2)				
	RF positive, n (%)	282 (38.9)				
b	Characteristic	Inclusion	18 months	30 months	42 months	60 months
	Radiographic damage	n = 564	n = 525	n = 494	n = 446	n = 399
	Median (IQR) erosion score	1 (0-3)	2 (0-6)	3 (1-8)	3 (1-9)	3 (1-9)
	No (%) with erosion score \geq 5	100 (17.7)	179 (34.1)	195 (39.5)	189 (42.4)	173 (43.4)
	Functional incapacity	n=701	n=587	n=522	n=464	n=391
	Median (IQR) M-HAQ score	0.75 (0.375-1.375)	0.25 (0.00-0.625)	0.125 (0.00-0.50)	0.125 (0.00-0.50)	0.125 (0.00-0.50)
	No (%) with M-HAQ score \geq 1	304 (43.4)	66 (11.2)	55 (10.5)	59 (12.7)	50 (12.8)
	Disease activity	n=689	n=584	n=517	n=460	n=376
	Median (IQR) SDAI score	29.50 (19.50-44.25)	6.20 (2.70-12.475)	4.70 (1.90-9.80)	4.85 (1.70-9.30)	4.60 (1.50-8.995)
	No (%) with SDAI score \leq 3.3	0 (0)	172 (29.5)	210 (40.6)	182 (39.6)	157 (41.8)

Table 6: Distribution of SNPs and HLA-DR alleles in EUPA patient cohort

a	SNP	Total	n (%)
	rs1801275 (IL4R) [A;G]		
	A/A	663	391 (59.0)
	A/G		240 (36.2)
	G/G		32 (4.8)
	rs2243250/rs2070874 (IL4) [C;T]		
	C/C	662	474 (71.6)
	C/T		172 (26.0)
	T/T		16 (2.4)
	rs1883832 (CD40) [C;T]		
	C/C	559	320 (57.2)
	C/T		135 (24.2)
	T/T		104 (18.6)
	rs4810485 (CD40) [G;T]		
	G/G	559	322 (57.6)
	G/T		132 (23.6)
	T/T		105 (18.8)
b	HLA-DR	Total	n (%)
	Shared epitope		
	-/-	615	341 (55.4)
	-/+		221 (35.9)
	+/+		53 (8.6)
	DERAA protective epitope		
	-/-	615	450 (73.2)
	-/+		151 (24.6)
	+/+		14 (2.3)

Table 7: General linear model (GLM) with repeated measures over five years

SNP/HLA-DR alleles		SvH_log	Erosions_log	M-HAQ_log	SDAI_log
		Estimate (SEM)	Estimate (SEM)	Estimate (SEM)	Estimate (SEM)
rs1801275 (IL4R)	A/A, A/G, G/G	0.035 (0.017) *	0.029 (0.016) †	0.002 (0.005)	0.001 (0.016)
	A/A, (A/G or G/G)	0.041 (0.021) †	0.031 (0.019) †	0.003 (0.006)	-0.001 (0.019)
rs2243250 (IL4)	C/C, C/T, T/T	0.079 (0.020) **	0.072 (0.018) ***	0.016 (0.006) **	0.032 (0.019) †
	C/C, (C/T or T/T)	0.088 (0.023) **	0.080 (0.021) ***	0.017 (0.006) **	0.028 (0.021)
rs1883832 (CD40)	C/C, C/T, T/T	0.018 (0.014)	0.006 (0.013)	0.004 (0.004)	-0.010 (0.013)
	C/C, (C/T or T/T)	0.034 (0.022)	0.018 (0.020)	0.015 (0.006) *	0.011 (0.020)
rs4810485 (CD40)	G/G, G/T, T/T	0.010 (0.014)	-0.009 (0.013)	0.002 (0.004)	-0.025 (0.013) †
	G/G, (G/T or T/T)	0.022 (0.022)	0.006 (0.020)	0.011 (0.006) †	-0.017 (0.020)
shared epitope	-/-, -/+, +/+	0.033 (0.031)	0.048 (0.027) †	0.005 (0.007)	0.020 (0.017)
	-/-, (-/+ or +/+)	0.048 (0.041)	0.048 (0.037)	0.003 (0.009)	0.008 (0.022)
DERAA	-/-, -/+, +/+	-0.198 (0.059) **	-0.017 (0.052) **	-0.022 (0.013) †	-0.049 (0.032)
	-/-, (-/+ or +/+)	-0.222 (0.063) **	-0.196 (0.056) ***	-0.040 (0.034)	-0.040 (0.034)

† 0.1 < p < 0.05, * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Table 8: Generalized estimating equation (GEE) with repeated measures over five years

SNP/HLA-DR alleles		Sharp ≥ 5	Erosions ≥ 5	M-HAQ ≥ 1	SDAI remission
		RR (95% CI)	RR (95% CI)	RR (95% CI)	RR (95% CI)
rs1801275 (IL4R)	A/A	1	1	1	1
	A/G	1.10 (0.96-1.27)	1.11 (0.91-1.37)	1.04 (0.84-1.30)	0.96 (0.81-1.13)
	G/G	1.21 (0.92-1.59)	1.17 (0.77-1.79)	1.02 (0.61-1.71)	0.82 (0.56-1.21)
	A/G or G/G	1.12 (0.97-1.28)	1.12 (0.92-1.37)	1.04 (0.84-1.29)	0.94 (0.80-1.11)
rs2243250 (IL4)	C/C	1	1	1	1
	C/T	1.16 (1.00-1.34) †	1.25 (1.00-1.55) *	1.23 (0.98-1.54) †	1.01 (0.84-1.21)
	T/T	1.35 (0.95-1.92) †	1.37 (0.78-2.41)	1.44 (0.77-2.70)	0.40 (0.17-0.90) *
	C/T or T/T	1.17 (1.02-1.35) *	1.26 (1.02-1.55) *	1.25 (1.00-1.55) *	0.96 (0.80-1.16)
rs1883832 (CD40)	C/C	1	1	1	1
	C/T	1.02 (0.85-1.21)	1.05 (0.81-1.35)	1.39 (1.08-1.79) **	1.06 (0.86-1.30)
	T/T	1.03 (0.85-1.26)	0.98 (0.73-1.33)	0.98 (0.72-1.34)	1.17 (0.94-1.44)
	C/T or T/T	1.02 (0.88-1.19)	1.02 (0.82-1.27)	1.22 (0.98-1.52) †	1.10 (0.93-1.31)
rs4810485 (CD40)	G/G	1	1	1	1
	G/T	1.01 (0.85-1.21)	1.12 (0.87-1.43)	1.21 (0.93-1.57)	0.92 (0.73-1.16)
	T/T	0.98 (0.81-1.20)	0.90 (0.66-1.23)	1.04 (0.77-1.39)	1.36 (1.13-1.64) ***
	G/T or T/T	1.00 (0.86-1.16)	1.03 (0.83-1.28)	1.13 (0.91-1.42)	1.11 (0.94-1.32)
shared epitope	-/-	1	1	1	1
	-/+	1.09 (0.94-1.27)	1.17 (0.94-1.45)	1.15 (0.90-1.46)	1.00 (0.84-1.19)
	+/+	0.98 (0.76-1.26)	1.30 (0.96-1.77)	1.18 (0.85-1.64)	0.70 (0.47-1.04) †
	-/+ or +/+	1.07 (0.92-1.23)	1.20 (0.97-1.47)	1.16 (0.92-1.44)	0.94 (0.79-1.11)
DERAA	-/-	1	1	1	1
	-/+	0.85 (0.71-1.01) †	0.77 (0.59-0.99) *	0.79 (0.60-1.03) †	1.18 (1.00-1.40) †
	+/+	0.88 (0.50-1.55)	0.52 (0.21-1.26)	0.75 (0.35-1.63)	1.26 (0.75-2.13)
	-/+ or +/+	0.85 (0.72-1.01) †	0.75 (0.58-0.96) *	0.79 (0.61-1.02) †	1.19 (1.01-1.40) *

† 0.1 < p < 0.05, * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Table 9: Effect of combined biomarkers (GEE with repeated measures over five years)

Alleles and allele combinations	Total	n patients (%)	Erosions ≥ 5	M-HAQ ≥ 1	SDAI remission
rs1801275 (IL4R) A/A	663	391 (59.0)	0.89 (0.73-1.09)	0.96 (0.78-1.18)	1.06 (0.90-1.25)
rs2243250 (IL4) C/C	662	474 (71.6)	0.80 (0.64-0.98) *	0.80 (0.65-1.00) *	1.04 (0.87-1.25)
rs1883832 (CD40A) C/C	559	320 (57.2)	0.98 (0.79-1.22)	0.82 (0.66-1.02) †	0.91 (0.76-1.07)
rs1883832 (CD40A) T/T	559	104 (18.6)	0.97 (0.72-1.30)	0.88 (0.66-1.19)	1.15 (0.93-1.41)
rs4810485 (CD40B) G/G	559	322 (57.6)	0.97 (0.78-1.21)	0.88 (0.71-1.10)	0.90 (0.76-1.06)
rs4810485 (CD40B) T/T	559	105 (18.8)	0.87 (0.64-1.18)	0.98 (0.74-1.29)	1.39 (1.16-1.67) ***
DERAA -/+ or +/+	615	165 (26.9)	0.75 (0.58-0.96) *	0.79 (0.61-1.02) †	1.19 (1.01-1.40) *
IL4R A/A and IL4 C/C	662	277 (41.8)	0.80 (0.65-0.99) *	0.85 (0.69-1.05)	0.99 (0.85-1.17)
DERAA -/+ or +/+ and IL4R A/A	610	91 (14.9)	0.69 (0.50-0.96) *	0.81 (0.60-1.10)	1.24 (1.03-1.50) *
DERAA -/+ or +/+ and IL4 C/C	610	128 (21.0)	0.67 (0.51-0.90) **	0.75 (0.56-1.00) †	1.21 (1.02-1.44) *
DERAA -/+ or +/+ and CD40A C/C	552	87 (15.8)	0.88 (0.64-1.20)	0.68 (0.46-0.98) *	1.20 (0.98-1.48) †
DERAA -/+ or +/+ and CD40A T/T	552	26 (4.7)	0.32 (0.12-0.88) *	0.95 (0.51-1.78)	0.99 (0.67-1.46)
DERAA -/+ or +/+ and CD40B G/G	552	89 (16.1)	0.81 (0.59-1.12)	0.69 (0.48-0.99) *	1.17 (0.95-1.43)
DERAA -/+ or +/+ and CD40B T/T	552	25 (4.5)	0.43 (0.18-0.99) *	0.63 (0.32-1.26)	1.39 (1.02-1.88) *
† 0.1 < p < 0.05, * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001					

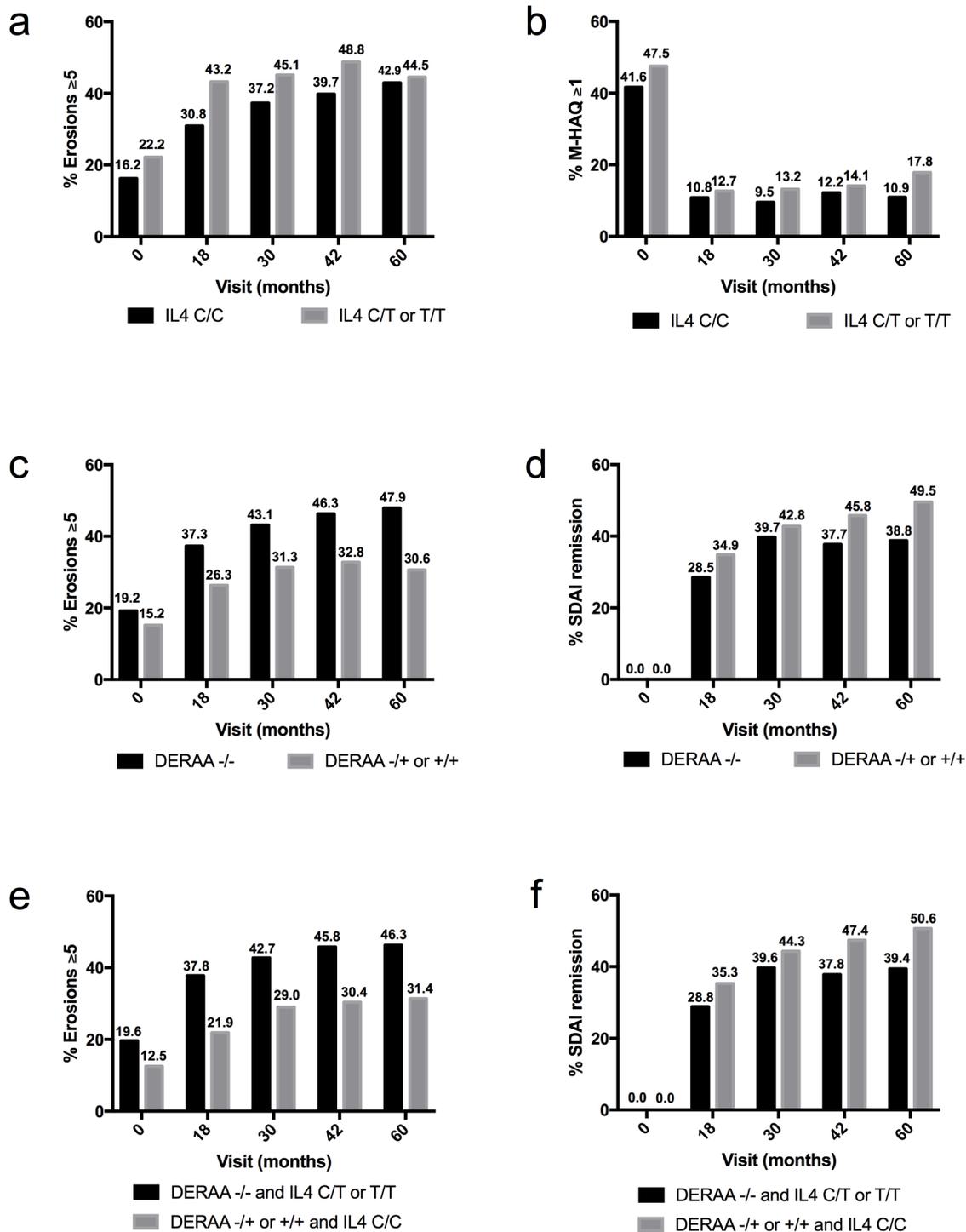


Figure 1: Effect of polymorphism alleles in the IL4 promoter on (a) erosive damage and (b) functional incapacity; Effect of DERA A status on (c) erosive damage and (d) likelihood of remission; Effect of combined IL4 and DERA A status on (e) erosive damage and (f) likelihood of remission.

a Erosive damage was significantly higher in patients with the C/T or T/T genotype. **b** M-HAQ score was significantly higher in patients with the C/T or T/T genotype. **c** Erosive damage was significantly lower in DERAAs-positive patients. **d** Likelihood of remission was significantly higher in DERAAs-positive patients. **e** Erosive damage was significantly lower in IL4 C/C and DERAAs-positive patients. **f** Likelihood of remission

8.7 Bibliography

- Al-Muhsen S, Vazquez-Tello A, Alzaabi A, Al-Hajjaj MS, Al-Jahdali HH & Halwani R (2014) IL-4 receptor alpha single-nucleotide polymorphisms rs1805010 and rs1801275 are associated with increased risk of asthma in a Saudi Arabian population. *Annals of thoracic medicine* 9(2):81.
- Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM & Spoerke JM (2004) A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *The American Journal of Human Genetics* 75(2):330-337.
- Boire G, Cossette P, de Brum-Fernandes AJ, Liang P, Niyonsenga T, Zhou ZJ, Carrier N, Daniel C & Ménard HA (2005) Anti-Sa antibodies and antibodies against cyclic citrullinated peptide are not equivalent as predictors of severe outcomes in patients with recent-onset polyarthritis. *Arthritis Res Ther* 7(3):R592-603.
- Bukhari M, Wiles N, Lunt M, Harrison B, Scott D, Symmons D & Silman A (2003) Influence of disease-modifying therapy on radiographic outcome in inflammatory polyarthritis at five years: results from a large observational inception study. *Arthritis & Rheumatism* 48(1):46-53.
- Bürgis S (2006) *Interleukin-4 Receptor Signal Transduction: Involvement of P62*. (PhD thesis. University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen).
- Burgos PI, Causey ZL, Tamhane A, Kelley JM, Brown EE, Hughes LB, Danila MI, van Everdingen A, Conn DL & Jonas BL (2010) Research article Association of IL4R single-nucleotide polymorphisms with rheumatoid nodules in African Americans with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 12:1-7.
- Carrier N, Cossette P, Daniel C, de Brum-Fernandes A, Liang P, Ménard HA & Boire G (2009) The DERA HLA-DR alleles in patients with early polyarthritis: protection against severe disease and lack of association with rheumatoid arthritis autoantibodies. *Arthritis & Rheumatism* 60(3):698-707.
- Carrier N, Marotta A, de Brum-Fernandes AJ, Liang P, Masetto A, Ménard HA, Maksymowych WP & Boire G (2016) Serum levels of 14-3-3 η protein supplement C-reactive protein and rheumatoid arthritis-associated antibodies to predict clinical and radiographic outcomes in a prospective cohort of patients with recent-onset inflammatory polyarthritis. *Arthritis research & therapy* 18(1):1.
- Challener GJ, Jones JD, Pelzek AJ, Hamilton BJ, Boire G, de Brum-Fernandes AJ, Masetto A, Carrier N, Ménard HA & Silverman GJ (2016) Anti-carbamylated Protein Antibody Levels Correlate with Anti-Sa (Citrullinated Vimentin) Antibody Levels in Rheumatoid Arthritis. *The Journal of rheumatology* 43(2):273-281.
- Choy EH & Scott DL (1995) Prognostic markers in rheumatoid arthritis and classification of antirheumatic therapies. *Drugs* 50(1):15-25.
- De Almeida D, Ling S, Pi X, Hartmann-Scruggs AM, Pumpens P & Holoshitz J (2010) Immune dysregulation by the rheumatoid arthritis shared epitope. *The Journal of Immunology* 185(3):1927-1934.

