



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *fii bjj Yfg]hf Hci `ci gY`==! DUi ``GUVUh]Yf*  
Discipline ou spécialité : *D\mg]cdUhc`c[ ]Y*

---

Présentée et soutenue par *5XY`jby`FI MGG9B K #HF5B8*  
Le *%`gYdhYa Vfy`&\$%*

Titre : *9HI 89G`8f5GGC7=5H=CB`9BHF9`89G`DC@VA CFD<=GA 9G`89` ; 9B9G`75B8=85HG  
9H`@5`G9J 9F #H9`GHFI 7HI F5@9`CI `@5`F9DCBG9`5I `HF5=H9A 9BH`85BG`@5  
DC@V5FH<F #H9`F<I A 5HC=89*

---

### JURY

*Df GUbXf]bY` ; I =G`fDfcZYggYi f`XYg`I b]j Yfg]hf`gž`DfUh]V]Yb` <cgd]hU`]Yfž`A UfgY`]`Yž`fUddcfhYi fŁ  
Df`Mubb]W` 5@@5BCF9`fDfcZYggYi f`XYg`I b]j Yfg]hf`gž`DfUh]V]Yb` <cgd]hU`]Yfž`Df]gž`fUddcfhYi fŁ  
8f`5bbY`75A 6CB!H<CA G9B`fB]fYVWf]VW`XY`fYVX`YfVX`Y`#bgYfa Ł  
8f`A Uf]U`A 5FH=B 9N`fB]fYVWf]VW`XY`fYVX`YfVX`Y`#bgYfa Ł  
Df`5`U]b`75BH5` ; F9@fDfcZYggYi f`XYg`I b]j Yfg]hf`gž`DfUh]V]Yb` <cgd]hU`]Yfž`Hci `ci gYŁ  
Df` : fUb, c]g`7CFB9@=G`fDfcZYggYi f`XYg`I b]j Yfg]hf`gž`DfUh]V]Yb` <cgd]hU`]Yfž`7`Yfa cbh! : YffUbXŁ*

---

Ecole doctorale : *6]c`c[ ]Y!GUbhf!6]chYVXbc`c[ ]Yg*  
Unité de recherche : *#bgYfa`I A F`%\$&+!9ei ]dY`*

Directeur(s) de Thèse : *Df`5fbUi X`7CBGH5BH=B`fDfcZYggYi f`XYg`I b]j Yfg]hf`gž`DfUh]V]Yb` <cgd]hU`]Yfž`  
Hci `ci gYŁ*

Rapporteurs : *Df`GUbXf]bY` ; I =G`YhDf`Mubb]W` 5@@5BCF9*

## ***Remerciements***

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements

A mon directeur de thèse Arnaud Constantin pour son dynamisme, sa motivation, sa confiance et sa rigueur dans le travail. Ces 4 années de thèse à ses côtés m'ont permis d'approfondir mes connaissances en génétique humaine et physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde, d'améliorer mes capacités d'organisation et la méthodologie dans la recherche. Je le remercie enfin pour son soutien et d'avoir su entretenir ma motivation même après les échecs de soumission de différents articles.

A mes rapporteurs et membres du jury et notamment à Alain Cantagrel pour son aide précieuse dans mon projet professionnel, à Anne Cambon-Thomsen pour son enthousiasme et son dynamisme et la chaleur de son accueil dans l'unité.

A Mogens Thomsen pour son aide précieuse dans le travail de revue de la littérature sur les facteurs génétiques influençant la production d'ACPA dans la polyarthrite rhumatoïde.

A Delphine Nigon pour son dynamisme, son enthousiasme et sa bonne humeur. Son travail d'analyses statistiques a été d'une grande aide dans les divers projets de cette thèse

A Gregory Guernec pour ses conseils en statistiques qui ont permis d'améliorer la qualité des articles et favoriser leur publication

A Philippe Dieudé pour son aide dans ces projets, la revue critique des articles, sa réactivité et de nous avoir permis d'avoir accès à des cohortes de polyarthrites pour des études de répliation.

A Pierre-Antoine Gourraud pour ses conseils méthodologiques sur l'étude des classifications des allèles de *HLADRBI*.

Aux stagiaires que j'ai eu l'opportunité d'encadrer et dont le travail a contribué à cette thèse et notamment, Amélia, Emilie et Sara.

A l'ensemble des membres de l'équipe INSERM et notamment Emmanuelle, Jane, Alexandra et Anna.

A mon mari, Thomas pour sa patience et son soutien au cours de ces 4 années de thèse, à mes filles Camille et Manon, à ma famille.

## TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES .....	4
INTRODUCTION.....	6
<b>1. Epidémiologie de la polyarthrite rhumatoïde.....</b>	<b>6</b>
<b>2. Physiopathologie de la PR .....</b>	<b>10</b>
2.1. Rôle du terrain génétique .....	10
2.1.1. <i>Chromosome X</i> .....	11
2.1.2. <i>Région HLA</i> .....	12
2.1.3. <i>Gènes hors région HLA</i> .....	18
2.1.4. <i>Interactions gène-gène et gène-environnement</i> .....	21
2.1.5. <i>Antigènes maternels non transmis</i> .....	21
2.1.6. <i>Microchimérisme</i> .....	22
2.1.7. <i>Epigénétique</i> .....	23
2.2. Cellules impliquées dans la physiopathologie de la PR.....	24
2.3. Auto-anticorps.....	25
2.4. Cytokines .....	28
2.5. Destruction articulaire.....	30
<b>3. Histoire naturelle de la PR .....</b>	<b>31</b>
<b>4. Diagnostic de la PR .....</b>	<b>32</b>
<b>5. Traitement de la PR .....</b>	<b>33</b>
OBJECTIFS DE LA THESE .....	37
PATIENTS ET METHODES .....	38
<b>1. Etudes d'association entre des gènes candidats et la sévérité structurale de la maladie .....</b>	<b>38</b>
1.1. Patients.....	38
1.2. Données biologiques.....	39
1.3. Génotypages.....	39
1.4. Radiographies .....	43
1.5. Analyses statistiques .....	44
1.5.1. <i>Associations entre les polymorphismes des gènes candidats (hors HLA) et la sévérité structurale</i> .....	44
1.5.2. <i>Association entre les allèles de HLA-DRB1 et le risque d'ACPA et de progression structurale en 1 an</i> .....	45
1.5.3. <i>Matrice de prédiction du risque de progression structurale rapide</i> .....	47
<b>2. Etudes d'associations avec la réponse au traitement .....</b>	<b>48</b>
2.1. Patients :.....	48
2.2. Données analysées .....	48

2.3. Analyses statistiques .....	49
RESULTATS .....	50
1. Association entre les SNPs de gènes candidats et la sévérité structurale de la PR : 50	
2. Nouvelle classification des allèles de <i>HLA-DRB1</i> basée sur les propriétés acido- basiques des AA en position 70 et 71 de la molécule .....	51
3. Matrice de prédiction du risque de progression rapide.....	52
4. Association entre des polymorphismes de gènes candidats et la réponse au rituximab dans la PR .....	56
CONCLUSIONS ET AGENDA DE RECHERCHE .....	57
ANNEXES .....	65
1. Annexe 1: New insights into the genetics of immune response of rheumatoid arthritis.....	65
2. Annexe 2 : Interactions gènes-environnements .....	80
3. Annexe 3 : Association of IL2-RA and IL2-RB genes with erosive status in early rheumatoid arthritis patients (ESPOIR and RMP cohorts) .....	90
4. Annexe 4 : New classification of <i>HLA-DRB1</i> alleles based on acid-base properties of the amino acids located at position 70 and 71: impact on ACPA status or structural progression in a cohort of early RA (ESPOIR cohort). .....	98
5. Annexe 5 : Fc $\gamma$ Receptor Type IIIA polymorphism influences treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab .....	132
6. Annexe 6 : Association between -871C>T promoter polymorphism in the B-cell- activating factor gene and the response to rituximab in rheumatoid arthritis patients 137	
LISTE DES ABREVIATIONS .....	144
BIBLIOGRAPHIE .....	146
SUMMARY .....	155

## INTRODUCTION

### 1. Epidémiologie de la polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est le rhumatisme inflammatoire chronique le plus fréquent, touchant de 0,3 à 0,8% de la population en Europe avec un gradient Nord-Sud (1). Elle concerne préférentiellement la femme avec un sex-ratio de 3 femmes pour un homme et sa prévalence augmente avec l'âge avec un âge médian de survenue autour de 35 ans en Europe du Nord (1, 2). Elle est associée à une augmentation de la mortalité par augmentation du risque cardio-vasculaire, de néoplasie, du risque infectieux et iatrogène, sur risque qui tend à diminuer depuis quelques années (3), probablement du fait de l'avènement de nouveaux traitements permettant un meilleur contrôle de l'activité de la maladie et une meilleure prise en charge des comorbidités.

Il s'agit d'une maladie multifactorielle complexe c'est-à-dire résultant de l'interaction entre des facteurs génétiques et environnementaux.

De nombreux facteurs épidémiologiques ont été associés au risque de développer une PR et au pronostic de la PR :

- Le sexe : bien que la PR soit plus fréquente chez la femme, les mécanismes sous-tendant cette différence ne sont pas encore élucidés. Le pronostic est classiquement meilleur chez l'homme avec une meilleure réponse au traitement, un taux de rémission plus élevé (4, 5) et des scores DAS28 (Disease Activity Score on 28 joints) HAQ (Health Assessment Questionnaire) plus bas (6). Les données sont plus discordantes en ce qui concerne l'évolution structurale (6-8). Le sexe masculin est plus souvent associé aux manifestations extra-articulaires comme l'atteinte interstitielle pulmonaire

rhumatoïde (9, 10). Le taux de mortalité au même âge est plus élevé chez l'homme (11), mais après comparaison avec une population saine appariée en âge et en sexe, les rapports standardisés de mortalité sont plus élevés chez la femme avec un risque multiplié par 2 à 3 (12, 13).