Dixon WG & Symmons DP (2005) Does early rheumatoid arthritis exist? *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 19(1):37-53.

Dobkin PL, Liu A, Abrahamowicz M, Carrier N, Brum-Fernandes AJ, Cossette P & Boire G (2013) Predictors of pain for patients with early inflammatory polyarthritis. *Arthritis care & research* 65(6):992-999.

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

Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C & Hajeer AH (2002) Influence of human leukocyte antigen-DRB1 on the susceptibility and severity of rheumatoid arthritis. *Seminars in arthritis and rheumatism*. Elsevier, p 355-360.

Gregersen PK, Silver J & Winchester RJ (1987) The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 30(11):1205-1213.

Guzian MC, Carrier N, Cossette P, de Brum-Fernandes AJ, Liang P, Ménard HA & Boire G (2010) Outcomes in recent-onset inflammatory polyarthritis differ according to initial titers, persistence over time, and specificity of the autoantibodies. *Arthritis care & research* 62(11):1624-1632.

<http://gqinnovationcenter.com/index.aspx> (McGill University and Genome Quebec Innovation Centre.), <http://gqinnovationcenter.com/index.aspx>

[http://www.appliedcytometry.com/Sample Protocols/FlexMAP beads/FlexMAP ASPE Protocol.pdf](http://www.appliedcytometry.com/Sample%20Protocols/FlexMAP%20beads/FlexMAP%20ASPE%20Protocol.pdf) (*Applied Cytometry Standard No-Wash ASPE Protocol.*), [http://www.appliedcytometry.com/Sample Protocols/FlexMAP beads/FlexMAP ASPE Protocol.pdf](http://www.appliedcytometry.com/Sample%20Protocols/FlexMAP%20beads/FlexMAP%20ASPE%20Protocol.pdf)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (Primer3.), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

<http://www.premierbiosoft.com/primerplex/> (PrimerPlex.), <http://www.premierbiosoft.com/primerplex/>

[https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/2953 SSP Flyer.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/2953_SSP_Flyer.pdf) ([https://tools.thermofisher.com/content/sfs/sspunitrays/1437 Cytokine00106986wrksht.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/sspunitrays/1437_Cytokine00106986wrksht.pdf) (<https://www.idtdna.com/site> (*Integrated DNA Technologies.*), <https://www.idtdna.com/site>

<https://www.luminexcorp.com/research/instruments/luminex-100200/> (Luminex 100.), <https://www.luminexcorp.com/research/instruments/luminex-100200/>

<https://www.luminexcorp.com/research/instruments/xponent/> (xPONENT software.), <https://www.luminexcorp.com/research/instruments/xponent/>

<https://www.luminexcorp.com/research/reagents-and-accessories/magplex-tag-microspheres/> (*MagPlex-TAG microspheres.*), <https://www.luminexcorp.com/research/reagents-and-accessories/magplex-tag-microspheres/>

<https://www.neb.com/products/e0554-q5-site-directed-mutagenesis-kit> (NEBaseChanger.), <https://www.neb.com/products/e0554-q5-site-directed-mutagenesis-kit>

<https://www.onelambda.com/en/product/labtype-sso.html> (LABType SSO.), <https://www.onelambda.com/en/product/labtype-sso.html>

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/7892010>, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/7892010>

- Jacobson E, Huber A, Akeno N, Sivak M, Li C, Concepcion E, Ho K & Tomer Y (2007) A CD40 Kozak sequence polymorphism and susceptibility to antibody-mediated autoimmune conditions: the role of CD40 tissue-specific expression. *Genes and immunity* 8(3):205-214.
- Jones JD, Hamilton BJ, Challener GJ, de Brum-Fernandes AJ, Cossette P, Liang P, Masetto A, Ménard HA, Carrier N & Boyle DL (2014) Serum CXC motif chemokine 13 is elevated in early and established rheumatoid arthritis and correlates with rheumatoid factor levels. *Arthritis research & therapy* 16(2):1.
- Kahlenberg JM & Fox DA (2011) Advances in the medical treatment of rheumatoid arthritis. *Hand clinics* 27(1):11-20.
- Kirwan JR & Currey H (1983) Rheumatoid arthritis: disease-modifying antirheumatic drugs. *Clin Rheum Dis* 9(3):581-599.
- Krabben A, Wilson A, Rooy D, Zhernakova A, Brouwer E, Lindqvist E, Saxne T, Stoeken G, Nies J & Knevel R (2013) Brief report: Association of genetic variants in the IL4 and IL4R genes with the severity of joint damage in rheumatoid arthritis: a study in seven cohorts. *Arthritis & Rheumatism* 65(12):3051-3057.
- Kruse S, Braun S & Deichmann KA (2002) Distinct signal transduction processes by IL-4 and IL-13 and influences from the Q551R variant of the human IL-4 receptor alpha chain. *Respir Res* 3(2002):24.
- Lancaster GA, Dodd S & Williamson PR (2004) Design and analysis of pilot studies: recommendations for good practice. *Journal of evaluation in clinical practice* 10(2):307-312.
- Leblanc-Trudeau C, Dobkin PL, Carrier N, Cossette P, de Brum-Fernandes AJ, Liang P, Masetto A & Boire G (2015) Depressive symptoms predict future simple disease activity index scores and simple disease activity index remission in a prospective cohort of patients with early inflammatory polyarthritis. *Rheumatology* 54(12):2205-2214.
- Leon AC, Davis LL & Kraemer HC (2011) The role and interpretation of pilot studies in clinical research. *Journal of psychiatric research* 45(5):626-629.
- Maksymowych WP, Boire G, van Schaardenburg D, Wichuk S, Turk S, Boers M, Siminovitch KA, Bykerk V, Keystone E & Tak PP (2015) 14-3-3 η Autoantibodies: Diagnostic Use in Early Rheumatoid Arthritis. *The Journal of rheumatology* 42(9):1587-1594.
- Marinou I, Till SH, Moore DJ & Wilson AG (2008) Lack of association or interactions between the IL-4, IL-4R α and IL-13 genes, and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 10(4):R80.
- Mia S, Warnecke A, Zhang XM, Malmström V & Harris R (2014) An optimized Protocol for Human M2 Macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF- β Yields a Dominant Immunosuppressive Phenotype. *Scandinavian journal of immunology* 79(5):305-314.
- Moreno I, Valenzuela A, Garcia A, Yelamos J, Sanchez B & Hernanz W (1996) Association of the shared epitope with radiological severity of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 23(1):6-9.
- O'Dell JR (2002) Treating rheumatoid arthritis early: a window of opportunity? *Arthritis & Rheumatism* 46(2):283-285.

- Pastinen T, Raitio M, Lindroos K, Tainola P, Peltonen L & Syvänen A-C (2000) A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays. *Genome research* 10(7):1031-1042.
- Pawlik A, Wrzesniewska J, Florczak M, Gawronska-Szklarz B & Herczynska M (2005) The IL-4 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology international* 26(1):48-51.
- Prots I, Skapenko A, Wendler J, Mattyasovszky S, Yoné CL, Spriewald B, Burkhardt H, Rau R, Kalden JR & Lipsky PE (2006) Association of the IL4R single-nucleotide polymorphism I50V with rapidly erosive rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 54(5):1491-1500.
- Quinn M & Emery P (2003) Window of opportunity in early rheumatoid arthritis: possibility of altering the disease process with early intervention. *Clinical and experimental rheumatology* 21(5; SUPP 31):S154-S157.
- Raza K, Falciani F, Curnow SJ, Ross EJ, Lee C-Y, Akbar AN, Lord JM, Gordon C, Buckley CD & Salmon M (2005) Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis Res Ther* 7(4):R784-795.
- Rego-Perez I, Fernandez-Moreno M & Blanco FJ (2008) Gene polymorphisms and pharmacogenetics in rheumatoid arthritis. *Curr Genomics* 9(6):381-393.
- Singh JA, Furst DE, Bharat A, Curtis JR, Kavanaugh AF, Kremer JM, Moreland LW, O'Dell J, Winthrop KL, Beukelman T, Bridges SL, Jr., Chatham WW, Paulus HE, Suarez-Almazor M, Bombardier C, Dougados M, Khanna D, King CM, Leong AL, Matteson EL, Schousboe JT, Moynihan E, Kolba KS, Jain A, Volkmann ER, Agrawal H, Bae S, Mudano AS, Patkar NM & Saag KG (2012) 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 64(5):625-639.
- Singh JA, Wells GA, Christensen R, Tanjong Ghogomu E, Maxwell L, Macdonald JK, Filippini G, Skoetz N, Francis D, Lopes LC, Guyatt GH, Schmitt J, La Mantia L, Weberschock T, Roos JF, Siebert H, Hershan S, Lunn MP, Tugwell P & Buchbinder R (2011a) Adverse effects of biologics: a network meta-analysis and Cochrane overview. *Cochrane Database Syst Rev* 10.1002/14651858.CD008794.pub2(2):CD008794.
- Singh RR (2003) IL-4 and many roads to lupuslike autoimmunity. *Clinical immunology* 108(2):73-79.
- Smolen JS & Aletaha D (2015) Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies, opportunities and challenges. *Nature Reviews Rheumatology* 11(5):276-289.
- Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC, Buch M, Burmester G, Dougados M, Emery P, Gaujoux-Viala C, Gossec L, Nam J, Ramiro S, Winthrop K, de Wit M, Aletaha D, Betteridge N, Bijlsma JW, Boers M, Buttgerit F, Combe B, Cutolo M, Damjanov N, Hazes JM, Kouloumas M, Kvien TK, Mariette X, Pavelka K, van Riel PL, Rubbert-Roth A, Scholte-Voshaar M, Scott DL, Sokka-Isler T, Wong JB & van der Heijde D (2014a) EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis* 73(3):492-509.
- Takeda K, Kishimoto T & Akira S (1997) STAT6: its role in interleukin 4-mediated biological functions. *Journal of molecular medicine* 75(5):317-326.

- Thomson W, Harrison B, Ollier B, Wiles N, Payton T, Barrett J, Symmons D & Silman A (1999) Quantifying the exact role of HLA-DRB1 alleles in susceptibility to inflammatory polyarthritis: Results from a large, population-based study. *Arthritis & Rheumatism* 42(4):757-762.
- Tunyogi-Csapo M, Kis-Toth K, Radacs M, Farkas B, Jacobs JJ, Finnegan A, Mikecz K & Glant TT (2008) Cytokine-controlled RANKL and osteoprotegerin expression by human and mouse synovial fibroblasts: Fibroblast-mediated pathologic bone resorption. *Arthritis & Rheumatism* 58(8):2397-2408.
- van Boekel MA, Vossenaar ER, van den Hoogen FH & van Venrooij WJ (2002) Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res* 4(2):87-93.
- Van der Heijde D (1999) How to read radiographs according to the Sharp/van der Heijde method. *The Journal of Rheumatology* 26(3):743-745.
- Van Der Linden MP, Feitsma AL, Le Cessie S, Kern M, Olsson LM, Raychaudhuri S, Begovich AB, Chang M, Catanese JJ & Kurreeman FA (2009) Association of a single-nucleotide polymorphism in CD40 with the rate of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 60(8):2242-2247.
- van Heemst J, Jansen DT, Polydorides S, Moustakas AK, Bax M, Feitsma AL, Bontrop-Elferink DG, Baarse M, van der Woude D & Wolbink G-J (2015) Crossreactivity to vinculin and microbes provides a molecular basis for HLA-based protection against rheumatoid arthritis. *Nature communications* 6.
- Van Jaarsveld C, Ter Borg E, Jacobs J, Schellekens G, Gmelig-Meyling F, van Booma-Frankfort C, De Jong B, Van Venrooij W & Bijlsma J (1998) The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in early rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology* 17(6):689-697.
- van Kooten C & Banchereau J (1997) Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Current opinion in immunology* 9(3):330-337.
- Visser H (2005) Early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 19(1):55-72.
- Weyand CM, Hicok KC, Conn DL & Goronzy JJ (1992) The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Annals of internal medicine* 117(10):801-806.
- Wright V & Amos R (1980b) Do drugs change the course of rheumatoid arthritis? *Br Med J* 280(6219):964-966.

CHAPITRE 3: DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

9 Discussion générale

L'objectif général de ce projet de maîtrise était l'identification de biomarqueurs fiables et indépendants permettant de prédire la progression de la polyarthrite rhumatoïde chez les individus, afin de mieux cibler les traitements administrés. Spécifiquement, nous cherchions à déterminer si des allèles atypiques à des polymorphismes dans les gènes de l'IL-4 et de son récepteur, du récepteur de costimulation CD40, et les allèles HLA-DR des patients étaient associés à des issues particulières de la maladie.

9.1 Évaluation des méthodes

Le génotypage des polymorphismes d'intérêt a été réalisé en utilisant la méthode d'extension d'amorce spécifique d'allèle, suivie d'une lecture utilisant l'instrument Luminex LX100, dérivé de la cytométrie de flux. Une partie majeure de ce projet de recherche a été le développement et la validation de cette méthode de génotypage pour nos utilisations. Le génotypage des allèles HLA-DR a été effectué d'abord en basse résolution en utilisant la trousse LABType® (One Lambda, Canoga Park, CA), présentement en usage dans le laboratoire d'histocompatibilité et utilisant également l'instrument Luminex, puis, pour les allèles d'intérêt, en haute résolution, en utilisant le produit SSP UniTray® (Life technologies, Waltham, MA, USA).

9.1.1 Génotypage des polymorphismes

La méthode de génotypage des polymorphismes utilisée pour la présente étude a été développée en laboratoire, dans le cadre de ce projet de maîtrise. D'abord, des amorces d'amplification par PCR ont été développées en utilisant l'outil en-ligne Primer3, qui nous a permis d'amplifier les régions spécifiques de l'ADN contenant les polymorphismes d'intérêt, en utilisant un protocole de PCR standardisé. Les amorces pour l'extension d'amorce spécifique d'allèle ont été développées en utilisant l'outil en-ligne PrimerPlex, qui nous a permis de générer des amorces s'hybridant à notre ADN amplifié dans l'étape précédente, ainsi qu'à une séquence complémentaire liée à des microbilles de latex de marque MagPLEX® (Luminex,

Austin, TX, USA). Ces microbilles contiennent deux concentrations spécifiques de deux fluorophores, ce qui permet d'identifier chaque population de billes au moment de la lecture. Les séquences complémentaires liées aux microbilles MagPLEX sont hautement spécifiques, afin d'éviter tout risque d'hybridation croisée.

Lors du processus d'extension d'amorce spécifique de l'allèle, celle-ci n'a lieu que si l'amorce utilisée est spécifique à l'allèle présent dans l'ADN. L'incorporation de nucléotides biotinylés permet d'évaluer qualitativement cette élongation, ou son absence. Les produits d'élongation sont ensuite exposés à un conjugué de streptavidine, protéine ayant une affinité très forte et très spécifique pour la biotine, et de phycoérythrine, une protéine fluorophore. Le résultat est présenté sous forme de ratio de fluorescence, spécifiquement de la fluorescence détectée pour l'allèle typique, comparativement à l'allèle atypique. Un très haut ratio en faveur de l'allèle typique indiquait un typage homozygote typique, un ratio d'environ 1 (donc une fluorescence équivalente pour l'allèle typique et l'allèle atypique) indiquait un typage hétérozygote, et enfin un très faible ratio (en faveur de l'allèle atypique) indiquait un typage homozygote atypique. Le haut débit de l'instrument LX100 de Luminex permet d'effectuer rapidement le génotypage de plusieurs polymorphismes d'intérêt pour un grand nombre de patients.

Nous avons accès à plusieurs patients dont les polymorphismes d'intérêt dans IL4 et IL4R avaient été préalablement définis au laboratoire, en utilisant soit une méthode de PCR quantitative (pour rs1801275 et rs2243250), soit une méthode de digestion enzymatique différentielle par BsmI, dont le site de clivage se trouve au site du polymorphisme rs2070874. Ainsi nous avons pu nous servir d'ADN de patients ayant préalablement été génotypés en tant que témoins pour les différents génotypes possibles. Nous n'avons par contre pas préalablement effectué de génotypage des polymorphismes d'intérêt dans CD40; ainsi nous avons généré des témoins via une méthode de mutagenèse dirigée, en utilisant la trousse Q5, de New England Biolabs, et l'outil en-ligne NEBase Changer. Nous avons envoyé ces témoins pour séquençage auprès de Génome Québec, afin de confirmer que la mutagenèse dirigée avait été effectuée avec succès. Nous nous sommes ensuite servis de cet ADN muté en tant que témoin, pour le génotypage des polymorphismes d'intérêt dans CD40, rs1883832 et rs4810485.

9.1.2 Génotypage des allèles HLA-DR

La trousse LABType[®] de One Lambda est présentement en usage au laboratoire d'histocompatibilité pour le typage en basse résolution des allèles HLA en vue de transplantation d'organes. Nous avons utilisé cette technique pour le génotypage des allèles HLA-DR des patients de la cohorte, puis avons typé en haute résolution les allèles d'intérêt pour déterminer quels patients possédaient au moins une copie de l'épitope partagé (*shared epitope*) et/ou de l'épitope protecteur DERA A en utilisant la trousse SSP UniTray[®] de Thermo Fisher. Ces méthodes sont disponibles commercialement et ont précédemment été validées au laboratoire d'histocompatibilité.

Le fonctionnement de la trousse LABType[®] est basé sur le principe de rSSO (*reverse sequence-specific oligonucleotide*). Selon ce principe, l'ADN-cible est amplifié par réaction en chaîne par polymérase (PCR) en utilisant des amorces étiquetées à la biotine, spécifiques au locus d'intérêt (ici, DRB1). Puis, le produit amplifié est dénaturé et hybridé à des sondes oligonucléotidiques liées à des populations spécifiques de microsphères. Ces produits d'hybridation sont ensuite exposés à un conjugué de streptavidine et de phycoérythrine, puis l'acquisition des données est effectuée en utilisant le même instrument (Luminex LX100) que celui utilisé pour le typage des polymorphismes nucléotidique décrit plus haut.