- Les facteurs hormonaux influencent la maladie et pourraient expliquer la différence de prévalence et de pronostic selon le genre. Une ménopause précoce (14-16), la prise de traitement hormonal de la ménopause (14, 17) augmenteraient le risque de développer une PR alors qu'un allaitement prolongé diminuerait ce risque (18, 19) et l'utilisation d'une contraception orale estroprogestative serait associée à une diminution du risque de PR, une diminution de la fréquence des facteurs rhumatoïdes (FR) et à un meilleur pronostic (20-22). De même l'activité de la maladie est souvent diminuée en cours de grossesse avec un risque de rebond après l'accouchement (23). Des études ont montré que le rapport entre les œstrogènes/androgènes était augmenté dans le liquide synovial des patients et patientes atteints de PR ce qui aurait une action activatrice sur le macrophage et engendrerait une prolifération de fibroblastes. Ceci aurait pour conséquence l'augmentation de l'inflammation dans la membrane synoviale et à terme l'apparition d'érosions pouvant expliquer en partie la différence en termes d'activité et de sévérité de la maladie selon le sexe (Pennel J imm 2012). Les anti-TNF alpha auraient une action inhibitrice de l'aromatase permettant de convertir les androgènes en œstrogènes dans la membrane synoviale. Les hommes atteints de PR auraient des taux plasmatiques de testostérone et de dehydroepiandrosterone inférieurs confortant l'hypothèse d'une action anti-inflammatoire des androgènes (24).
- Le bas niveau socio-économique est plus souvent associé à la PR (25, 26) et aggrave le pronostic de la maladie en augmentant le HAQ, la mauvaise observance du traitement et le risque de comorbidités (27).

- Le tabac : le rôle du tabac dans la survenue de la PR est maintenant clairement établi et passe certainement par l'augmentation de la citrullination des protéines, favorisant la production d'anticorps anti-peptides citrullinés (ACPA) sur un terrain génétique prédisposé (cf chapitre physiopathologie) (28-30). Le tabac augmente le risque de PR, le risque de développer des ACPA et des FR; il est associé à une plus grande sévérité de la maladie définie par des scores radiographiques plus élevés, une augmentation du risque de manifestations extra-articulaires comme les nodules rhumatoïdes, l'atteinte pulmonaire interstitielle, le risque de vascularite (31-33). Le tabac est également associé à moins bonne réponse au traitement (34-36).
- Autres polluants atmosphériques : plusieurs études ont suggéré l'imputabilité d'autres polluants que le tabac dans la genèse de la PR (37). La silicose est une pathologie pouvant être associée à la PR, les particules de silices inhalées auraient en effet un effet adjuvant dans la production d'auto-anticorps et augmenterait le risque de développer une PR d'un facteur 2 et d'un facteur 7 en cas d'association avec le tabac suggérant une interaction entre ces 2 facteurs (38). La pollution ambiante pourrait également être impliquée dans la genèse de la PR. En effet le fait d'habiter dans un rayon de 50m autour d'une autoroute augmenterait de 30% le risque de développer une PR (39).
- La consommation d'alcool semble inversement corrélée au risque de développer une PR (40, 41) et associée à une moindre sévérité de la maladie (41, 42). Cette relation pourrait être expliquée par l'interaction entre l'alcool et la production de cytokines et facteurs pro-inflammatoires (43) et semble dose dépendante et plus importante chez les patients porteurs d'allèles à risque de *HLA-DRB1* ce qui peut faire suspecter une interaction de type gène-environnement (40).



- La parodontite est une inflammation chronique du parodonte souvent liée à la présence d'une bactérie le *Porphyromonas gingivalis* est plus fréquemment associée au risque de développer une PR (44, 45). Cette bactérie exprime notamment une peptidyl-arginine déiminase à l'origine de la production de peptides citrullinés (cf chapitre physiopathologie).
- La vitamine D : la vitamine D est indispensable dans le métabolisme phosphocalcique et est aussi impliquée dans la régulation des cellules de l'immunité innée et adaptative agissant comme un facteur immuno-modulateur via le récepteur de la vitamine D présent sur les cellules mononuclées, les dendrocytes, les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes B et T et la production de vitamine D par les dendrocytes (46). Bien que la vitamine D ait été impliquée dans la diminution du risque de certaines pathologies auto-immunes comme le diabète de type 1 et la sclérodermie, son rôle exact dans la physiopathologie de la PR reste débattu. Des taux de vitamine D bas sont plus souvent associés à la PR, à son activité et sa sévérité. Une récente méta-analyse a montré que le risque de développer une PR était diminué par une supplémentation en vitamine D (47).

A coté de ces facteurs environnementaux, le terrain génétique intervient pour près de 50% dans les mécanismes qui vont conduire au développement de la PR. Ce sont ces facteurs génétiques et leur association avec le phénotype de la PR qui font l'objet de cette thèse.

## 2. Physiopathologie de la PR

Si l'origine exacte des mécanismes qui sous-tendent le développement de la PR est encore inconnue, de nombreuses avancées réalisées ces 30 dernières années ont permis une meilleure compréhension des facteurs responsables de la rupture de la tolérance et de l'activation du système immunitaire qui conduisent aux dégradations structurales.

Les lymphocytes B et T ainsi que les cytokines pro-inflammatoires jouent ainsi un rôle clé dans le développement de la maladie. Ce chapitre a pour but de reprendre rapidement les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la PR.

### 2.1. Rôle du terrain génétique

La PR est une maladie multifactorielle complexe résultant de l'interaction entre un terrain génétique prédisposé et de facteurs environnementaux. On estime que génétique intervient pour près de 50% à 60% dans le risque de développer une PR (48).

Ainsi, alors que la prévalence de la maladie dans la population générale est <1%, la prévalence de la PR est de 2 à 4% chez les sujets apparentés (49).

Une façon classique d'estimer l'importance de la variabilité génétique par rapport aux facteurs environnementaux dans la survenue de la PR est de comparer la prévalence de la maladie chez les jumeaux monozygotes (vrais jumeaux qui partagent le même patrimoine génétique et le même environnement), chez les jumeaux dizygotes (faux jumeaux qui partagent la moitié de leurs gènes et le même environnement) à la prévalence de la maladie dans la population générale. Ceci est appelé l'héritabilité et varie de 0 (aucune contribution) à 1 (contribution purement génétique). Un autre moyen de mesure est le risque de récurrence familial (sibling recurrence risk  $\lambda_s$ ) qui se mesure par le rapport entre la fréquence de la

maladie au sein d'une même famille à la prévalence dans la population (50). On estime que l'héritabilité de la PR est de l'ordre de 50 à 60% et est du même ordre chez les patients ACPA+ et ACPA-. La fréquence de la PR chez les jumeaux monozygotes est de l'ordre de 12 à 15% ( $\lambda_S$  compris entre 10 et 60) et de 2 à 4% chez les jumeaux dizygotes ( $\lambda_S$  compris entre 2 et 20) en cas de PR dans la fratrie (48, 49).

### *2.1.1. Chromosome X*

Les femmes ont 2 à 3 fois plus de risque de développer une PR et le genre est probablement le facteur génétique contribuant le plus fortement à la variation de la susceptibilité à la PR. Les femmes ont en effet une réponse immune probablement supérieure en cas d'activation que les hommes avec des taux de T CD4+ circulants supérieurs aux hommes, une production supérieure de cytokines et d'anticorps en réponse à une infection. Outre les facteurs immunologiques et hormonaux, des facteurs génétiques interviennent probablement dans les différences de présentation clinique. Des hypothèses sur les mécanismes d'inactivation du chromosome X chez la femme qui pourraient résulter à des erreurs dans la reconnaissance du soit dans le thymus ou bien l'inactivation de certains gènes protecteurs contre l'auto-immunité ont été avancées. On estime en effet qu'environ 10% des chromosomes X échappent à l'inactivation, ce qui conduit à l'hyper expression de certains gènes certains pouvant engendrer une auto-immunité. D'autres hypothèses sur la présence de cellules monosomiques X ont été avancées devant l'augmentation de la prévalence de l'autoimmunité chez les patientes atteintes de syndrome de Turner et la découverte de l'augmentation du nombre de cellules B et T monosomiques X dans le sang périphériques en l'absence de microchimérisme. Des hypothèses sur l'éventuelle méthylation du chromosome X ont été générées et on considère aujourd'hui que des altérations du chromosome X pourraient être à

l'origine de l'auto-immunité (24). De plus, de nombreux gènes impliqués dans l'auto-immunité sont localisés dans le chromosome X tels la tyrosine kinase BTK dont la mutation entraîne une agammaglobulinémie liée à l'X, le gène de la chaîne gamma du récepteur à l'Interleukine 2 (IL-2) dont la mutation entraîne une immunodéficiência complexe sévère liée à l'X et le gène de la FOXP3 dont la mutation entraîne une dérégulation immunitaire, une polyendocrinopathie, une entérocolopathie liées à l'X. Ces différents mécanismes pourraient entraîner des perturbations des micro-RNA attachés au chromosome X qui seraient responsables d'une dérégulation de la réponse immune via la régulation de l'expression de certains gènes localisés sur le chromosome X (51).

Bien que le sexe soit un facteur évident d'auto-immunité, les analyses génétiques ne sont en général pas stratifiées sur le sexe puisque l'on considère que les facteurs génétiques associés à la PR sont indépendants du genre.

### 2.1.2. Région HLA

A part le genre, le principal facteur génétique connu à ce jour est situé dans la région HLA sur le bras court du chromosome 6 et sa contribution à la susceptibilité de la PR serait de l'ordre de 30% à 50% (48, 49, 52, 53). Cette association avait été identifiée il y a plus de 40 ans.