Les résultats obtenus orientent la décision de passer au typage en haute définition ou non; ainsi les patients dont le typage en basse définition n'indiquait aucune possibilité d'allèle HLA-DR comprenant soit l'épitope partagé, soit le DERA A, ont été dénotés négatifs pour ces deux marqueurs, et les typages comprenant certains allèles potentiellement positifs pour un des motifs recherchés ont été soumis au typage en haute résolution.

Le SSP UniTray[®] a été utilisé pour le typage en haute résolution de certains allèles HLA-DR d'intérêt. Cette technique basée sur la PCR emploie des amorces spécifiques de la séquence de chacun des variants génétiques possibles a une position nucléotidique donnée. Les produits d'amplifications sont ensuite migrés sur gel d'agarose, et la présence de bandes d'ADN, visibles sous lumière ultraviolette, indique que la variation génétique (polymorphisme) est présente ou non (absence d'amplification). Chaque réaction comprend également un témoin interne permettant d'assurer que la PCR a été effectuée avec succès. Les amplifications positives sont identifiées sur une feuille de travail et permettent, ensemble, de déterminer l'allèle HLA-DR.

Les allèles HLA-DR qui ont été identifiées comme comprenant l'épitope partagé sont: HLA-DRB1*01:01, *01:02, *01:05, *04:01, *04:04, *04:05, *04:08, *04:09, *10:01, *14:02. Les allèles HLA-DRB1*01:03, *04:02, *11:02, *11:03, *13:01, *13:02, *13:04 ont été identifiées comme comprenant l'épitope protecteur DERA.

9.1.3 Analyses statistiques

Les analyses statistiques utilisées pour déterminer la corrélation des biomarqueurs décrits ci-haut avec les issues de la maladie d'intérêt pour cette étude, soit le dommage radiographique, le degré d'incapacité fonctionnelle, et le niveau d'activité de la maladie, font usage du modèle linéaire général (*general linear model*, GLM) et de l'équation d'estimation généralisée (*generalized estimating equation*, GEE). Ces analyses ont été réalisées avec l'aide de Nathalie Carrier, biostatisticienne de l'équipe de rhumatologie au Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux de l'Estrie - Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke, en utilisant le logiciel SAS (*statistical analysis software*), v9.3.

Modèle linéaire général

Le modèle linéaire général (GLM) avec mesures répétées sur cinq ans a été utilisé pour déterminer la corrélation entre les biomarqueurs et les issues de la maladie d'intérêt présentés sous forme de variables continues, c'est-à-dire la valeur exacte de la variable au temps défini (par exemple, un score Sharp/van der Heijde de 7).

Le GLM vise à exprimer une variable dépendante linéairement en fonction d'une variable explicative; ici, nous cherchions à déterminer l'impact d'un certain biomarqueur sur une certaine mesure clinique, par exemple l'impact du génotype d'un patient au polymorphisme rs1801275 dans le récepteur de l'IL-4 sur le score Sharp/van der Heijde de ce patient au fil du temps. Les résultats du modèle linéaire général sont présentés sous forme d'estimation de la corrélation, en tenant compte de l'écart-type à la moyenne obtenu pour ces variables.

Ainsi, une estimation inférieure à zéro suggère que le biomarqueur d'intérêt a une corrélation négative à ce paramètre, et une estimation supérieure à zéro suggère le contraire. La valeur de l'écart-type à la moyenne permet d'estimer à quel point le GLM permet d'expliquer la valeur de la variable dépendante en fonction de la variable explicative, soit le niveau de précision du modèle.

Équation d'estimation généralisée

L'équation d'estimation généralisée (GEE) avec mesures répétées sur cinq ans a été utilisée pour déterminer la corrélation entre les biomarqueurs et les issues de la maladie d'intérêt présentés sous forme de variables catégoriques, c'est-à-dire que la valeur exacte de la variable au temps défini a été comparée à un seuil prédéfini et significatif (par exemple, un score d'érosions de 5 ou plus).

Le GEE vise à déterminer la probabilité d'atteindre une issue clinique d'intérêt pour un groupe donné, comparativement au groupe témoin. Par exemple, nous avons cherché à déterminer l'impact du génotype hétérozygote ou double-positif DERA sur la probabilité d'un patient d'entrer en rémission clinique, c'est-à-dire d'obtenir un score inférieur ou égal à 3,3 sur l'échelle SDAI. Les résultats de l'équation d'estimation généralisée sont présentés sous forme de risque relatif, en tenant compte de l'intervalle de confiance.

Ainsi, un risque relatif supérieur à 1 suggère que le biomarqueur d'intérêt augmente la probabilité d'atteindre l'issue de la maladie en question, et un risque relatif inférieur à 1 suggère le contraire. Les valeurs constituant l'intervalle de confiance, c'est-à-dire l'étendue de valeurs où la probabilité d'erreur est inférieure à 5%, permettent une perspective plus large sur l'impact du biomarqueur en question sur l'issue de la maladie d'intérêt.

Significativité

Le seuil de significativité pour la présente étude était une valeur p de 0,05 ou moins. Une valeur p inférieure ou égale à 0,1 mais supérieure à 0,05 indiquait une tendance marquée. Une valeur p inférieure ou égale à 0,01 indiquait une corrélation très significative, et une valeur p inférieure ou égale à 0,001 indiquait une corrélation hautement significative.

9.2 L'IL-4 et son récepteur

Un projet-pilote pour cette étude avait pour objet d'établir l'existence de liens entre des polymorphismes dans plusieurs cytokines du système immunitaire et certaines issues de la maladie. Les gènes d'intérêt étaient IL-1a, IL-1b, IL-1R, IL-4Ra, IL-12, IFN γ , TGF β 1, TNF α , IL-2, IL-4, IL-6, PTPN22 et IL-10. Les facteurs d'intérêt étaient la présence d'anticorps associés à l'arthrite rhumatoïde, la sévérité et la persistance de la maladie, ainsi que les critères pour la polyarthrite fournis par l'ACR. Seuls les polymorphismes concernant l'IL-4 et son récepteur ont généré des résultats prometteurs. Trois polymorphismes dans le gène de l'IL-4 avaient été

analysés, mais seulement deux d'entre eux, rs2243250 et rs2070874, étaient associés à des issues spécifiques de la maladie; c'est sur ces polymorphismes que ce projet s'est concentré.

9.2.1 Impact de l'allèle atypique T aux polymorphismes rs2243250 et rs2070874 dans IL4

Nos résultats démontrent une association entre l'allèle atypique T aux polymorphismes rs2243250 et rs2070874, et du dommage radiographique augmenté, un déclin fonctionnel plus important, et une probabilité réduite d'atteindre un état de rémission clinique suite au traitement.

En comparant les trois génotypes possibles, soit C/C, C/T, et T/T, un modèle linéaire démontre une association hautement significative entre l'allèle atypique T et du dommage radiographique plus important, que ceci soit mesuré selon le paramètre du score Sharp/van der Heijde (GLM : Estimate (SEM), p : 0,079 (0,020), $p = 0,0001$) ou le score d'érosions (GLM : 0,072 (0,018), $p < 0,0001$). En raison du nombre relativement faible de patients homozygotes atypiques T/T, soit 16 patients de 663, ou 2,4%, nous avons également effectué ces analyses en combinant en un groupe tous les patients présentant au moins une copie de l'allèle atypique T. Nous avons obtenu des résultats très similaires comparativement au groupe de patients C/C, autant au niveau du score Sharp/van der Heijde (GLM : 0,088 (0,023), $p = 0,0001$) que du score d'érosions (GLM : 0,080 (0,021), $p < 0,0001$).

Nous avons également effectué des analyses via la *generalized estimating equation* selon des seuils prédéfinis, soit un score de 5 ou plus sur les échelles de Sharp/van der Heijde total ou du score d'érosions. En comparant les trois génotypes possibles, nous avons observé une tendance vers un score Sharp/van der Heijde de 5 ou plus plus élevée pour le groupe hétérozygote C/T (GEE : RR (95% CI), p : 1,16 (1,00-1,34), $p = 0,054$) et pour le groupe homozygote atypique T/T (GEE : 1,35 (0,95-1,92), $p = 0,099$). En combinant les patients C/T et T/T, nous avons observé une association significative avec un score Sharp/van der Heijde de 5 ou plus (GEE : 1,17 (1,02-1,35), $p = 0,030$). Un score Sharp/van der Heijde de 5 ou plus indique une maladie causant du dommage radiographique significatif, combinant érosions et pincements articulaires. En comparant les trois génotypes possibles, nous avons observé une association significative entre le génotype hétérozygote C/T et un score d'érosions de 5 ou plus (GEE : 1,25 (1,00-1,55), $p = 0,0485$). En combinant les patients C/T et T/T et en comparant au groupe C/C, nous avons observé une association significative entre l'allèle atypique T et un score d'érosions de 5 ou plus (GEE : 1,26 (1,02-1,55), $p = 0,0344$). Un score d'érosions de 5 ou

plus révèle une maladie causant du dommage érosif irréversible important. Nous n'avons pas observé d'association significative entre un quelconque génotype et un score de pincements articulaires de 5 ou plus, suggérant que le rôle de l'IL-4 se concentre potentiellement au niveau du mécanisme de résorption osseuse.

En comparant les trois génotypes possibles, nous avons observé une association significative entre l'allèle atypique T et un déclin fonctionnel plus important, mesuré par un score M-HAQ plus élevé (GLM : 0,016 (0,006), $p = 0,0063$). Ceci était également le cas quand nous combinons les patients C/T et T/T (GLM : 0,017 (0,006), $p = 0,0087$). En utilisant le seuil d'un score sur le M-HAQ supérieur ou égal à 1,0, indiquant une maladie causant un handicap, nous avons observé une tendance vers un score de 1,0 ou plus sur le M-HAQ pour le groupe de patients C/T (GEE : 1,23 (0,98-1,54), $p = 0,0696$). En combinant les patients C/T et T/T, nous avons observé une association significative entre l'allèle atypique T et une maladie causant un handicap (GEE : 1,25 (1,00-1,55), $p = 0,0479$). Il est probable que le déclin fonctionnel plus important chez les patients C/T et T/T soit associé au niveau plus important de dommage radiographique rapporté plus haut.

Enfin, nous avons observé une tendance vers un niveau d'activité de la maladie, mesuré par le SDAI, plus élevé pour les patients possédant au moins une copie de l'allèle atypique T (GLM : 0,032 (0,019), $p = 0,0923$). Une association semblable a été observée entre le groupe de patients T/T et une probabilité plus faible d'entrer en rémission clinique suite au traitement, c'est-à-dire un score SDAI de 3,3 ou moins (GEE : 0,40 (0,17-0,90), $p = 0,0277$). Le score SDAI tenant compte notamment du nombre d'articulations gonflées et douloureuses, il est probable que cette tendance vers un score SDAI plus élevée soit reliée au dommage radiographique et érosif rapportés plus haut.

L'allèle atypique T aux polymorphismes rs2243250 et rs2070874 dans le gène de l'IL-4 était associée à une augmentation du dommage radiographique, de l'incapacité fonctionnelle, et de l'activité de la maladie. Étant situés dans la région 5'-UTR du gène, ces polymorphismes sont non-codants. Les mutations situées dans une région non-codante d'un gène peuvent moduler l'expression de ce gène, par exemple en affectant le site de liaison d'un facteur de transcription, le motif d'épissage de l'ARN, ou une séquence d'ARN non-codante.

Il a été démontré que les niveaux d'IL-4 dans le fluide synovial des personnes atteintes de polyarthrite rhumatoïde varie énormément selon l'étape de la maladie: des niveaux plus élevés sont observés aux étapes hâtives, alors qu'aux étapes tardives l'IL-4 n'est présente qu'à de très

faibles niveaux, voire absente (Raza *et al.*, 2005). Bien que le rôle précis de l'IL-4 dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde n'a pas été identifié, il a été proposé que sa propriété de moduler la différenciation des lymphocytes T auxiliaires vers le phénotype Th2, lui-même agissant principalement au niveau de la réponse humorale, pourrait, via surstimulation des lymphocytes B et des plasmocytes, mener à la production d'anticorps autoréactifs (Krabben *et al.*, 2013). Les polymorphismes d'intérêt étant situés dans la région promotrice de ce gène, il est possible qu'un allèle atypique au niveau de ces polymorphismes module à la hausse le niveau d'IL-4 présent dans le fluide synovial, et ainsi encourage cette réponse autoimmunitaire humorale.

Il a également été démontré que l'IL-4 est un inhibiteur de la voie de résorption osseuse RANK; ainsi, les niveaux d'IL-4 très faibles des étapes avancées de la maladie pourraient promouvoir la résorption osseuse via leur absence d'inhibition de RANK (Tunyogi-Csapo *et al.*, 2008). Il serait bénéfique de mesurer les niveaux sériques et synoviaux d'IL-4 chez les patients de la cohorte au différents suivis, afin de déterminer s'il existe une corrélation entre le génotype aux polymorphismes rs2243250 et rs2070874 et le niveau d'expression de cette cytokine. Ceci pourrait contribuer à clarifier le rôle de l'IL-4 dans la progression de la polyarthrite rhumatoïde, vu son rôle potentiel dans les aspects distincts d'initiation et perpétuation des réponses immunitaires humorales aux étapes hâtives de la maladie, suivi aux étapes tardives d'un rôle de promotion de la résorption osseuse.

Le polymorphisme rs2243250 est situé dans le site de contact du facteur de transcription NFAT, et l'allèle mineur T a été associé par d'autres études à une activité augmentée du promoteur, menant à une maladie plus sévère (Pawlik *et al.*, 2005). Ce polymorphisme était en déséquilibre de liaison important avec l'autre polymorphisme du promoteur d'IL4, rs2070874, dans les patients de notre étude. Le rôle de ce polymorphisme dans la progression du dommage radiographique chez les personnes atteintes de polyarthrite rhumatoïde n'a pas encore été élucidé.

Nos résultats indiquent que l'allèle atypique T est associé, en plus d'une augmentation du dommage radiographique, à une augmentation du déclin fonctionnel; cette perte de fonction est potentiellement liée au dommage érosif augmenté, qui cause sans doute de la douleur importante et une ankylose rapide des articulations affectées. Ces polymorphismes étaient également liés à une probabilité moins importante d'entrer en rémission clinique suite au traitement; cette activité augmentée de la maladie pourrait être fortement influencée par un niveau d'inflammation augmenté et pervasive au niveau des articulations affectées. Ainsi, le

génotype des patients aux polymorphismes rs2243250 et rs2070874 est un biomarqueur intéressant pour le ciblage des traitements aux patients individuels, où un allèle atypique est associé à une maladie plus sévère. Ces patients pourraient ainsi bénéficier d'un traitement plus agressif afin d'éviter la progression du dommage radiographique irréversible. D'autres études sont nécessaires afin d'identifier le rôle précis de ces polymorphismes, par exemple il serait bénéfique de déterminer si les différents génotypes induisent une expression différentielle de cette cytokine dans le fluide synovial.

9.2.2 Impact de l'allèle atypique G au polymorphisme rs1801275 dans IL4R

Nos résultats démontrent une corrélation entre l'allèle atypique G et du dommage radiographique plus important.

En comparant les trois génotypes possibles en tant que groupe distinct, un modèle linéaire révèle une association significative entre la présentation d'au moins un allèle atypique G avec un score Sharp/van der Heijde plus élevé (GLM : Estimate (SEM), p : 0,035 (0,017), p = 0,0431). Une corrélation existait également entre l'allèle atypique G et un score d'érosions plus élevé, mais ce résultat se situait légèrement au-dessus du seuil de la significativité statistique (GLM : 0,029 (0,016), p = 0,0674).

Le nombre de patients possédant le génotype homozygote atypique G/G étant relativement faible (32 patients sur 663, soit 4,8% des patients), nous avons également effectué ces analyses en combinant les deux génotypes présentant au moins une copie de l'allèle atypique G, soit les patients hétérozygotes A/G, avec les patients homozygotes G/G, et avons obtenu des résultats similaires. Une tendance très près du seuil de significativité statistique a été observée pour un score Sharp/van der Heijde plus élevé que celui des patients homozygotes A/A (GLM : 0,041 (0,021), p = 0,0511). Nous avons également déterminé une tendance vers un score d'érosions osseuses plus élevé (GLM : 0,031 (0,019), p = 0,0949).

L'allèle atypique G au polymorphisme rs1801275, situé dans une région codante du gène IL4R, induit la mutation d'un résidu glutamine, à la position 551, en un résidu arginine. La chaîne α d'IL-4R forme un complexe récepteur de type I avec la chaîne γ commune, et ce complexe est exprimé sur plusieurs types cellulaires. Ce complexe ne possède pas d'activité kinase endogène, et doit ainsi recruter des kinases intracellulaires et des protéines adaptatrices pour être actif. Le récepteur de l'IL-4 recrute la kinase Jak-1 via un motif "box-1" adjacent à la région transmembranaire. Jak-1 phosphoryle plusieurs résidus tyrosine de la chaîne α , incluant Y550,

le résidu voisin de Q551, soit le résidu muté par rs1801275. Ces résidus tyrosine phosphorylés deviennent le site de liaison du domaine SH2 de STAT6, qui est elle-même phosphorylée par les kinases Jak. Suite à ceci STAT6 se dissocie du complexe du récepteur et se déplace vers le noyau, où elle agit en tant que facteur de transcription et est impliquée dans la régulation de plusieurs gènes du système immunitaire. La mutation induite par un allèle atypique G au polymorphisme rs1801275, dite Q551R, implique la mutation d'un résidu basique en un résidu polaire, ce qui pourrait affecter la phosphorylation de Y550 par Jak-1, ce qui pourrait ensuite affecter la liaison de STAT6 à la chaîne α et causer plusieurs effets en aval.

La mutation Q551R est associée à une augmentation du risque de développer plusieurs désordres autoimmuns, potentiellement en augmentant la différenciation des lymphocytes Th0 vers le phénotype Th2, ce qui, tel que mentionné plus haut, pourrait promouvoir une réaction autoimmunitaire humorale. Pour ce faire, il a été proposé que la mutation Q551R mène à un gain-de-fonction, en maintenant STAT6 dans un état phosphorylé (actif). Le rôle précis de Q551R dans la pathogenèse et la progression de la polyarthrite rhumatoïde a été étudiée par plusieurs équipes, et ces études ont mené à divers résultats inconclusifs, parfois même contradictoires (Burgos *et al.*, 2010, Marinou *et al.*, 2008, Prots *et al.*, 2006).