Dès 1969, il a été démontré à partir de cultures mixtes lymphocytaires que les lymphocytes circulants de patients atteints de PR réagissaient moins face aux lymphocytes circulants d'autres patients atteints de PR (54). En 1976, Stastny (55) montra que cette moindre réactivité était liée à la présence de gènes communs sur la région HLA entre les différents patients souffrant de PR, suggérant ainsi la contribution des gènes de la région HLA au risque de développer une PR. Stastny montra en 1978 (56) que 78% des patients caucasiens atteints de PR étaient porteurs de l'allèle *HLA-DRw4* du gène de *HLA-DR*, allèle présent que chez

28% des sujets contrôles. Dix ans plus tard, les travaux de Gregersen (57) ont abouti à la conclusion que seuls les allèles du gène *HLA-DRB1* encodant une séquence d'acides aminés commune au sein de la 3<sup>ème</sup> région hypervariable de la chaîne  $\beta$  de la molécule HLA-DR étaient associés à la susceptibilité de la PR. Cette séquence d'acides aminés, s'étendant de la position 72 à 74 de HLA-DR $\beta$ 1, comprend une arginine suivi de 2 alanines, constituant un motif RAA.

Cependant cette seule hypothèse ne recouvre qu'une partie de la réalité de l'association entre le locus *HLA-DRB1* et la susceptibilité à la PR, car certains allèles encodant le motif RAA qui protègent du risque de PR. Plus tard, des travaux ont montré l'importance d'autres acides aminés situés à côté du motif RAA et notamment des acides aminés en position 67 et 70 dans la susceptibilité. Il a ainsi été établi que la présence d'une isoleucine (I) en position 67 (58), la présence de D en position 70 (59) ou la présence du motif D-E-RAA en position 70-74 inclus dans les allèles *HLA-DRB1* \*13 (60) étaient protecteurs quant au risque de développer une PR. De même, les motifs QKRAA, QRRAA ou RRRAA sont fortement associés au risque de PR et ces 3 motifs ont été regroupés car codant pour un épitope commun : l' « *Epitope Partagé* » (Shared Epitope [SE]). De ces constatations plusieurs classifications des allèles de *HLA-DRB1* ont été proposées basées sur les acides aminés des positions 67 et 70-74 afin de différencier les allèles à risque, les allèles protecteurs et les allèles non associés:

- La classification de de Vries (58) est basée sur la présence ou l'absence de l'isoleucine en position 67. Les allèles sont divisés en 3 groupes : le groupe « SE » comprend les allèles encodant les motifs QKRAA, QRRAA et RRRAA, le groupe P pour « Protector » comprend les allèles non SE encodant une isoleucine en position 67, le groupe N pour « Neutral » comprend les autres allèles.
- La classification de Matthey (59) est basée sur la présence d'un acide aspartique en position 70 (D) et divise les allèles en 3 groupes : le groupe SE comprend les allèles

encodant les motifs QKRAA, QRRAA et RRRAA, le groupe D70+ comprend les allèles non SE qui encodent un D en position 70 et le groupe D70- comprend les autres allèles.

- La classification de Tezenas du Montcel (61), reprise par Michou (62) divise les allèles en 5 groupes. Le groupe X comprend tous les allèles n'encodant pas le motif RAA en position 72-74. Le groupe S1 comprend les allèles encodant un acide glutamique (E) ou une alanine (A) en position 71. Le groupe S2 comprend les allèles encodant une lysine (K) en position 71. Le groupe S3P comprend les allèles encodant une arginine (R) en position 71 et une R ou une glutamine (Q) en position 70. Le groupe S3D comprend les allèles encodant une R en position 71 et un D en position 70.

La classification de Reviron (63) est basée sur les charges globales de la poche 4 de la chaîne  $\beta$  de la molécule HLA-DR contenant les acides aminés 70 à 74 ainsi que les acides aminés en position 13 et 78 et regroupe les allèles en 3 groupes : les allèles encodant l'épitope partagé (SE), les allèles encodant une poche 4 chargée positivement (XP4p) et les allèles encodant une poche 4 chargée négativement ou non chargée (XP4n). La relation entre ces 4 classifications est résumée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Relation entre les classifications des allèles de *HLA-DRB1* de De Vries, Matthey, Tezenas du Montcel et Reviron

Alleles <i>HLA-DRB1</i>	Acides aminés des positions 67,70-74	Classification de Tezenas du Montcel	Classification de Matthey	Classification de De Vries	Classification de Reviron
*01:03, *04:02, *11:02; *13:01, *13:02, *13:04	I-D-E-RAA	S1	D70+	P	XP4n
*11:03,	F-D-E-RAA	S1	D70+	N	XP4n
*13:23; *15	I-Q-A-RAA	S1	D70-	P	XP4p

*13:03	I-D-K-RAA	S2	D70+	P	XP4n
*04:01; *04:13	L-Q-K-RAA	S2	SE	SE	SE
*12:01, *13:06, *13:25, *14:22,	I-D-R-RAA	S3D	D70+	P	XP4n
*11:01, *11:04, *13:05	F-D-R-RAA	S3D	D70+	N	XP4n
*16	F-D-R-RAA	S3D	D70+	N	XP4p
*01:01, *01:02, *04:04, *04:05, *04:08 *14:02	L-Q-R-RAA	S3P	SE	SE	SE
*10:01	L-R-R-RAA	S3P	SE	SE	SE
*03	L-Q-K-RGR	X	D70-	N	XP4p
*04:03, *04:06; *04:07, *04:11; *04:59	L-Q-R-RAE	X	D70-	N	XP4p
*07:01	I-D-R-RGQ	X	D70+	P	XP4n
*08	F-D-R-RAL	X	D70+	N	XP4n
*09:01	F-R-R-RAE	X	D70-	N	XP4p
*14:01; *14:04	L-R-R-RAE	X	D70-	N	XP4p

I : isoleucine, D: acide aspartique, Q: glutamine, R: arginine, A: alanine, E: acide glutamique, K :lysine, G : glycine, L : leucine, SE : présence de l'épitope partagé, D70+ : présence de D en position 70, D70- : absence de D en position 70, P : présence de I en position 67, N= absence de I en position 70, XP4p : poche P4 chargée positivement, XP4n : poche P4 chargée négativement.

En fonction des populations, les allèles ainsi reclassés sont parfois considérés comme protecteurs du risque de PR ou neutres (64). Toutes ces classifications en revanche regroupent les mêmes allèles *HLA-DRB1SE+* dans le groupe « *Epitope Partagé* » en dehors de la classification de Tezenas du Montcel qui propose 2 groupes d'allèles à risque S2 et S3P.

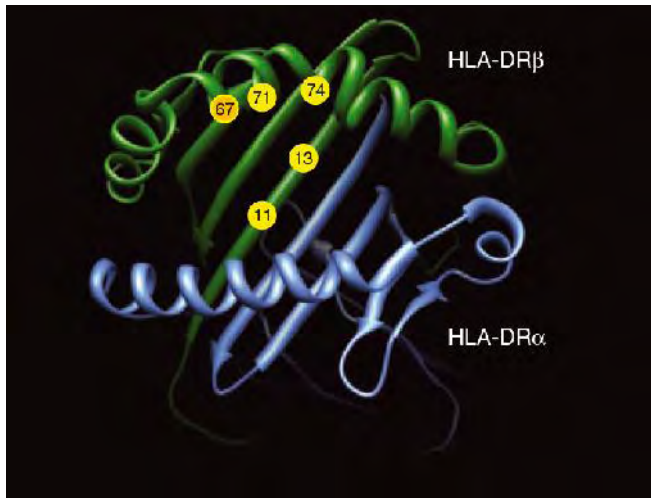
Les allèles *HLA-DRB1SE+* sont associés au risque de développer une PR avec une effet-dose. En effet le risque de développer une PR est de l'ordre de 4 en cas de portage d'un seul allèle à

risque et de près de 12 en cas de portage de 2 allèles à risque. Ce risque est majoré en cas d'exposition au tabac du fait d'une interaction gène-environnement (65).

Cette association est essentiellement observée chez les PR ACPA+ (66). En effet, l'héritabilité liée aux allèles de *HLA-DRB1* est beaucoup plus faible chez les PR ACPA-. Certaines études ont montré une association avec les allèles HLA-DR3, mais les méta-analyses récentes n'objectivent pas d'association significative entre les gènes de la région HLA et le risque de PR ACPA- ce qui démontre encore que les PR ACPA+ et ACPA- sont 2 pathologies distinctes (67).

Bien que la relation entre *HLA-DRB1* et le risque de PR soit connue depuis plus de 30 ans, les mécanismes exacts expliquant la prédisposition de ces allèles au risque de PR ACPA+ n'est pas parfaitement comprise. La molécule HLA-DR est un hétérodimère composé d'une chaîne  $\alpha$  (DR $\alpha$ ) et d'une chaîne  $\beta$  (DR $\beta$ ) ancrées dans la membrane des cellules présentatrices d'antigènes. La fonction de la molécule HLA-DR est de présenter les peptides antigéniques aux lymphocytes T. Pour une présentation efficace, le récepteur du lymphocyte T (TCR) reconnaît à la fois l'antigène présenté et la molécule HLA-DR. La partie de HLA-DR interagissant avec le peptide antigénique est composée de 2 bords d'hélices  $\alpha$  et d'un plancher de feuillet  $\beta$ . L'épitope partagé est situé sur la 3<sup>ème</sup> région hypervariable de l'hélice  $\alpha$  (figure 1) influençant ainsi la liaison avec les peptides antigéniques et interagissant directement avec le lymphocyte T (67).