Nos résultats ont révélé une association significative entre un allèle atypique G à ce polymorphisme, et une augmentation du dommage radiographique. Ceci suggère un état d'inflammation prononcée et pervasive, menant à du pincement articulaire et à des érosions osseuses; ces caractéristiques pourraient être associée par un défaut de régulation. Nous proposons que de connaître le génotype des patients au polymorphisme rs1801275 représente un biomarqueur intéressant indiquant une maladie causant plus de dommage radiographique. Des études supplémentaires seront nécessaires afin d'identifier la fonction exacte de cette mutation sur l'activité du récepteur, ainsi que sur la progression de la maladie.

9.3 Le co-récepteur CD40

Nous avons choisi d'étudier les polymorphismes rs1883832 et rs4810485 dans le gène du corécepteur CD40, en raison de son rôle présumé dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde. L'interaction de CD40, exprimé sur les cellules présentatrices d'antigènes, avec son ligand CD40L (CD154), exprimé sur les lymphocytes T auxiliaires, est nécessaire pour l'activation des cellules présentatrices d'antigènes. Plusieurs études proposent un rôle pour CD40 dans les processus de développement et de progression de la polyarthrite rhumatoïde.

9.3.1 Impact de l'allèle atypique T au polymorphisme rs1883832 dans CD40

Nos résultats indiquent qu'un allèle atypique T au polymorphisme rs1883832 est associé à une augmentation du déclin fonctionnel associé à la progression de la polyarthrite rhumatoïde.

En combinant les patients de génotype hétérozygote C/T et homozygote atypique T/T en un groupe, le modèle linéaire général indique une association significative entre l'allèle atypique T et un score continu plus élevé au M-HAQ, indiquant un degré de déclin fonctionnel globalement plus élevé (GLM : 0,015 (0,006), $p = 0,0163$). Par contre, en analysant les trois génotypes possibles en tant que groupes distincts, nous perdons le degré de significativité précédent.

Nous avons également effectué des analyses d'équation d'estimation générale, en utilisant le seuil d'un score au M-HAQ supérieur ou égal à 1,0, indiquant que le patient éprouve des difficultés significatives à effectuer ses tâches quotidiennes suite à sa condition. Nous avons observé une association significative entre le génotype hétérozygote C/T et un score M-HAQ de 1,0 ou plus (GEE : 1,39 (1,08-1,79), $p = 0,0094$). En combinant les génotypes C/T et T/T, nous avons observé une tendance ne rencontrant pas les exigences de significativité statistique (GEE : 1,22 (0,98-1,52), $p = 0,083$). Un résultat surprenant est également apparu, soit que nous n'avons pas observé cette association pour les patients de génotype homozygote atypique T/T (GEE : 0,98 (0,72-1,34), $p = 0,9210$). Nous n'avons pas trouvé d'explication pour cette association, qui ne semble pas être directement (ou du moins uniquement) liée à la présence de l'allèle atypique T.

L'incapacité fonctionnelle est une issue négative majeure de la polyarthrite rhumatoïde, et est souvent associée à des niveaux plus élevés d'inflammation et de douleur. L'étude de Bernatsky et al. (2014) estime la prévalence de la polyarthrite au Québec à entre 0,5% et 1% de la population, ce qui s'aligne avec les estimations connues pour la plupart des pays industrialisés. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 50% des personnes affectées par la polyarthrite rhumatoïde se voient incapables de maintenir un emploi à temps plein dix ans après le début des symptômes. Par contre, il est à noter que le M-HAQ étant un questionnaire rempli par les personnes atteintes et décrivant leurs difficultés à effectuer plusieurs tâches quotidiennes, ce résultat ne correspond pas directement à un facteur biologique ou clinique. Une augmentation du score M-HAQ est souvent associée à une augmentation du dommage radiographique ou du niveau d'activité de la maladie. Néanmoins, nous n'avons pas observé d'association concernant le polymorphisme rs1883832 avec des facteurs de la maladie liés au dommage radiographique ou au niveau d'activité de la maladie, outre une tendance vers un

score continu de pincements articulaires plus élevé quand les trois génotypes étaient analysés en tant que groupes distincts (GLM : 0,035 (0,019), $p = 0,0728$).

Le polymorphisme rs1883832 est situé dans la 5'-UTR du gène CD40, au niveau d'une séquence consensus de Kozak. Les séquences consensus de Kozak ont une participation-clé dans le processus d'initiation de la traduction de l'ARN, en étant reconnus par le ribosome en tant que site de début de la traduction. Une mutation au niveau de cette séquence peut influencer le niveau de synthèse de la protéine en question. CD40 participant de manière essentielle à l'activation des cellules présentatrices d'antigènes, il est probable qu'une modulation de son expression pourrait influencer ce niveau d'activation de la réponse immune, pour éventuellement mener à un désordre autoimmunitaire. Il serait bénéfique de quantifier le corécepteur CD40 au niveau des cellules présentatrices d'antigènes présentes dans le fluide synovial et les ganglions lymphatiques de nos patients, de façon différentielle selon leur génotype C/C, C/T ou T/T, afin d'élucider le rôle de rs1883832 sur son expression.

Ces facteurs placent ainsi l'allèle atypique T au polymorphisme rs1883832 dans la région promotrice de CD40 dans la catégorie des biomarqueurs d'intérêt pour la progression de la polyarthrite rhumatoïde.

9.3.2 Impact de l'allèle atypique T au polymorphisme rs4810485 dans CD40

Nos résultats démontrent une association entre l'allèle atypique T au polymorphisme rs4810485 dans CD40 et un niveau d'activité de la maladie plus faible, reflété en tant que probabilité plus élevée d'entrer en rémission clinique suite au traitement, ainsi qu'une légère tendance vers un déclin fonctionnel globalement plus prononcé.

En combinant les patients hétérozygotes (G/T) et les patients homozygotes atypiques (T/T) en un seul groupe, nous avons observé une tendance non-significative vers un score M-HAQ légèrement plus élevé, dénotant une difficulté accrue à effectuer les tâches quotidiennes (GLM : 0,011 (0,006), $p = 0,0838$). Cette association était perdue lorsque les trois génotypes possibles étaient analysés en tant que groupes distincts. L'association n'était également pas significative quand les analyses portaient sur le seuil du score M-HAQ supérieur ou égal à 1,0.

Nous avons également observé que l'allèle mineur T était associé à un niveau d'activité globalement réduit, mesuré selon le SDAI ; lorsque les trois génotypes étaient analysés en tant que groupes distincts, une association très près du seuil de la significativité était observée

(GLM : -0,025 (0,013), $p = 0,0532$). Cette association était perdue quand les groupes de patients C/T et T/T étaient combinés. En comparant pour un état de rémission clinique, indiqué par un score SDAI inférieur ou égal à 3,3, nous avons observé une association très significative entre le génotype T/T et une probabilité augmentée d'entrer en rémission (GEE : 1,36 (1,13-1,64), $p = 0,0013$). Cette association n'existait pas pour le génotype hétérozygote C/T, ni pour les groupes combinés C/T et T/T. L'état de rémission clinique selon le SDAI, indiquant un niveau d'activité très faible, est l'issue visée par les traitements administrés aux patients de la cohorte ; lorsque l'état de rémission clinique est atteint, la progression du dommage radiographique menant au déclin fonctionnel est fortement réduite, et les patients éprouvent ainsi moins de douleur et de difficulté à effectuer leurs activités quotidiennes.

Nous n'avons pas observé d'association entre le polymorphisme rs4810485 et les facteurs reliés au dommage radiographique.

Nos résultats furent surprenants pour plusieurs raisons. D'abord, des études précédentes ont identifié une association entre le polymorphisme rs4810485 et une augmentation du dommage radiographique. De plus, les deux polymorphismes d'intérêt dans CD40, rs1883832 et rs4810485, étaient en déséquilibre de liaison assez marqué, ainsi nous nous étions attendus à des associations similaires avec les différentes issues de la maladie. Par contre nous avons observé tant une augmentation du déclin fonctionnel qu'une augmentation de la probabilité d'entrer en rémission clinique, deux associations qui à première vue ne sont pas compatibles.

Le polymorphisme rs4810485 est situé dans le premier intron du gène CD40, c'est-à-dire qu'il est contenu dans une séquence qui est retirée de l'ARN lors du processus d'épissage. Il ne s'agit donc pas d'une mutation codante. Par contre, les introns épissés peuvent participer à la régulation de l'expression génique, par exemple en codant de l'ARN n'encodant pas une protéine mais étant autrement fonctionnel. De plus, l'épissage alternatif peut permettre à certains introns d'être traduits en chaîne d'acides aminés et ainsi modifier la séquence du produit protéique final. Des études additionnelles visant à identifier la fonction exacte du polymorphisme rs4810485 dans l'expression de CD40 pourraient contribuer à élucider le rôle exact de ce récepteur dans le processus de progression de la polyarthrite rhumatoïde

9.4 Les allèles HLA-DR

Nous avons analysé la corrélation des allèles HLA-DR des patients de la cohorte, selon que ces allèles contiennent l'épitope partagé fréquemment associé à la polyarthrite rhumatoïde ou l'épitope protecteur DERA, avec les différentes issues d'intérêt pour cette étude.

9.4.1 L'épitope partagé

Nous avons observé chez les patients de la cohorte une corrélation entre les allèles HLA-DR comprenant l'épitope partagé et une augmentation du dommage radiographique, ainsi qu'une probabilité plus faible d'entrer en rémission.

En analysant les trois génotypes possibles concernant l'épitope partagé, soit double-négatif, hétérozygote, ou double-positif, nous avons observé chez les patients doubles-positifs (c'est-à-dire dont les deux allèles HLA-DR contiennent l'épitope partagé) une tendance non-significative vers un score d'érosions globalement plus élevé (GLM : 0,048 (0,027, $p = 0,0836$). Cette tendance n'était pas observée quand les deux groupes de patients possédant au moins une copie de l'épitope partagé étaient combinés en un groupe. En comparant pour un score d'érosions de 5 ou plus, indiquant une maladie érosive causant du dommage radiographique irréversible important, nous avons observé une tendance vers un score d'érosions de 5 ou plus pour les patients double-positifs (GEE : 1,30 (0,96-1,77), $p = 0,0875$), ainsi que pour le groupe combinant les patients hétérozygotes et les patients double-positifs (GEE : 1,2 (0,97-1,47), $p = 0,087$). Cette tendance était limitée spécifiquement au niveau des érosions osseuses : aucune association n'a été observée pour le score Sharp/van der Heijde total ni pour le score de pincements articulaires.

Nous avons également observé une corrélation non-significative vers une probabilité plus faible d'entrer en rémission clinique suite au traitement selon le SDAI, pour le groupe de patients double-positifs seulement (GEE : 0,7 (0,47-1,04), $p = 0,0783$). Cette tendance n'était par contre pas observée pour les patients hétérozygotes ou le groupe combinant les patients hétérozygotes et doubles-positifs. Nous n'avons également pas observé de tendance vers un score SDAI globalement plus élevé pour aucun des groupes.

Nous n'avons pas observé de corrélation entre la présence ou absence de l'épitope partagé et le niveau de déclin fonctionnel.

Ces observations sont relativement à l'encontre des résultats proposés par plusieurs études concernant d'autres cohortes; ces études rapportaient plutôt une association avec du dommage radiographique plus important. Les résultats que nous avons obtenus dans le cadre de cette étude s'alignent cependant avec les résultats obtenus précédemment pour notre cohorte EUPA, qui suggèrent que le rôle de l'épitope partagé se concentre plutôt au niveau du développement de la maladie, et non de sa progression (De Rycke *et al.*, 2004). Néanmoins nos observations indiquent une tendance nette vers une augmentation du dommage radiographique et une probabilité moindre d'entrer en rémission clinique, suggérant que la progression de la maladie n'est toutefois pas totalement indépendante de la présence ou l'absence de l'épitope partagé.

La fonction exacte de l'épitope partagé dans la pathogenèse et la progression de la polyarthrite rhumatoïde reste à être identifiée avec précision ; plusieurs hypothèses existent pour son rôle, proposant généralement que la fonction de l'épitope partagé se situe soit au niveau d'une altération de la promotion de réponses immunitaires adaptatives, soit à la présentation d'antigènes arthritogéniques, ou encore à la sélection du répertoire des lymphocytes T (De Almeida *et al.*, 2010, Holoshitz, 2010). Nos observations supportent l'épitope partagé en tant que marqueur d'intérêt pour une maladie plus sévère.

9.4.2 L'épitope protecteur DERAA

Nos résultats démontrent une association entre l'épitope protecteur DERAA et une réduction du dommage radiographique, une réduction du déclin fonctionnel, et une probabilité plus élevée d'entrer en rémission clinique.

Nous avons observé une association significative entre la présence d'au moins une copie de l'épitope protecteur DERAA et un score Sharp/van der Heijde total globalement plus faible que les patients double-négatifs, et ce, tant en analysant les trois génotypes possibles en tant que groupes distincts (GLM : -0,101 (0,040), $p = 0,0130$) qu'en combinant les patients hétérozygotes et double-positifs en un seul groupe (GLM : -0,112 (0,045), $p = 0,0139$). Vu le faible nombre de patients double-positifs (14 patients sur un total de 615, soit 2,3% des patients), les analyses suivantes seront présentées en tenant compte seulement du groupe combinant tous les patients dont les allèles HLA-DR comprennent au moins une copie de l'épitope protecteur DERAA. Nous avons également observé une association significative entre l'épitope protecteur DERAA et un score d'érosions continu réduit (GLM : -0,095 (0,040), $p = 0,0173$), ainsi qu'un score de pincements articulaires continu réduit (GLM : -0,08 (0,041), $p =$

0,0481). En comparant les groupes pour un score Sharp/van der Heijde de 5 ou plus, indiquant une maladie causant du dommage radiographique significatif, nous avons observé une tendance près du seuil de la significativité entre l'épitope protecteur DERA A et un score Sharp/van der Heijde inférieur à 5, indiquant une maladie causant du dommage radiographique moins important (GEE : 0,85 (0,72-1,01), $p = 0,0681$). Nous avons également observé une association significative entre l'épitope protecteur DERA A et un score d'érosions inférieur à 5 (GEE : 0,75 (0,58-0,96), $p = 0,0226$), et une association significative entre l'épitope protecteur DERA A et un score de pincements articulaires inférieur à 5 (GEE : 0,74 (0,56-0,98), $p = 0,0362$). Globalement, les résultats des analyses concernant l'épitope protecteur DERA A s'alignent avec des résultats précédents publiés pour cette cohorte (Carrier *et al.*, 2009).

Nous avons observé une corrélation près du seuil de significativité entre la présence d'au moins une copie de l'épitope protecteur et un score M-HAQ inférieur au seuil 1,0 (GEE : 0,79 (0,61-1,02), $p = 0,0693$), indiquant que les patients dont les allèles HLA-DR comprennent au moins une copie de l'épitope protecteur DERA A ont tendance à éprouver moins de difficulté à effectuer leurs activités quotidiennes que les patients double-négatifs. Nous n'avons pas observé d'association ou de tendance en analysant le score M-HAQ continu.

Il existe une association significative entre la présence d'au moins une copie de l'épitope protecteur DERA A et une probabilité augmentée d'entrer en rémission clinique suite au traitement, selon l'échelle SDAI et le seuil de 3,3 ou moins (GEE : 1,19 (1,01-1,40), $p = 0,0434$). Nous n'avons pas observé d'association significative en analysant le score SDAI continu, mais avons par contre observé une tendance non-significative vers un score SDAI plus faible en analysant les trois génotypes possibles en tant que groupes distincts (GLM : -0,037 (0,021), $p = 0,0867$).

Le rôle précis de l'épitope protecteur DERA A dans la progression de la polyarthrite rhumatoïde n'a pas encore été identifié. Nous avons observé que l'effet protecteur de l'épitope DERA A est présent chez plusieurs patients hétérozygotes pour DERA A et pour l'épitope partagé, ce qui suggère que l'effet protecteur de l'épitope DERA A ne se limite pas à simplement annuler l'effet de l'épitope partagé. Nous avons identifié des associations significatives démontrant que les patients dont les allèles HLA-DR contiennent au moins une copie de l'épitope protecteur DERA A font l'expérience d'une maladie moins sévère, tant au niveau du dommage radiographique (réduit) qu'au niveau de l'incapacité fonctionnelle (réduit), et ont une probabilité plus élevée d'entrer en rémission clinique suite au traitement.

9.5 Combinaisons de marqueurs

Nos résultats démontrent que la combinaison de deux marqueurs, soit l'épitope protecteur DERRA et le génotype majeur homozygote C/C aux deux polymorphismes dans la région promotrice du gène IL4, est associée à une réduction du dommage érosif, ainsi qu'à une probabilité plus élevée d'entrer en rémission clinique suite au traitement. Ces associations sont plus significatives pour les deux marqueurs combinés, que pour chaque marqueur analysé de façon individuelle.

Nous avons observé que les patients exprimant au moins une copie de l'épitope protecteur DERRA et le génotype C/C à rs2243250/rs2070874 ont un risque relatif très significativement réduit d'avoir un score érosif supérieur ou égal à 5 (GEE: 0,67 (0,51-0,90), $p=0,007$) aux différentes visites de suivi, comparativement aux patients n'exprimant pas ces deux biomarqueurs. Cette association est plus importante que celle que nous avons observée pour le génotype IL4 C/C seul (GEE: 0,80 (0,64-0,98), $p=0,034$) ou pour DERRA seul (GEE: 0,75 (0,58-0,96), $p=0,023$). Nous avons également observé que les patients possédant les deux biomarqueurs ont un risque relatif significativement plus élevé d'atteindre un état de rémission clinique selon le SDAI (GEE: 1,21 (1,02-1,44), $p=0,032$) comparativement aux patients n'exprimant pas ces marqueurs. Tout comme pour l'issue précédente, cette association était plus importante que celle que nous avons observée pour IL4 C/C seul (GEE: 1,04 (0,87-1,25), non-significatif) ou pour DERRA seul (GEE: 1,19 (1,02-1,40), $p=0,043$).