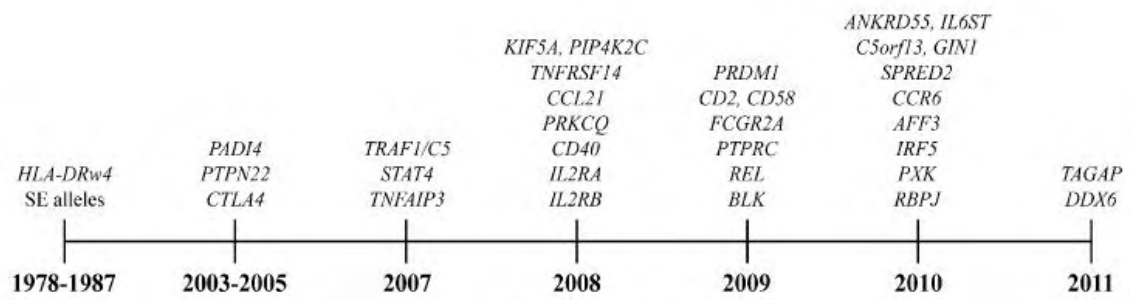


chaîne  $\beta$ . Ces auteurs montraient que cette position était particulièrement importante pour la présentation des peptides de vimentine citrullinée, un auto-antigène connu de la PR. Une autre étude récente (70) réalisée sur des patients japonais montrait une forte association entre l'allèle *HLA-DRB1\*04:05* et le risque de PR ACPA+ ainsi qu'une association indépendante avec d'autres loci que ceux d'*HLA-DRB1* (*HLA-DRBP*, *HLA-B* et *HLA-C*).

### 2.1.3. Gènes hors région HLA

Les gènes de la région HLA n'expliquent qu'un tiers de l'héritabilité de la maladie et les immenses progrès des techniques moléculaires des 15 dernières années ont permis d'identifier de nombreux locus à risque situés dans de nombreux gènes dont certains inconnus. Ainsi au moins une trentaine de locus confirmés contribuent au risque de PR. Les Odds Ratios (OR) de ces associations sont en revanche plus faibles ( $0,8 < \text{OR} < 1,4$ ) que ceux des associations avec les gènes HLA ( $0,4 < \text{OR} < 2,5$ ) et leur contribution à la variabilité génétique serait une fois combinés de l'ordre de 5% à 10% (67).

En 2003, le gène encodant la peptidyl arginine déiminase de type 4 (*PADI4*) a été identifié par une étude de type gènes-candidats sur une population japonaise comme un second facteur de risque de PR (71). Ce nouveau facteur est particulièrement intéressant puisqu'impliqué dans la citrullination des peptides, cibles des ACPA. D'autre part, le gène encodant la protéine tyrosine phosphatase non-récepteur 22 (*PTPN22*), une protéine tyrosine phosphatase intracellulaire impliquée dans la régulation des voies de signalisation des récepteurs des lymphocytes T et B a été identifié comme associé à la PR (72, 73). Après 2004, les découvertes de nouveaux facteurs génétiques ont connu une nette accélération et plusieurs gènes ont été impliqués dans la susceptibilité de développer une PR par les approches de type gènes-candidats : *CTLA4*, *TRAF1/C5*, *STAT4*, *TNFAIP3* (74-77).



Chromosome number	Chromosome location (Entrez)	Genes	SLE	GD	MS	RA	Psoriasis
1	1p31.3	IL23R				IL23R	IL23R
1	1p36	MMEL1/TNFRSF14			MMEL1/TNFRSF14	MMEL1/TNFRSF14	
1	1p13.2	PTPN22	PTPN22	PTPN22	PTPN22	PTPN22	
2	2p16.3	NRXN1			NRXN1	NRXN1	
2	2q32.2	STAT4	STAT4			STAT4	
2	2q33	CTLA4	CTLA4	CTLA4			
3	3p14.1	PXK	PXK		PXK		
4	4q27	KIAA1109			KIAA1109	KIAA1109	
6	6q21.3	HLA-DRB	HLA-DRB	HLA-DRB	HLA-DRB	HLA-DRB	
6	6q23	TNFAIP3	TNFAIP3			TNFAIP3	TNFAIP3
8	8p23.1	TNKS	TNKS		TNKS		
10	10p15	IL2RA			IL2RA	IL2RA	
20	20q12	CD40			CD40	CD40	

#### 2.1.4. Interactions gène-gène et gène-environnement

À l'échelon individuel, si le portage d'un allèle *HLA-DRB1\*SE* confère une augmentation du risque de PR compris entre 4 et 6, le portage de 2 allèles *HLA-DRB1* confère une augmentation du risque de PR compris entre 20 et 30, alors que le portage d'un allèle à risque d'un des autres gènes associés à la susceptibilité de la PR ne confère qu'une augmentation de risque comprise entre 1 et 2, ne devenant significative que sur étude de vastes échantillons d'individus. Un des facteurs expliquant la faible héritabilité conférée par l'ensemble des gènes connus à ce jour pour être associés à la susceptibilité de la PR est la probable interaction entre les gènes (interaction gène-gène) et entre les gènes et l'environnement (interaction gène-environnement) (50).