Le sous-groupe de patients exprimant l'épitope protecteur DERRA ainsi que le génotype C/C aux polymorphismes dans le promoteur d'IL4 représente 21,0% des patients analysés, ce qui en fait un groupe plus spécifique que celui comprenant seulement les patients DERRA-positifs (26,9%) ou le génotype IL4 C/C (71,6%). Ainsi, la valeur prédictive des analyses pour les marqueurs combinés démontre l'intérêt de typer ces allèles pour les patients de notre cohorte: ces patients ayant une probabilité significativement plus faible de développer une maladie très érosive, et une probabilité significativement plus élevée d'entrer en rémission clinique, les patients de ce sous-groupe sont probablement de bons candidats pour un traitement moins agressif que les patients ne faisant pas partie de ce sous-groupe.

Bien qu'il soit possible que les effets protecteurs de chacun de ces biomarqueurs ne soient pas reliés, compte tenu des fonctions reliées à l'activité des lymphocytes T de l'IL-4 et des molécules HLA-DR, il est probable que ces marqueurs aient un effet conjugué sur l'activation ou la différenciation des lymphocytes T auxiliaires. Des études plus approfondies concernant

l'interaction possible d'une expression différentielle de l'IL-4, qui pourrait altérer la proportion des phénotypes Th1 et Th2 des lymphocytes T, et de l'épitope protecteur DERA, qui inhibe potentiellement l'activité autoréactive des lymphocytes T, permettront d'élucider le rôle de ces biomarqueurs dans la progression moins agressive de la polyarthrite rhumatoïde.

Nos résultats démontrent que la combinaison du génotype C/C aux polymorphismes dans l'IL4, et du génotype majeur homozygote A/A au polymorphisme rs4810485 dans IL4R est également associée à une réduction du dommage érosif (GEE: 0,69 (0,50-0,96) $p=0,027$) et à une augmentation de la probabilité d'entrer en rémission clinique suite au traitement (GEE: 1,24 (1,03-1,50), $p=0,0267$) et que ces associations sont plus importantes que celle que nous avons observé pour IL4R A/A seul pour le dommage érosif (GEE: 0,89 (0,73-1,09), non significatif) ou pour l'activité de la maladie (GEE: 1,06 (0,90-1,25), non significatif), et pour DERA seul.

Le sous-groupe de patients IL4R A/A et IL4 C/C représente 14,9% des patients analysés, ce qui en fait un sous-groupe plus restreint que le sous-groupe précédent. Par contre, le pouvoir de prédiction de ces deux biomarqueurs est moins important que celui que nous avons observé pour la combinaison précédente. Compte tenu du rôle présumé du polymorphisme d'IL4R dans la modulation de l'activité du récepteur et de l'effet possible des polymorphismes d'IL4 sur l'expression de cette cytokine, il est probable que cette combinaison de marqueurs ait un effet conjugué sur le dommage érosif et le niveau d'activité de la maladie, deux paramètres qui sont intimement liés au niveau d'inflammation présent dans le synovium. Tout comme les patients du sous-groupe DERA-positif et IL4 C/C, les patients du sous-groupe IL4R A/A et IL4 C/C sont probablement des bons candidats pour un traitement moins agressif.

10 Conclusion

L'identification de biomarqueurs fiables permettant de prédire la progression de la polyarthrite chez les patients individuels demeure un objectif particulièrement pertinent pendant l'ère de la médecine personnalisée. Globalement, nos résultats démontrent que le génotypage des allèles HLA-DR des patients, ainsi que celui de polymorphismes d'intérêt dans IL4, IL4R, et CD40, peut fournir des informations importantes aux cliniciens lors du traitement des patients atteints de polyarthrite inflammatoire d'installation récente.

Spécifiquement, nous avons démontré que l'épitope protecteur DERA, présent au niveau des molécules HLA-DR de certains patients, est associé à un score érosif et d'activité de la maladie réduits. Nous avons démontré que l'allèle atypique T à deux polymorphismes du promoteur de

l'IL-4, rs2243250 et rs2070874, est associé à une augmentation du dommage érosif et de l'incapacité fonctionnelle. Nous avons démontré que l'allèle atypique G au polymorphisme rs4810485 dans le récepteur de l'IL-4 est associé à une réduction du dommage radiographique. Nous avons démontré que l'allèle atypique T au polymorphisme rs1883832 dans CD40 est associé à une augmentation du déclin fonctionnel, et que l'allèle atypique T au polymorphisme rs4810485 dans CD40 est observé à une augmentation de la probabilité de rémission.

Il serait à noter que les résultats obtenus lors d'études d'association, particulièrement celles qui concernent les issues de diverses pathologies, sont fréquemment difficiles à reproduire dans d'autres populations. Il sera d'une grande importance de tenter de reproduire l'étude décrite ci-haut dans d'autres populations. Un avantage majeur de notre étude réside dans la simplicité de l'étape de génotypage elle-même. Ainsi, les paramètres que nous avons présentés peuvent être ajoutés à la trousse à outils des cliniciens supervisant d'autres cohortes de patients RA relativement facilement.

La possibilité d'optimiser les traitements administrés aux patients atteints d'arthrite rhumatoïde est d'un intérêt particulier d'un point de vue de médecine personnalisée. Effectivement, l'ajout de biomarqueurs validés et fiables à la trousse d'outils des cliniciens pourrait leur permettre d'effectuer peu après le diagnostic, et d'utiliser les résultats obtenus pour diriger le schéma thérapeutique du patient. Par exemple, un patient présentant plusieurs biomarqueurs d'une progression particulièrement sévère de la maladie pourrait bénéficier d'un traitement plus agressif. Vice versa, un patient présentant des signes d'une maladie plus atténuée pourrait être épargné des effets secondaires graves de certains traitements.

Il s'agit cependant toujours de décisions affectant un individu mais basées sur les résultats obtenus par des études concernant des populations. Un risque significatif existe donc, présentement, que l'association déterminée pour la population étudiée n'existe pas pour le patient individuel. Le degré de pénétrance du phénotype, c'est-à-dire la proportion d'individus possédant l'allèle atypique et exprimant le trait associé, reste à déterminer pour chacun des biomarqueurs d'intérêt. Nos résultats sont accompagnés de degrés de significativité élevés, indiquant une faible probabilité d'erreur.

Un suivi fréquent et compréhensif demeure nécessaire pour les patients recevant tout type de traitement, individualisé ou non, et les observations et données biologiques obtenues lors de ces visites de suivi contribueront à évaluer l'efficacité de prédiction des différents biomarqueurs pronostiques identifiés. Les cliniciens devront mettre en balance les bénéfices potentiels proposés par les biomarqueurs pronostiques, contre les risques associés aux traitements, par

exemple les effets secondaires graves de certains DMARDs, et le risque que la condition du patient ne dégénère plus rapidement que prédit et que du dommage irréversible ait lieu.

Enfin, il demeure d'une grande importance de poursuivre les recherches dans le domaine des biomarqueurs pronostiques. L'augmentation du pouvoir de prédiction des études d'associations, par exemple en augmentant le nombre d'individus inclus dans les populations d'intérêt, mènera à un plus grand degré de confiance quant aux résultats rapportés par ces études. De plus, le développement d'outils analytiques de plus en plus sophistiqués permettra l'inclusion d'un encore plus vaste ensemble de facteurs prédictifs.

Pour conclure, lors de ce projet nous avons identifié des biomarqueurs intéressants pour la prédiction de la progression de la polyarthrite rhumatoïde. Ces marqueurs viennent s'ajouter aux ressources dont disposent les cliniciens lors de leurs décisions concernant le traitement et le suivi des patients atteints de polyarthrite inflammatoire d'installation récente.

CHAPITRE 4 : BIBLIOGRAPHIE

- Ainola MM, Mandelin JA, Liljestrom MP, Li TF, Hukkanen MV & Konttinen YT (2005) Pannus invasion and cartilage degradation in rheumatoid arthritis: involvement of MMP-3 and interleukin-1beta. *Clinical and experimental rheumatology* 23(5):644-650.
- Akkad D, Arning L, Ibrahim S & Epplen J (2007) Sex specifically associated promoter polymorphism in multiple sclerosis affects interleukin 4 expression levels. *Genes and immunity* 8(8):703-706.
- Al-Muhsen S, Vazquez-Tello A, Alzaabi A, Al-Hajjaj MS, Al-Jahdali HH & Halwani R (2014) IL-4 receptor alpha single-nucleotide polymorphisms rs1805010 and rs1801275 are associated with increased risk of asthma in a Saudi Arabian population. *Annals of thoracic medicine* 9(2):81.
- Albers JM, Kuper HH, van Riel PL, Prevoo ML, van 't Hof MA, van Gestel AM & Severens JL (1999) Socio-economic consequences of rheumatoid arthritis in the first years of the disease. *Rheumatology (Oxford)* 38(5):423-430.
- Albert LJ & Inman RD (1999) Molecular mimicry and autoimmunity. *New England Journal of Medicine* 341(27):2068-2074.
- Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC & Spriggs MK (1993) CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J Exp Med* 178(2):669-674.
- Aletaha D, Funovits J & Smolen JS (2011) Physical disability in rheumatoid arthritis is associated with cartilage damage rather than bone destruction. *Annals of the rheumatic diseases* 70(5):733-739.
- Aletaha D, Funovits J, Ward MM, Smolen JS & Kvien TK (2009) Perception of improvement in patients with rheumatoid arthritis varies with disease activity levels at baseline. *Arthritis Rheum* 61(3):313-320.
- Aletaha D, Machold KP, Nell VP & Smolen JS (2006a) The perception of rheumatoid arthritis core set measures by rheumatologists. Results of a survey. *Rheumatology (Oxford)* 45(9):1133-1139.
- Aletaha D & Smolen J (2005a) The Simplified Disease Activity Index (SDAI) and the Clinical Disease Activity Index (CDAI): a review of their usefulness and validity in rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology* 23(5):S100.
- Aletaha D, Smolen J & Ward MM (2006b) Measuring function in rheumatoid arthritis: identifying reversible and irreversible components. *Arthritis & Rheumatism* 54(9):2784-2792.
- Aletaha D, Ward MM, Machold KP, Nell VP, Stamm T & Smolen JS (2005b) Remission and active disease in rheumatoid arthritis: defining criteria for disease activity states. *Arthritis Rheum* 52(9):2625-2636.
- Arican O, Aral M, Sasmaz S & Ciragil P (2005) Serum levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators of inflammation* 2005(5):273-279.
- Assmann G, Koenig J, Pfreundschuh M, Epplen JT, Kekow J, Roemer K & Wieczorek S (2010) Genetic variations in genes encoding RANK, RANKL, and OPG in rheumatoid arthritis: a case-control study. *The Journal of rheumatology* 37(5):900-904.

- Avci AB, Feist E & Burmester G-R (2015) Biologicals in rheumatoid arthritis: current and future. *RMD open* 1(1):e000127.
- Baecklund E, Iliadou A, Askling J, Ekblom A, Backlin C, Granath F, Catrina AI, Rosenquist R, Feltelius N, Sundstrom C & Klareskog L (2006) Association of chronic inflammation, not its treatment, with increased lymphoma risk in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54(3):692-701.
- Balsa A, Del Amo J, Blanco F, Caliz R, Silva L, Sanmarti R, Martinez FG, Tejedor D, Artieda M, Pascual-Salcedo D, Oreiro N, Collado MD, Andreu JL, Graell E, Simon L, Martinez A & Mulero J (2010) Prediction of functional impairment and remission in rheumatoid arthritis patients by biochemical variables and genetic polymorphisms. *Rheumatology (Oxford)* 49(3):458-466.
- Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Brie F, Galizzi JP, Van Kooten C, Liu Y, Rousset F & Saeland S (1994) The CD40 antigen and its ligand. *Annual review of immunology* 12(1):881-926.
- Banchuin N, Janyapoon K, Sarntivijai S & Parivisutt L (1992) Re-evaluation of ELISA and latex agglutination test for rheumatoid factor detection in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Asian Pac J Allergy Immunol* 10(1):47-54.
- Barrett EM, Scott DG, Wiles NJ & Symmons DP (2000) The impact of rheumatoid arthritis on employment status in the early years of disease: a UK community-based study. *Rheumatology (Oxford)* 39(12):1403-1409.
- Beck S & Trowsdale J (2000) The human major histocompatibility complex: lessons from the DNA sequence. *Annual review of genomics and human genetics* 1(1):117-137.
- Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM & Spoerke JM (2004) A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *The American Journal of Human Genetics* 75(2):330-337.
- Bhayani HR & Hedrick SM (1991) The role of polymorphic amino acids of the MHC molecule in the selection of the T cell repertoire. *J Immunol* 146(4):1093-1098.
- Birnbaum H, Pike C, Kaufman R, Marynchenko M, Kidolezi Y & Cifaldi M (2010) Societal cost of rheumatoid arthritis patients in the US. *Curr Med Res Opin* 26(1):77-90.
- Bjorkman P, MA S, Samraoui B, Bennett W, Strominger J & Wiley D (1987a) Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329:506-512.
- Bjorkman P & Parham P (1990) Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annual review of biochemistry* 59(1):253-288.
- Bjorkman P, Saper M, Samraoui B, Bennett W, Strominger J & Wiley D (1987b) The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329(6139):512-518.
- Blanco-Kelly F, Matesanz F, Alcina A, Teruel M, Díaz-Gallo LM, Gómez-García M, López-Nevot MA, Rodrigo L, Nieto A & Cardeña C (2010) CD40: novel association with Crohn's disease and replication in multiple sclerosis susceptibility. *PloS one* 5(7):e11520.
- Boire G, Cossette P, de Brum-Fernandes AJ, Liang P, Niyonsenga T, Zhou ZJ, Carrier N, Daniel C & Menard HA (2005) Anti-Sa antibodies and antibodies against cyclic

- citrullinated peptide are not equivalent as predictors of severe outcomes in patients with recent-onset polyarthritis. *Arthritis Res Ther* 7(3):R592-603.
- Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL & Montori V (2006) Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *Jama* 295(19):2275-2285.
- Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, MacMurray J, Meloni GF, Lucarelli P, Pellecchia M, Eisenbarth GS, Comings D & Mustelin T (2004) A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 36(4):337-338.
- Braselmann S, Taylor V, Zhao H, Wang S, Sylvain C, Baluom M, Qu K, Herlaar E, Lau A, Young C, Wong BR, Lovell S, Sun T, Park G, Argade A, Jurcevic S, Pine P, Singh R, Grossbard EB, Payan DG & Masuda ES (2006) R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks fc receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 319(3):998-1008.
- Brinkman B, Huizinga T, Kurban S, Van der Velde E, Schreuder G, Hazes J, Breedveld F & Verweij C (1997) Tumour necrosis factor alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease? *Rheumatology* 36(5):516-521.
- Brown A, Conaghan PG, Karim Z, Quinn MA, Ikeda K, Peterfy CG, Hensor E, Wakefield RJ, O'Connor PJ & Emery P (2008) An explanation for the apparent dissociation between clinical remission and continued structural deterioration in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 58(10):2958-2967.
- Brown J, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL & Wiley DC (1993) Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364(6432):33-39.
- Bruce B & Fries JF (2003) The Stanford Health Assessment Questionnaire: dimensions and practical applications. *Health Qual Life Outcomes* 1:20.
- Buchs N, Di Giovine F, Silvestri T, Vannier E, Duff G & Miossec P (2001) IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. *Genes and immunity* 2(4):222-228.
- Bukhari M, Wiles N, Lunt M, Harrison B, Scott D, Symmons D & Silman A (2003) Influence of disease-modifying therapy on radiographic outcome in inflammatory polyarthritis at five years: results from a large observational inception study. *Arthritis & Rheumatism* 48(1):46-53.
- Bürgis S (2006) *Interleukin-4 Receptor Signal Transduction: Involvement of P62*. (PhD thesis. University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen).
- Burgos PI, Causey ZL, Tamhane A, Kelley JM, Brown EE, Hughes LB, Danila MI, van Everdingen A, Conn DL & Jonas BL (2010) Research article Association of IL4R single-nucleotide polymorphisms with rheumatoid nodules in African Americans with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 12:1-7.
- Burn GL, Svensson L, Sanchez-Blanco C, Saini M & Cope AP (2011) Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? *FEBS Lett* 585(23):3689-3698.

- Burton W, Morrison A, Maclean R & Ruderman E (2006) Systematic review of studies of productivity loss due to rheumatoid arthritis. *Occupational Medicine* 56(1):18-27.
- Cantaert T, Brouard S, Thurlings RM, Pallier A, Salinas GF, Braud C, Klarenbeek PL, de Vries N, Zhang Y, Soullillou JP, Tak PP & Baeten D (2009) Alterations of the synovial T cell repertoire in anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 60(7):1944-1956.
- Cantagrel A, Navaux F, Loubet-Lescoulié P, Nourhashemi F, Enault G, Abbal M, Constantin A, Laroche M & Mazières B (1999) Interleukin-1 β , interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: Relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 42(6):1093-1100.
- Caporali R, Caprioli M, Bobbio-Pallavicini F & Montecucco C (2008) DMARDs and infections in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity reviews* 8(2):139-143.
- Carmona L, Gomez-Reino JJ, Rodriguez-Valverde V, Montero D, Pascual-Gomez E, Mola EM, Carreno L, Figueroa M & Group B (2005) Effectiveness of recommendations to prevent reactivation of latent tuberculosis infection in patients treated with tumor necrosis factor antagonists. *Arthritis Rheum* 52(6):1766-1772.
- Carrier N, Cossette P, Daniel C, de Brum-Fernandes A, Liang P, Ménard HA & Boire G (2009) The DERA HLA-DR alleles in patients with early polyarthritis: protection against severe disease and lack of association with rheumatoid arthritis autoantibodies. *Arthritis & Rheumatism* 60(3):698-707.
- Carrier N, Marotta A, de Brum-Fernandes AJ, Liang P, Masetto A, Ménard HA, Maksymowych WP & Boire G (2016) Serum levels of 14-3-3 η protein supplement C-reactive protein and rheumatoid arthritis-associated antibodies to predict clinical and radiographic outcomes in a prospective cohort of patients with recent-onset inflammatory polyarthritis. *Arthritis research & therapy* 18(1):1.
- Carson DA, Chen PP & Kipps TJ (1991) New roles for rheumatoid factor. *J Clin Invest* 87(2):379-383.
- Carson DA, Pasquali JL, Tsoukas CD, Fong S, Slovin SF, Lawrance SK, Slaughter L & Vaughan JH (1981) Physiology and pathology of rheumatoid factors. *Springer Semin Immunopathol* 4(2):161-179.
- Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I & Banchereau J (1994) Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 180(4):1263-1272.
- Cerhan JR, Wang S, Maurer MJ, Ansell SM, Geyer SM, Cozen W, Morton LM, Davis S, Severson RK, Rothman N, Lynch CF, Wacholder S, Chanock SJ, Habermann TM & Hartge P (2007) Prognostic significance of host immune gene polymorphisms in follicular lymphoma survival. *Blood* 109(12):5439-5446.
- Chabaud M, Garnero P, Dayer J-M, Guerne P-A, Fossiez F & Miossec P (2000) Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis. *Cytokine* 12(7):1092-1099.
- Challener GJ, Jones JD, Pelzek AJ, Hamilton BJ, Boire G, de Brum-Fernandes AJ, Masetto A, Carrier N, Ménard HA & Silverman GJ (2016) Anti-carbamylated Protein Antibody Levels Correlate with Anti-Sa (Citrullinated Vimentin) Antibody Levels in Rheumatoid Arthritis. *The Journal of rheumatology* 43(2):273-281.

- Chang K, Yang SM, Kim SH, Han KH, Park SJ & Shin JI (2014) Smoking and rheumatoid arthritis. *International journal of molecular sciences* 15(12):22279-22295.
- Chen JM, Guo J, Wei CD, Wang CF, Luo HC, Wei YS & Lan Y (2015) The association of CD40 polymorphisms with CD40 serum levels and risk of systemic lupus erythematosus. *BMC Genet* 16:121.
- Chernoff AE, Granowitz EV, Shapiro L, Vannier E, Lonnemann G, Angel JB, Kennedy JS, Rabson AR, Wolff SM & Dinarello CA (1995) A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses. *The Journal of Immunology* 154(10):5492-5499.
- Chikanza IC (2002) Mechanisms of Corticosteroid Resistance in Rheumatoid Arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 966(1):39-48.
- Choo SY (2007) The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei medical journal* 48(1):11-23.
- Choy EH & Scott DL (1995) Prognostic markers in rheumatoid arthritis and classification of antirheumatic therapies. *Drugs* 50(1):15-25.
- Cloutier J-F & Veillette A (1999) Cooperative inhibition of T-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase. *The Journal of experimental medicine* 189(1):111-121.
- Coffman RL (2013) Converging discoveries: the first reports of IL-4. *The Journal of Immunology* 190(3):847-848.
- Cohen G, Gossec L, Dougados M, Cantagrel A, Goupille P, Daures JP, Rincheval N & Combe B (2007) Radiological damage in patients with rheumatoid arthritis on sustained remission. *Annals of the rheumatic diseases* 66(3):358-363.
- Cohen S, Dadi H, Shaoul E, Sharfe N & Roifman CM (1999) Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, Lyp. *Blood* 93(6):2013-2024.
- Cojocaru M, Cojocaru IM, Silosi I, Vrabie CD & Tanasescu R (2010) Extra-articular Manifestations in Rheumatoid Arthritis. *Maedica (Buchar)* 5(4):286-291.
- Corper AL, Sohi MK, Bonagura VR, Steinitz M, Jefferis R, Feinstein A, Beale D, Taussig MJ & Sutton BJ (1997) Structure of human IgM rheumatoid factor Fab bound to its autoantigen IgG Fc reveals a novel topology of antibody-antigen interaction. *Nat Struct Biol* 4(5):374-381.
- Coutinho AE & Chapman KE (2011) The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol* 335(1):2-13.
- Crotty S (2015) A brief history of T cell help to B cells. *Nature Reviews Immunology* 15(3):185-189.
- D'Amelio AM, Monroy C, El-Zein R & Etzel CJ (2012) Using haplotype analysis to elucidate significant associations between genes and Hodgkin lymphoma. *Leukemia research* 36(11):1359-1364.
- De Almeida D, Ling S & Holoshitz J (2011) New insights into the functional role of the rheumatoid arthritis shared epitope. *FEBS letters* 585(23):3619-3626.

- De Almeida D, Ling S, Pi X, Hartmann-Scruggs AM, Pumpens P & Holoshitz J (2010) Immune dysregulation by the rheumatoid arthritis shared epitope. *The Journal of Immunology* 185(3):1927-1934.
- de Rooy DP, van Nies JA, Kapetanovic MC, Kristjansdottir H, Andersson ML, Forslind K, van der Heijde DM, Gregersen PK, Lindqvist E, Huizinga TW, Grondal G, Svensson B & van der Helm-van Mil AH (2014) Smoking as a risk factor for the radiological severity of rheumatoid arthritis: a study on six cohorts. *Ann Rheum Dis* 73(7):1384-1387.
- De Rycke L, Peene I, Hoffman I, Kruithof E, Union A, Meheus L, Lebeer K, Wyns B, Vincent C & Mielants H (2004) Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. *Annals of the rheumatic diseases* 63(12):1587-1593.
- del Rincon ID, Williams K, Stern MP, Freeman GL & Escalante A (2001) High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis and rheumatism* 44(12):2737-2745.
- Despres N, Boire G, Lopez-Longo F & Menard H (1994) The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 21(6):1027-1033.
- Dinarello CA (2011) Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 117(14):3720-3732.
- Dixon WG & Symmons DP (2005) Does early rheumatoid arthritis exist? *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 19(1):37-53.
- Dobkin PL, Liu A, Abrahamowicz M, Carrier N, Brum-Fernandes AJ, Cossette P & Boire G (2013) Predictors of pain for patients with early inflammatory polyarthritis. *Arthritis care & research* 65(6):992-999.
- Doran MF, Crowson CS, Pond GR, O'Fallon WM & Gabriel SE (2002) Frequency of infection in patients with rheumatoid arthritis compared with controls: a population-based study. *Arthritis & Rheumatism* 46(9):2287-2293.
- Dörner T, Strand V, Castañeda-Hernández G, Ferraccioli G, Isaacs JD, Kvien TK, Martin-Mola E, Mittendorf T, Smolen JS & Burmester GR (2012) The role of biosimilars in the treatment of rheumatic diseases. *Annals of the rheumatic diseases*:annrheumdis-2012-202715.
- Durães C, Machado JC, Portela F, Rodrigues S, Lago P, Cravo M, Ministro P, Marques M, Cremers I & Freitas J (2012) Phenotype–genotype profiles in Crohn's disease predicted by genetic markers in autophagy-related genes (GOIA study II). *Inflammatory bowel diseases*.
- Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, Stevens RM & Shaw T (2004) Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350(25):2572-2581.
- Egan M, Brosseau L, Farmer M, Ouimet MA, Rees S, Wells G & Tugwell P (2003) Splints/orthoses in the treatment of rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev* 10.1002/14651858.CD004018(1):CD004018.
- El-Gabalawy HS & Wilkins JA (2004) Anti-Sa antibodies: prognostic and pathogenetic significance to rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 6(2):1.

- Engelhard VH (1994) Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 12(1):181-207.
- Erlich H, Lohman K, Mack S, Valdes A, Julier C, Mirel D, Noble J, Morahan G & Rich S (2009) Association analysis of SNPs in the IL4R locus with type I diabetes. *Genes and immunity* 10:S33-S41.
- Ernst E (2004) Musculoskeletal conditions and complementary/alternative medicine. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 18(4):539-556.
- Falk K, Rötzschke O, Stevanovic S, Jung G & Rammensee H-G (1991) Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351(6324):290-296.
- Feldmann M & Maini RN (2003) Lasker Clinical Medical Research Award. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Med* 9(10):1245-1250.
- Firestein G (2003) Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423:356-361.
- Firestein G, Yeo M & Zvaifler NJ (1995) Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. *Journal of Clinical Investigation* 96(3):1631.
- Fixe P & Praloran V (1997) Macrophage colony-stimulating-factor (M-CSF or CSF-1) and its receptor: structure-function relationships. *Eur Cytokine Netw* 8(2):125-136.
- Fuchs HA, Brooks RH, Callahan LF & Pincus T (1989) A simplified twenty-eight-joint quantitative articular index in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 32(5):531-537.
- Fukuda W, Yamazaki T, Akaogi T, Hayashi H, Kusakabe T, Tsubouchi Y, Kawahito Y, Inoue M & Yoshikawa T (2005) Malnutrition and disease progression in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 15(2):104-107.
- Fumagalli M, Pozzoli U, Cagliani R, Comi GP, Riva S, Clerici M, Bresolin N & Sironi M (2009) Parasites represent a major selective force for interleukin genes and shape the genetic predisposition to autoimmune conditions. *The Journal of experimental medicine* 206(6):1395-1408.
- Funovits J, Aletaha D, Bykerk V, Combe B, Dougados M, Emery P, Felson D, Hawker G, Hazes JM, Huizinga T, Kay J, Kvien TK, Smolen JS, Symmons D, Tak PP & Silman A (2010) The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: methodological report phase I. *Ann Rheum Dis* 69(9):1589-1595.
- Genovese MC, Jarosova K, Cieslak D, Alper J, Kivitz A, Hough DR, Maes P, Pineda L, Chen M & Zaidi F (2015) Apremilast in Patients With Active Rheumatoid Arthritis: A Phase II, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel-Group Study. *Arthritis Rheumatol* 67(7):1703-1710.
- Gettings L (2010) Psychological well-being in rheumatoid arthritis: a review of the literature. *Musculoskeletal Care* 8(2):99-106.
- Gomez-Reino JJ, Carmona L, Valverde VR, Mola EM, Montero MD & Group B (2003) Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk: a multicenter active-surveillance report. *Arthritis Rheum* 48(8):2122-2127.

- Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C & Hajeer AH (2002) Influence of human leukocyte antigen-DRB1 on the susceptibility and severity of rheumatoid arthritis. *Seminars in arthritis and rheumatism*. Elsevier, p 355-360.
- Goronzy JJ, Henel G, Sawai H, Singh K, Lee EB, Pryshchep S & Weyand CM (2005) Costimulatory pathways in rheumatoid synovitis and T-cell senescence. *Ann N Y Acad Sci* 1062:182-194.
- Gout T, Östör AJ & Nisar MK (2011) Lower gastrointestinal perforation in rheumatoid arthritis patients treated with conventional DMARDs or tocilizumab: a systematic literature review. *Clinical rheumatology* 30(11):1471-1474.
- Greene S, Watanabe K, Braatz-Trulson J & Lou L (1995) Inhibition of dihydroorotate dehydrogenase by the immunosuppressive agent leflunomide. *Biochem Pharmacol* 50(6):861-867.
- Gregersen PK, Silver J & Winchester RJ (1987) The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 30(11):1205-1213.
- Guler-Yuksel M, Allaart CF, Goekoop-Ruiterman YP, de Vries-Bouwstra JK, van Groenendaal JH, Mallee C, de Bois MH, Breedveld FC, Dijkmans BA & Lems WF (2009) Changes in hand and generalised bone mineral density in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 68(3):330-336.
- Guzian MC, Carrier N, Cossette P, de Brum-Fernandes AJ, Liang P, Ménard HA & Boire G (2010) Outcomes in recent-onset inflammatory polyarthritis differ according to initial titers, persistence over time, and specificity of the autoantibodies. *Arthritis care & research* 62(11):1624-1632.
- Habermann TM, Wang SS, Maurer MJ, Morton LM, Lynch CF, Ansell SM, Hartge P, Severson RK, Rothman N, Davis S, Geyer SM, Cozen W, Chanock SJ & Cerhan JR (2008) Host immune gene polymorphisms in combination with clinical and demographic factors predict late survival in diffuse large B-cell lymphoma patients in the pre-rituximab era. *Blood* 112(7):2694-2702.
- Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, Jakobsson PJ, Baum W, Nimmerjahn F, Szarka E, Sarmay G, Krumbholz G, Neumann E, Toes R, Scherer HU, Catrina AI, Klareskog L, Jurdic P & Schett G (2012) Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest* 122(5):1791-1802.
- He J, Ding Y, Feng M, Guo J, Sun X, Zhao J, Yu D & Li Z (2013) Characteristics of Sjogren's syndrome in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 52(6):1084-1089.
- Hecht C, Englbrecht M, Rech J, Schmidt S, Araujo E, Engelke K, Finzel S & Schett G (2014) Additive effect of anti-citrullinated protein antibodies and rheumatoid factor on bone erosions in patients with RA. *Annals of the rheumatic diseases* 10.1136/annrheumdis-2014-205428.
- Hermann E, Vogt P & Müller W (1986) [Rheumatoid factors of immunoglobulin classes IgA, IgG and IgM: methods of determination and clinical value]. *Schweiz Med Wochenschr* 116(38):1290-1297.
- Herrmann D, Jäger L, Hein G, Henzgen M & Schlenvoigt G (1991) IgE rheumatoid factor. Occurrence and diagnostic importance in comparison with IgM rheumatoid factor and circulating immune complexes. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1(5):302-307.

Hochberg MC, Chang RW, Dwosh I, Lindsey S, Pincus T & Wolfe F (1992) The American College of Rheumatology 1991 revised criteria for the classification of global functional status in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 35(5):498-502.

Holoshitz J (2010) The rheumatoid arthritis HLA-DRB1 shared epitope. *Current opinion in rheumatology* 22(3):293.

<http://gqinnovationcenter.com/index.aspx> (McGill University and Genome Quebec Innovation Centre.), <http://gqinnovationcenter.com/index.aspx>

<http://rheumatology.usherbrooke.ca/?q=scoressharp> (Sharp van der Heijde Score.), <http://rheumatology.usherbrooke.ca/?q=scoressharp> (Consulté le 2017-01-08)

[http://www.appliedcytometry.com/Sample Protocols/FlexMAP beads/FlexMAP ASPE Protocol .pdf](http://www.appliedcytometry.com/Sample%20Protocols/FlexMAP%20beads/FlexMAP%20ASPE%20Protocol.pdf) (Applied Cytometry Standard No-Wash ASPE Protocol.), [http://www.appliedcytometry.com/Sample Protocols/FlexMAP beads/FlexMAP ASPE Protocol.pdf](http://www.appliedcytometry.com/Sample%20Protocols/FlexMAP%20beads/FlexMAP%20ASPE%20Protocol.pdf)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (Primer3.), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

<http://www.premierbiosoft.com/primerplex/> (PrimerPlex.), <http://www.premierbiosoft.com/primerplex/>

[https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/2953 SSP Flyer.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/2953_SSP_Flyer.pdf) (

[https://tools.thermofisher.com/content/sfs/sspunitrays/1437 Cytokine00106986wrksht.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/sspunitrays/1437_Cytokine00106986wrksht.pdf) (

<https://www.idtdna.com/site> (Integrated DNA Technologies.), <https://www.idtdna.com/site>

<https://www.luminexcorp.com/research/instruments/luminex-100200/> (Luminex 100.), <https://www.luminexcorp.com/research/instruments/luminex-100200/>

<https://www.luminexcorp.com/research/instruments/xponent/> (xPONENT software.), <https://www.luminexcorp.com/research/instruments/xponent/>

<https://www.luminexcorp.com/research/reagents-and-accessories/magplex-tag-microspheres/> (MagPlex-TAG microspheres.), <https://www.luminexcorp.com/research/reagents-and-accessories/magplex-tag-microspheres/>

<https://www.neb.com/products/e0554-q5-site-directed-mutagenesis-kit> (NEBaseChanger.), <https://www.neb.com/products/e0554-q5-site-directed-mutagenesis-kit>

<https://www.onelambda.com/en/product/labtype-ss0.html> (LABType SSO.), <https://www.onelambda.com/en/product/labtype-ss0.html>

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/7892010>, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/7892010>

Iannuzzi L, Dawson N, Zein N & Kushner I (1983) Does drug therapy slow radiographic deterioration in rheumatoid arthritis? *New England Journal of Medicine* 309(17):1023-1028.

Inagaki M, Takahara H, Nishi Y, Sugawara K & Sato C (1989) Ca²⁺-dependent deimination-induced disassembly of intermediate filaments involves specific modification of the amino-terminal head domain. *J Biol Chem* 264(30):18119-18127.

Ioan-Facsinay A, el-Bannoudi H, Scherer HU, van der Woude D, Menard HA, Lora M, Trouw LA, Huizinga TW & Toes RE (2011) Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies are a

- collection of anti-citrullinated protein antibodies and contain overlapping and non-overlapping reactivities. *Ann Rheum Dis* 70(1):188-193.
- Iwakura Y & Ishigame H (2006) The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *The Journal of clinical investigation* 116(5):1218-1222.
- Jacobson E, Huber A, Akeno N, Sivak M, Li C, Concepcion E, Ho K & Tomer Y (2007) A CD40 Kozak sequence polymorphism and susceptibility to antibody-mediated autoimmune conditions: the role of CD40 tissue-specific expression. *Genes and immunity* 8(3):205-214.
- James CB & Uhl TL (2001) A review of articular cartilage pathology and the use of glucosamine sulfate. *J Athl Train* 36(4):413-419.
- Jefferis R & Mageed RA (1989) The specificity and reactivity of rheumatoid factors with human IgG. *Monogr Allergy* 26:45-60.
- Jick H, Myers MW & Dean AD (1995) The Risk of Sulfasalazine-and Mesalazine-Associated Blood Disorders. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 15(2):176-181.
- Johnsen AK, Plenge RM, Butty V, Campbell C, Dieguez-Gonzalez R, Gomez-Reino JJ, Shadick N, Weinblatt M, Gonzalez A & Gregersen PK (2008) A broad analysis of IL1 polymorphism and rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 58(7):1947-1957.
- Jones JD, Hamilton BJ, Challener GJ, de Brum-Fernandes AJ, Cossette P, Liang P, Masetto A, Ménard HA, Carrier N & Boyle DL (2014) Serum CXC motif chemokine 13 is elevated in early and established rheumatoid arthritis and correlates with rheumatoid factor levels. *Arthritis research & therapy* 16(2):1.
- Kahlenberg JM & Fox DA (2011) Advances in the medical treatment of rheumatoid arthritis. *Hand clinics* 27(1):11-20.
- Kempeni J (1999) Preliminary results of early clinical trials with the fully human anti-TNFalpha monoclonal antibody D2E7. *Ann Rheum Dis* 58 Suppl 1:170-72.
- King LK, Lee A & Anandacoomarasamy A (2012) Use of biological disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with concurrent rheumatic disease and hepatitis B. *Intern Med J* 42(5):523-531.
- Kinloch AJ, Lundberg K, Wait R, Wegner N, Lim NH, Zendman AJ, Saxne T, Malmstr V & Venables PJ (2008) Synovial fluid is a site of citrullination of autoantigens in inflammatory arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 58(8):2287-2295.
- Kinloch AJ, Lundberg KE, Moyes D & Venables PJ (2006) Pathogenic role of antibodies to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Expert review of clinical immunology* 2(3):365-375.
- Kirwan JR & Currey H (1983) Rheumatoid arthritis: disease-modifying antirheumatic drugs. *Clin Rheum Dis* 9(3):581-599.
- Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Källberg H, Bengtsson C, Grunewald J, Rönnelid J, Erlandsson Harris H, Ulfgren AK & Rantapää-Dahlqvist S (2006) A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis & Rheumatism* 54(1):38-46.
- Klein J & Sato A (2000) The HLA system. *New England Journal of Medicine* 343(10):702-709.

- Kochi Y, Suzuki A & Yamamoto K (2014) Genetic basis of rheumatoid arthritis: a current review. *Biochemical and biophysical research communications* 452(2):254-262.
- Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, Iwata T, Ohnishi H, Matozaki T & Kodama T (2004) Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* 428(6984):758-763.
- Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ & Penninger JM (1999) Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402(6759):304-309.
- Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N & Gillespie MT (1999) IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *The Journal of clinical investigation* 103(9):1345-1352.
- Krabben A, Wilson A, Rooy D, Zhernakova A, Brouwer E, Lindqvist E, Saxne T, Stoeken G, Nies J & Knevel R (2013) Brief report: Association of genetic variants in the IL4 and IL4R genes with the severity of joint damage in rheumatoid arthritis: a study in seven cohorts. *Arthritis & Rheumatism* 65(12):3051-3057.
- Krakauer T (2008) Nuclear factor-kappaB: fine-tuning a central integrator of diverse biologic stimuli. *Int Rev Immunol* 27(5):286-292.
- Kremer JM, Bloom BJ, Breedveld FC, Coombs JH, Fletcher MP, Gruben D, Krishnaswami S, Burgos-Vargas R, Wilkinson B, Zerbini CA & Zwillich SH (2009) The safety and efficacy of a JAK inhibitor in patients with active rheumatoid arthritis: Results of a double-blind, placebo-controlled phase IIa trial of three dosage levels of CP-690,550 versus placebo. *Arthritis Rheum* 60(7):1895-1905.
- Kruse S, Braun S & Deichmann KA (2002) Distinct signal transduction processes by IL-4 and IL-13 and influences from the Q551R variant of the human IL-4 receptor alpha chain. *Respir Res* 3(2002):24.
- Kuo NW, Lympny PA, Menezo V, Lagan AL, John S, Yeo TK, Liyanage S, du Bois RM, Welsh KI & Lightman S (2005) TNF-857T, a genetic risk marker for acute anterior uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(5):1565-1571.
- La Cava A, Nelson JL, Ollier W, MacGregor A, Keystone EC, Thorne JC, Scavulli JF, Berry CC, Carson DA & Albani S (1997) Genetic bias in immune responses to a cassette shared by different microorganisms in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Investigation* 100(3):658.
- Lan Q, Zheng T, Rothman N, Zhang Y, Wang SS, Shen M, Berndt SI, Zahm SH, Holford TR, Leaderer B, Yeager M, Welch R, Boyle P, Zhang B, Zou K, Zhu Y & Chanock S (2006) Cytokine polymorphisms in the Th1/Th2 pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 107(10):4101-4108.
- Lancaster GA, Dodd S & Williamson PR (2004) Design and analysis of pilot studies: recommendations for good practice. *Journal of evaluation in clinical practice* 10(2):307-312.
- Landewe R & van der Heijde D (2011) Joint space narrowing, cartilage and physical function: are we deceived by measurements and distributions? *Postgrad Med J* 87(1033):737-738.

- Leblanc-Trudeau C, Dobkin PL, Carrier N, Cossette P, de Brum-Fernandes AJ, Liang P, Masetto A & Boire G (2015) Depressive symptoms predict future simple disease activity index scores and simple disease activity index remission in a prospective cohort of patients with early inflammatory polyarthritis. *Rheumatology* 54(12):2205-2214.
- Leon AC, Davis LL & Kraemer HC (2011) The role and interpretation of pilot studies in clinical research. *Journal of psychiatric research* 45(5):626-629.
- Lillegraven S, van der Heijde D, Uhlig T, Kvien TK & Haavardsholm EA (2012) What is the clinical relevance of erosions and joint space narrowing in RA? *Nat Rev Rheumatol* 8(2):117-120.
- Loza MJ & Chang B-L (2007) Association between Q551R IL4R genetic variants and atopic asthma risk demonstrated by meta-analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120(3):578-585.
- Lundgren M, Persson U, Larsson P, Magnusson C, Smith C, Hammarström L & Severinson E (1989) Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells. *European journal of immunology* 19(7):1311-1315.
- MacDonald K, Nishioka Y, Lipsky PE & Thomas R (1997) Functional CD40 ligand is expressed by T cells in rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Investigation* 100(9):2404.
- Machold K, Stamm T, Nell V, Pflugbeil S, Aletaha D, Steiner G, Uffmann M & Smolen J (2007) Very recent onset rheumatoid arthritis: clinical and serological patient characteristics associated with radiographic progression over the first years of disease. *Rheumatology* 46(2):342-349.
- Maini R, St Clair EW, Breedveld F, Furst D, Kalden J, Weisman M, Smolen J, Emery P, Harriman G, Feldmann M & Lipsky P (1999) Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet* 354(9194):1932-1939.
- Maksymowych WP, Boire G, van Schaardenburg D, Wichuk S, Turk S, Boers M, Siminovitch KA, Bykerk V, Keystone E & Tak PP (2015) 14-3-3 η Autoantibodies: Diagnostic Use in Early Rheumatoid Arthritis. *The Journal of rheumatology* 42(9):1587-1594.
- Mannik M, Nardella FA & Sasso EH (1988) Rheumatoid factors in immune complexes of patients with rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 10(2-3):215-230.
- Marinou I, Till SH, Moore DJ & Wilson AG (2008) Lack of association or interactions between the IL-4, IL-4R α and IL-13 genes, and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 10(4):R80.
- Markenson JA (1991) Worldwide trends in the socioeconomic impact and long-term prognosis of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 21(2 Suppl 1):4-12.
- Marmor MF, Kellner U, Lai TY, Lyons JS & Mieler WF (2011) Revised recommendations on screening for chloroquine and hydroxychloroquine retinopathy. *Ophthalmology* 118(2):415-422.
- Maska L, Anderson J & Michaud K (2011) Measures of functional status and quality of life in rheumatoid arthritis: Health Assessment Questionnaire Disability Index (HAQ), Modified Health Assessment Questionnaire (MHAQ), Multidimensional Health Assessment Questionnaire (MDHAQ), Health Assessment Questionnaire II (HAQ-II), Improved

- Health Assessment Questionnaire (Improved HAQ), and Rheumatoid Arthritis Quality of Life (RAQoL). *Arthritis care & research* 63(S11):S4-S13.
- Matschke V, Murphy P, Lemmey AB, Maddison P & Thom JM (2010) Skeletal muscle properties in rheumatoid arthritis patients. *Med Sci Sports Exerc* 42(12):2149-2155.
- Mattey DL, Dawes PT, Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Thomson W, Hajeer AH & Ollier WE (2001) HLA-DRB1 alleles encoding an aspartic acid at position 70 protect against development of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28(2):232-239.
- Mazumdar S & Greenwald D (2009) Golimumab. *MAbs* 1(5):422-431.
- McInnes IB & Schett G (2011) The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine* 365(23):2205-2219.
- Mertens M & Singh JA (2009) Anakinra for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev* 10.1002/14651858.CD005121.pub3(1):CD005121.
- Meyer O, Labarre C, Dougados M, Goupille P, Cantagrel A, Dubois A, Nicaise-Roland P, Sibilia J & Combe B (2003) Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. *Annals of the rheumatic diseases* 62(2):120-126.
- Mia S, Warnecke A, Zhang XM, Malmström V & Harris R (2014) An optimized Protocol for Human M2 Macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF- β Yields a Dominant Immunosuppressive Phenotype. *Scandinavian journal of immunology* 79(5):305-314.
- Miossec P, Naviliat M, Dupuy d'Angeac A, Sany J & Banchereau J (1990) Low levels of interleukin-4 and high levels of transforming growth factor beta in rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum* 33(8):1180-1187.
- Mol F, Mol B, Ankum W, Van der Veen F & Hajenius P (2008) Current evidence on surgery, systemic methotrexate and expectant management in the treatment of tubal ectopic pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction update* 14(4):309-319.
- Moreland LW, Heck LW, Jr. & Koopman WJ (1997) Biologic agents for treating rheumatoid arthritis. Concepts and progress. *Arthritis Rheum* 40(3):397-409.
- Moreno I, Valenzuela A, Garcia A, Yelamos J, Sanchez B & Hernanz W (1996) Association of the shared epitope with radiological severity of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 23(1):6-9.
- Napolioni V, Natali A, Saccucci P & Lucarini N (2011) PTPN22 1858C> T (R620W) functional polymorphism and human longevity. *Molecular biology reports* 38(6):4231-4235.
- Newton J, Brown MA, Milicic A, Ackerman H, Darke C, Wilson JN, Wordsworth BP & Kwiatkowski D (2003) The effect of HLA-DR on susceptibility to rheumatoid arthritis is influenced by the associated lymphotoxin alpha-tumor necrosis factor haplotype. *Arthritis Rheum* 48(1):90-96.
- O'Dell JR (2002) Treating rheumatoid arthritis early: a window of opportunity? *Arthritis & Rheumatism* 46(2):283-285.
- Onishi RM & Gaffen SL (2010) Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* 129(3):311-321.

- Osiri M, Shea B, Robinson V, Suarez-Almazor M, Strand V, Tugwell P & Wells G (2003) Leflunomide for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review and metaanalysis. *The Journal of rheumatology* 30(6):1182-1190.
- Østergaard M, Pedersen SJ & Døhn UM (2008) Imaging in rheumatoid arthritis—status and recent advances for magnetic resonance imaging, ultrasonography, computed tomography and conventional radiography. *Best practice & research Clinical rheumatology* 22(6):1019-1044.
- Padyukov L, Hytonen AM, Smolnikova M, Hahn-Zoric M, Nilsson N, Hanson LA, Tarkowski A & Klareskog L (2004) Polymorphism in promoter region of IL10 gene is associated with rheumatoid arthritis in women. *J Rheumatol* 31(3):422-425.
- Palacios EH & Weiss A (2004) Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene* 23(48):7990-8000.
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang Y-H, Wang Y, Hood L, Zhu Z & Tian Q (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature immunology* 6(11):1133-1141.
- Pascual M, Nieto A, Mataran L, Balsa A, Pascual-Salcedo D & Martin J (2000) IL-6 promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 1(5):338-340.
- Pastinen T, Raitio M, Lindroos K, Tainola P, Peltonen L & Syvänen A-C (2000) A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays. *Genome research* 10(7):1031-1042.
- Paul WE & Zhu J (2010) How are TH2-type immune responses initiated and amplified? *Nature Reviews Immunology* 10(4):225-235.
- Pawlik A, Wrzesniewska J, Florczak M, Gawronska-Szklarz B & Herczynska M (2005) The IL-4 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology international* 26(1):48-51.
- Peppel K, Crawford D & Beutler B (1991) A tumor necrosis factor (TNF) receptor-IgG heavy chain chimeric protein as a bivalent antagonist of TNF activity. *J Exp Med* 174(6):1483-1489.
- Pepys MB & Hirschfield GM (2003) C-reactive protein: a critical update. *The Journal of clinical investigation* 111(12):1805-1812.
- Pincus T, Kathryn A, Gibson M & Castrejon I (2013) Update on methotrexate as the anchor drug for rheumatoid arthritis. *Bull Hosp Joint Dis* 71(Suppl 1):S9-19.
- Pincus T, Yazici Y, Sokka T, Aletaha D & Smolen JS (2003) Methotrexate as the "anchor drug" for the treatment of early rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology* 21(5; SUPP 31):S179-S185.
- Piotrowski P, Lianeri M, Wudarski M, Olesinska M & Jagodzinski PP (2013) Single nucleotide polymorphism of CD40 region and the risk of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 22(3):233-237.
- Prots I, Skapenko A, Wendler J, Mattyasovszky S, Yoné CL, Spriewald B, Burkhardt H, Rau R, Kalden JR & Lipsky PE (2006) Association of the IL4R single-nucleotide polymorphism I50V with rapidly erosive rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 54(5):1491-1500.
- Provenzano G (2002) Asymptomatic pulmonary involvement in RA. *Thorax* 57(2):187-188.

- Pryor WA & Stone K (1993) Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci* 686:12-27; discussion 27-18.
- Pugner KM, Scott DI, Holmes JW & Hieke K (2000) The costs of rheumatoid arthritis: an international long-term view. *Seminars in arthritis and rheumatism*. Elsevier, p 305-320.
- Qiu LJ, Ni J, Cen H, Wen PF, Zhang M, Liang Y, Pan HF, Mao C & Ye DQ (2015) Relationship between the IL-4 gene promoter-590C/T (rs2243250) polymorphism and susceptibility to autoimmune diseases: a meta - analysis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 29(1):48-55.
- Quinn M & Emery P (2003) Window of opportunity in early rheumatoid arthritis: possibility of altering the disease process with early intervention. *Clinical and experimental rheumatology* 21(5; SUPP 31):S154-S157.
- Rajagopalan PR, Zhang Z, McCourt L, Dwyer M, Benkovic SJ & Hammes GG (2002) Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: ensemble and single-molecule kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(21):13481-13486.
- Rall LC & Roubenoff R (2004) Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. *Rheumatology (Oxford)* 43(10):1219-1223.
- Ramos-Remus C, Duran-Barragan S & Castillo-Ortiz JD (2012) Beyond the joints: neurological involvement in rheumatoid arthritis. *Clinical rheumatology* 31(1):1-12.
- Raychaudhuri S, Remmers EF, Lee AT, Hackett R, Guiducci C, Burtt NP, Gianniny L, Korman BD, Padyukov L & Kurreeman FA (2008) Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. *Nature genetics* 40(10):1216-1223.
- Raychaudhuri S, Sandor C, Stahl EA, Freudenberg J, Lee H-S, Jia X, Alfredsson L, Padyukov L, Klareskog L & Worthington J (2012) Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nature genetics* 44(3):291-296.
- Raza K, Falciani F, Curnow SJ, Ross EJ, Lee C-Y, Akbar AN, Lord JM, Gordon C, Buckley CD & Salmon M (2005) Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis Res Ther* 7(4):R784-795.
- Rego-Perez I, Fernandez-Moreno M & Blanco FJ (2008) Gene polymorphisms and pharmacogenetics in rheumatoid arthritis. *Curr Genomics* 9(6):381-393.
- Rennie KL, Hughes J, Lang R & Jebb SA (2003) Nutritional management of rheumatoid arthritis: a review of the evidence. *J Hum Nutr Diet* 16(2):97-109.
- Rhen T & Cidlowski JA (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. *New England Journal of Medicine* 353(16):1711-1723.
- Rogers GE (1962) Occurrence of citrulline in proteins. *Nature* 194:1149-1151.
- Roosnek E & Lanzavecchia A (1991) Efficient and selective presentation of antigen-antibody complexes by rheumatoid factor B cells. *J Exp Med* 173(2):487-489.
- Ruderman EM (2012a) Overview of safety of non-biologic and biologic DMARDs. *Rheumatology* 51(suppl 6):vi37-vi43.
- Ruderman EM (2012b) Overview of safety of non-biologic and biologic DMARDs. *Rheumatology (Oxford)* 51 Suppl 6:vi37-43.

- Ruiz Garcia V, Jobanputra P, Burls A, Cabello JB, Galvez Munoz JG, Saiz Cuenca ES & Fry-Smith A (2011) Certolizumab pegol (CDP870) for rheumatoid arthritis in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 10.1002/14651858.CD007649.pub2(2):CD007649.
- Saevarsdottir S, Rezaei H, Geborek P, Petersson I, Ernestam S, Albertsson K, Forslind K, van Vollenhoven RF & group Ss (2015) Current smoking status is a strong predictor of radiographic progression in early rheumatoid arthritis: results from the SWEFOT trial. *Ann Rheum Dis* 74(8):1509-1514.
- Salliot C, Dougados M & Gossec L (2009) Risk of serious infections during rituximab, abatacept and anakinra treatments for rheumatoid arthritis: meta-analyses of randomised placebo-controlled trials. *Annals of the rheumatic diseases* 68(1):25-32.
- Salmond RJ, Filby A, Qureshi I, Caserta S & Zamoyska R (2009) T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance. *Immunological reviews* 228(1):9-22.
- Sathi N, Chikura B, Kaushik VV, Wiswell R & Dawson JK (2012) How common is methotrexate pneumonitis? A large prospective study investigates. *Clinical rheumatology* 31(1):79-83.
- Sattar N & McInnes IB (2005) Vascular comorbidity in rheumatoid arthritis: potential mechanisms and solutions. *Curr Opin Rheumatol* 17(3):286-292.
- Schellekens G, de Jong BA, van den Hoogen FH, Van de Putte L & van Venrooij WJ (1998) Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *Journal of Clinical Investigation* 101(1):273.
- Schellekens H (2004) How similar do 'biosimilars' need to be? *Nature biotechnology* 22(11):1357-1359.
- Scher JU & Abramson SB (2011) The microbiome and rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7(10):569-578.
- Schett G & Gravallese E (2012) Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol* 8(11):656-664.
- Schnabel A & Gross WL (1994) Low-dose methotrexate in rheumatic diseases--efficacy, side effects, and risk factors for side effects. *Semin Arthritis Rheum* 23(5):310-327.
- Schoof N, von Bonin F, Zeynalova S, Ziepert M, Jung W, Loeffler M, Pfreundschuh M, Trumper L & Kube D (2009) Favorable impact of the interleukin-4 receptor allelic variant I75 on the survival of diffuse large B-cell lymphoma patients demonstrated in a large prospective clinical trial. *Ann Oncol* 20(9):1548-1554.
- Schulze-Koops H & Kalden JR (2001) The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 15(5):677-691.
- Scott D, Coulton B, Symmons D & Popert A (1987) Long-term outcome of treating rheumatoid arthritis: results after 20 years. *The Lancet* 329(8542):1108-1111.
- Scott D, Grindulis K, Struthers G, Coulton B, Popert A & Bacon P (1984) Progression of radiological changes in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 43(1):8-17.
- Scott D & Houssien D (1996) Joint assessment in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 35(suppl 2):14-18.

- Setoguchi S, Solomon DH, Weinblatt ME, Katz JN, Avorn J, Glynn RJ, Cook EF, Carney G & Schneeweiss S (2006) Tumor necrosis factor alpha antagonist use and cancer in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54(9):2757-2764.
- Shinomiya N, Kuratsuji T & Yata J (1989) The role of T cells in immunoglobulin class switching of specific antibody production system in vitro in humans. *Cell Immunol* 118(2):239-249.
- Shizu M, Itoh Y, Sunahara R, Chujo S, Hayashi H, Ide Y, Takii T, Koshiko M, Chung SW & Hayakawa K (2007) Cigarette smoke condensate upregulates the gene and protein expression of proinflammatory cytokines in human fibroblast-like synoviocyte line. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 28(8):509-522.
- Silman A, MacGregor A, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A & Ollier W (1993) Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Rheumatology* 32(10):903-907.
- Silman A & Pearson JE (2002) Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 4(3):S265.
- Siminovitch KA (2004) PTPN22 and autoimmune disease. *Nature genetics* 36(12):1248-1249.
- Singh JA, Furst DE, Bharat A, Curtis JR, Kavanaugh AF, Kremer JM, Moreland LW, O'Dell J, Winthrop KL, Beukelman T, Bridges SL, Jr., Chatham WW, Paulus HE, Suarez-Almazor M, Bombardier C, Dougados M, Khanna D, King CM, Leong AL, Matteson EL, Schousboe JT, Moynihan E, Kolba KS, Jain A, Volkman ER, Agrawal H, Bae S, Mudano AS, Patkar NM & Saag KG (2012) 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 64(5):625-639.
- Singh JA, Wells GA, Christensen R, Tanjong Ghogomu E, Maxwell L, Macdonald JK, Filippini G, Skoetz N, Francis D, Lopes LC, Guyatt GH, Schmitt J, La Mantia L, Weberschock T, Roos JF, Siebert H, Hershan S, Lunn MP, Tugwell P & Buchbinder R (2011a) Adverse effects of biologics: a network meta-analysis and Cochrane overview. *Cochrane Database Syst Rev* 10.1002/14651858.CD008794.pub2(2):CD008794.
- Singh JA, Wells GA, Christensen R, Tanjong Ghogomu E, Maxwell LJ, MacDonald JK, Filippini G, Skoetz N, Francis DK & Lopes LC (2011b) Adverse effects of biologics: a network meta-analysis and Cochrane overview. *The Cochrane Library*.
- Singh RR (2003) IL-4 and many roads to lupuslike autoimmunity. *Clinical immunology* 108(2):73-79.
- Smolen JS (2016) Treat-to-target as an approach in inflammatory arthritis. *Current opinion in rheumatology* 28(3):297-302.
- Smolen JS & Aletaha D (2015) Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies, opportunities and challenges. *Nature Reviews Rheumatology* 11(5):276-289.
- Smolen JS, Aletaha D, Grisar JC, Stamm TA & Sharp JT (2010a) Estimation of a numerical value for joint damage-related physical disability in rheumatoid arthritis clinical trials. *Annals of the rheumatic diseases* 69(6):1058-1064.
- Smolen JS, Breedveld FC, Burmester GR, Bykerk V, Dougados M, Emery P, Kvien TK, Navarro-Compán MV, Oliver S & Schoels M (2016) Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. *Annals of the rheumatic diseases* 75(1):3-15.

- Smolen JS, Breedveld FC, Schiff MH, Kalden JR, Emery P, Eberl G, van Riel PL & Tugwell P (2003) A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatology (Oxford)* 42(2):244-257.
- Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC, Buch M, Burmester G, Dougados M, Emery P, Gaujoux-Viala C, Gossec L, Nam J, Ramiro S, Winthrop K, de Wit M, Aletaha D, Betteridge N, Bijlsma JW, Boers M, Buttgerit F, Combe B, Cutolo M, Damjanov N, Hazes JM, Kouloumas M, Kvien TK, Mariette X, Pavelka K, van Riel PL, Rubbert-Roth A, Scholte-Voshaar M, Scott DL, Sokka-Isler T, Wong JB & van der Heijde D (2014a) EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis* 73(3):492-509.
- Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, Dougados M, Emery P, Gaujoux-Viala C, Gorter S, Knevel R, Nam J & Schoels M (2010b) EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Annals of the rheumatic diseases* 69(6):964-975.
- Smolen JS, van der Heijde D, Machold KP, Aletaha D & Landewe R (2014b) Proposal for a new nomenclature of disease-modifying antirheumatic drugs. *Annals of the rheumatic diseases* 73(1):3-5.
- Sokka T & Pincus T (2005) Quantitative joint assessment in rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology* 23(5):S58.
- Sokol CL, Barton GM, Farr AG & Medzhitov R (2008) A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nature immunology* 9(3):310-318.
- Sopori M (2002) Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nature Reviews Immunology* 2(5):372-377.
- Stenstrom CH & Minor MA (2003) Evidence for the benefit of aerobic and strengthening exercise in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 49(3):428-434.
- Stern LJ & Wiley DC (1994) Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Structure* 2(4):245-251.
- Steultjens EM, Dekker J, Bouter LM, van Schaardenburg D, van Kuyk MA & van den Ende CH (2002) Occupational therapy for rheumatoid arthritis: a systematic review. *Arthritis and rheumatism* 47(6):672-685.
- Sutton B, Corper A, Bonagura V & Taussig M (2000) The structure and origin of rheumatoid factors. *Immunol Today* 21(4):177-183.
- Takahara H, Kusubata M, Tsuchida M, Kohsaka T, Tagami S & Sugawara K (1992) Expression of peptidylarginine deiminase in the uterine epithelial cells of mouse is dependent on estrogen. *Journal of Biological Chemistry* 267(1):520-525.
- Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, Nakagawa T, Yamamoto A, Miyazaki T, Koshihara Y, Oda H, Nakamura K & Tanaka S (2000) Involvement of receptor activator of nuclear factor κ B ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 43(2):259-269.
- Takeda K, Kishimoto T & Akira S (1997) STAT6: its role in interleukin 4-mediated biological functions. *Journal of molecular medicine* 75(5):317-326.
- Tanaka S (2013) Regulation of bone destruction in rheumatoid arthritis through RANKL-RANK pathways. *World J Orthop* 4(1):1-6.

- Teng GG, Turkiewicz AM & Moreland LW (2005) Abatacept: a costimulatory inhibitor for treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Opin Biol Ther* 5(9):1245-1254.
- Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S & Fox DA (2008) Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 223(1):87-113.
- Thomson W, Harrison B, Ollier B, Wiles N, Payton T, Barrett J, Symmons D & Silman A (1999) Quantifying the exact role of HLA-DRB1 alleles in susceptibility to inflammatory polyarthritis: Results from a large, population-based study. *Arthritis & Rheumatism* 42(4):757-762.
- Tindall EA, Severi G, Hoang HN, Ma CS, Fernandez P, Southey MC, English DR, Hopper JL, Heyns CF, Tangye SG, Giles GG, Hayes VM & Australian Prostate Cancer B (2010) Comprehensive analysis of the cytokine-rich chromosome 5q31.1 region suggests a role for IL-4 gene variants in prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 31(10):1748-1754.
- Tomer Y, Concepcion E & Greenberg DA (2002) AC/T single-nucleotide polymorphism in the region of the CD40 gene is associated with Graves' disease. *Thyroid* 12(12):1129-1135.
- Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG & Tak PP (2008) Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 117(2):244-279.
- Tunyogi-Csapo M, Kis-Toth K, Radacs M, Farkas B, Jacobs JJ, Finnegan A, Mikecz K & Glant TT (2008) Cytokine-controlled RANKL and osteoprotegerin expression by human and mouse synovial fibroblasts: Fibroblast-mediated pathologic bone resorption. *Arthritis & Rheumatism* 58(8):2397-2408.
- Turesson C & Jacobsson L (2004a) Epidemiology of extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology* 33(2):65-73.
- Turesson C & Matteson EL (2004b) Management of extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 16(3):206-211.
- Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ & Hutchinson IV (1997) An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 24(1):1-8.
- Udalova IA, Richardson A, Denys A, Smith C, Ackerman H, Foxwell B & Kwiatkowski D (2000) Functional consequences of a polymorphism affecting NF-kappaB p50-p50 binding to the TNF promoter region. *Mol Cell Biol* 20(24):9113-9119.
- Uson J, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Cabezas J, Gonzalez-Tarrio J, Martin-Mola E & Fontan G (1997) Soluble interleukin 6 (IL-6) receptor and IL-6 levels in serum and synovial fluid of patients with different arthropathies. *The Journal of rheumatology* 24(11):2069-2075.
- van Boekel MA, Vossenaar ER, van den Hoogen FH & van Venrooij WJ (2002) Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res* 4(2):87-93.
- van den Berg WB (2000) Arguments for interleukin 1 as a target in chronic arthritis. *Ann Rheum Dis* 59 Suppl 1:i81-84.
- Van Den Ende CH, Vliet Vlieland TP, Munneke M & Hazes JM (2000) Dynamic exercise therapy for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev* 10.1002/14651858.CD000322(2):CD000322.

- Van der Heijde D (1999) How to read radiographs according to the Sharp/van der Heijde method. *The Journal of Rheumatology* 26(3):743-745.
- Van der Heijde D (2000) How to read radiographs according to the Sharp/van der Heijde method. *The Journal of rheumatology* 27(1):261-263.
- van der Helm-van Mil AH, Huizinga TW, Schreuder GM, Breedveld FC, de Vries RR & Toes RE (2005a) An independent role of protective HLA class II alleles in rheumatoid arthritis severity and susceptibility. *Arthritis Rheum* 52(9):2637-2644.
- van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Toes RE & Huizinga TW (2005b) Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 7(5):R949-958.
- Van Der Linden MP, Feitsma AL, Le Cessie S, Kern M, Olsson LM, Raychaudhuri S, Begovich AB, Chang M, Catanese JJ & Kurreeman FA (2009) Association of a single-nucleotide polymorphism in CD40 with the rate of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 60(8):2242-2247.
- van Heemst J, Jansen DT, Polydorides S, Moustakas AK, Bax M, Feitsma AL, Bontrop-Elferink DG, Baarse M, van der Woude D & Wolbink G-J (2015) Crossreactivity to vinculin and microbes provides a molecular basis for HLA-based protection against rheumatoid arthritis. *Nature communications* 6.
- Van Jaarsveld C, Ter Borg E, Jacobs J, Schellekens G, Gmelig-Meyling F, van Booma-Frankfort C, De Jong B, Van Venrooij W & Bijlsma J (1998) The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in early rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology* 17(6):689-697.
- van Kooten C & Banchereau J (1997) Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Current opinion in immunology* 9(3):330-337.
- van Laar M, Pergolizzi JV, Jr., Mellinghoff HU, Merchante IM, Nalamachu S, O'Brien J, Perrot S & Raffa RB (2012) Pain treatment in arthritis-related pain: beyond NSAIDs. *Open Rheumatol J* 6:320-330.
- van Steenberg HW, Ajeganova S, Forslind K, Svensson B & van der Helm-van Mil AH (2015) The effects of rheumatoid factor and anticitrullinated peptide antibodies on bone erosions in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 74(1):e3.
- Van Venrooij W, Hazes J & Visser H (2002) Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. *Neth J Med* 60(10):383-388.
- Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orrú V, Zavattari P, Nika K, Tautz L, Taskén K & Cucca F (2005) Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nature genetics* 37(12):1317-1319.
- Vaughan JH (1979) Dunlop-Dottridge lecture. Rheumatoid arthritis, rheumatoid factor and the Epstein-Barr virus. *J Rheumatol* 6(4):381-388.
- Vazgiourakis VM, Zervou MI, Choulaki C, Bertsiias G, Melissourgaki M, Yilmaz N, Sidiropoulos P, Plant D, Trouw LA, Toes RE, Kardassis D, Yavuz S, Boumpas DT & Goulielmos GN (2011) A common SNP in the CD40 region is associated with systemic lupus erythematosus and correlates with altered CD40 expression: implications for the pathogenesis. *Ann Rheum Dis* 70(12):2184-2190.

- Veehof M, Taal E, Rasker J, Lohmann J & Van de Laar M (2006) Possession of assistive devices is related to improved psychological well-being in patients with rheumatic conditions. *The Journal of rheumatology* 33(8):1679-1683.
- Venkiteshwaran A (2009) Tocilizumab. *MAbs* 1(5):432-438.
- Visser H (2005) Early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 19(1):55-72.
- Visser K & van der Heijde DM (2009) Risk and management of liver toxicity during methotrexate treatment in rheumatoid and psoriatic arthritis: a systematic review of the literature. *Clin Exp Rheumatol* 27(6):1017-1025.
- Vliet Vlieland TP (2007) Non-drug care for RA--is the era of evidence-based practice approaching? *Rheumatology (Oxford)* 46(9):1397-1404.
- Vossenaar E, Després N, Lapointe E, van der Heijden A, Lora M, Senshu T, van Venrooij WJ & Ménard HA (2004a) Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis research & therapy* 6(2):R142.
- Vossenaar E, Radstake TR, van der Heijden A, van Mansum MA, Dieteren C, de Rooij D-J, Barrera P, Zendman AJ & van Venrooij WJ (2004b) Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Annals of the rheumatic diseases* 63(4):373-381.
- Vossenaar E, Zendman AJ, van Venrooij WJ & Pruijn GJ (2003) PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays* 25(11):1106-1118.
- Wahl C, Liptay S, Adler G & Schmid RM (1998) Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *Journal of Clinical Investigation* 101(5):1163.
- Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen KA, Lundberg K, Kinloch A, Culshaw S, Potempa J & Venables PJ (2010) Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and α -enolase: Implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 62(9):2662-2672.
- Weinblatt M, Combe B, Covucci A, Aranda R, Becker J & Keystone E (2006) Safety of the selective costimulation modulator abatacept in rheumatoid arthritis patients receiving background biologic and nonbiologic disease-modifying antirheumatic drugs: A one-year randomized, placebo-controlled study. *Arthritis & Rheumatism* 54(9):2807-2816.
- Weinblatt ME, Coblyn JS, Fox DA, Fraser PA, Holdsworth DE, Glass DN & Trentham DE (1985) Efficacy of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine* 312(13):818-822.
- Wessels JA, Huizinga TW & Guchelaar HJ (2008) Recent insights in the pharmacological actions of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 47(3):249-255.
- Westhoff G, Rau R & Zink A (2008) Rheumatoid arthritis patients who smoke have a higher need for DMARDs and feel worse, but they do not have more joint damage than non-smokers of the same serological group. *Rheumatology (Oxford)* 47(6):849-854.
- Wewers ME & Lowe NK (1990) A critical review of visual analogue scales in the measurement of clinical phenomena. *Research in nursing & health* 13(4):227-236.

- Weyand CM, Hicok KC, Conn DL & Goronzy JJ (1992) The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Annals of internal medicine* 117(10):801-806.
- Wiela-Hojenska A, Orzechowska-Juzwenko K, Swierkot J, Wiland P, Hurkacz M & Szechinski J (2004) Monitoring methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Clin Pharmacol Ther* 42(8):434-441.
- Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LB & Duff GW (1993) An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med* 177(2):557-560.
- Wolfe F, Hawley D & Cathey M (1993) Measurement of gold treatment effect in clinical practice: evidence for effectiveness of intramuscular gold therapy. *The Journal of rheumatology* 20(5):797-802.
- Woolf CJ (2011) Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain* 152(3 Suppl):S2-15.
- Wright V & Amos R (1980a) Do drugs change the course of rheumatoid arthritis? *British Medical Journal* 280(6219):964-966.
- Wright V & Amos R (1980b) Do drugs change the course of rheumatoid arthritis? *Br Med J* 280(6219):964-966.
- Wucherpfennig KW & Strominger JL (1995) Selective binding of self peptides to disease-associated major histocompatibility complex (MHC) molecules: a mechanism for MHC-linked susceptibility to human autoimmune diseases. *J Exp Med* 181(5):1597-1601.
- Zhang L, Hu J & Athanasiou KA (2009) The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration. *Crit Rev Biomed Eng* 37(1-2):1-57.
- Zhenzhen L, Xianghua L, Qingwei W, Zhan G & Ning S (2013) Three common polymorphisms in the IL-4 gene and cancer risk: a meta-analysis involving 5,392 cases and 6,930 controls. *Tumour Biol* 34(4):2215-2224.