Les interactions gènes-environnements ont fait l'objet d'une revue de la littérature présentée en annexe 2.

#### 2.1.5. Antigènes maternels non transmis

En 1954, un effet biologique des antigènes maternels non-transmis (NIMA) a été rapporté pour la première fois : les enfants Rhésus D négatifs avaient une tolérance vis-à-vis des antigènes Rhésus D si leur mère était Rhésus D positif (82). De même les antigènes HLA avaient aussi été décrits comme des NIMA dans le cadre de la transplantation d'organe (83). Récemment, une étude a montré que les molécules *HLA-DRB1* contenant le motif D-E-RAA à la position 70-74 agissaient comme un facteur protecteur de survenue de PR si elles étaient présentes en tant que NIMA (84). En effet les mères de patients souffrant de PR avaient une fréquence moins importante de molécule de *HLA-DRB1* contenant le motif D-E-RAA que dans la population générale (16,1% versus 29,3%) alors que la fréquence du motif D-E-RAA

chez les pères de patients souffrant de PR était identique que dans la population (26,2%). Ces travaux sont très prometteurs et ont ouvert la voie vers d'autres façon d'influencer le système immunitaire afin d'éviter qu'une PR ne se développe.

#### 2.1.6. *Microchimérisme*

La grossesse induit des altérations majeures du système immunitaire et neuroendocrine afin d'éviter une attaque immunitaire maternelle dirigée contre le fœtus. On peut ainsi considérer la grossesse comme une allogreffe naturelle. Des mécanismes complexes vont moduler le système immunitaire maternel durant la grossesse et la tolérance envers les antigènes paternels est favorisée par la migration de cellules fœtales dans la circulation sanguine maternelle (microchimérisme). Après l'accouchement, le système maternel soit se réadapter pour revenir à l'état précédent la conception. Ces phases de modification du système immunitaire sont propices à une dysrégulation et la survenue de maladies auto-immunes. En effet une augmentation de l'incidence des maladies-auto-immunes dans la période du post-partum a souvent été observée (85). Dans le cadre de la PR 2 facteurs ont été décrits comme pouvant expliquer la survenue de PR après une grossesse : l'effet de la parité et le microchimérisme. En effet, 2 études (86, 87) ont montré que chez les patientes ne possédant pas d'allèle *HLA-DRB1SE+*, les patientes développant une PR avaient un taux plus élevé de cellules fœtales possédant un allèle *HLA-DRB1SE+* comparées aux femmes non malades. Ces études montrent que la susceptibilité à la PR pourrait être acquise durant la grossesse par l'introduction de l'épitope partagé par les cellules fœtales circulantes. Le microchimérisme pourrait également jouer un effet protecteur. Une étude (88) a en effet montré que le risque de développer une PR était moins important chez les multipares comparé aux nullipares (OR=0,61, P=0,005), surtout chez les moins de 35ans. Ce risque n'était pas différent entre les

multipares dans la période de 1 an qui suivait l'accouchement mais diminuait surtout dans les 1 à 5 ans suivant le dernier accouchement (OR=0,29) pour remonter progressivement avec le temps (OR=0,76 15 ans après le dernier accouchement). Les auteurs ont suggéré que les cellules fœtales pourraient transférer une protection de type vaccinale surtout chez les porteuses d'un allèle *HLA-DRB1SE+*. Enfin, il est fréquemment observé que l'activité de la PR s'améliore durant la grossesse. Le microchimérisme pourrait être une explication : en effet l'activité de la PR est d'autant plus améliorée en cas d'incompatibilité HLA fœto-maternelle et les taux d'ADN fœtal circulant semblent corrélés à l'activité de la maladie, augmentant tout au long de la grossesse jusqu'au 3<sup>ème</sup> trimestre alors que la maladie a une faible activité, puis diminuant jusqu'à devenir indétectable à 3 mois de l'accouchement, date de reprise des symptômes de PR (89).

### 2.1.7. Epigénétique

L'hélice ADN contenue dans chaque cellule à une longueur d'environ 2m. Cependant moins de 5% du génome est codant. Dans chaque type cellulaire, seuls un certain nombre de gènes sont activés pour être exprimés et un système de régulation intriqué est requis pour orchestrer l'expression de ces gènes. Cette expression est régulée notamment par des modifications épigénétiques. L'épigénétique comprend par définition toutes les modifications héritées ou acquises du génome potentiellement réversibles, n'altérant pas la séquence nucléotidique de l'ADN. Ceci comprend des mécanismes d'acétylation, de méthylation, de phosphorylation, sumoylation, et les microARN.

L'épigénétique serait impliquée dans la physiopathologie de la PR. Des travaux ont par exemple montré qu'une hypométhylation du génome serait responsable d'une activation des

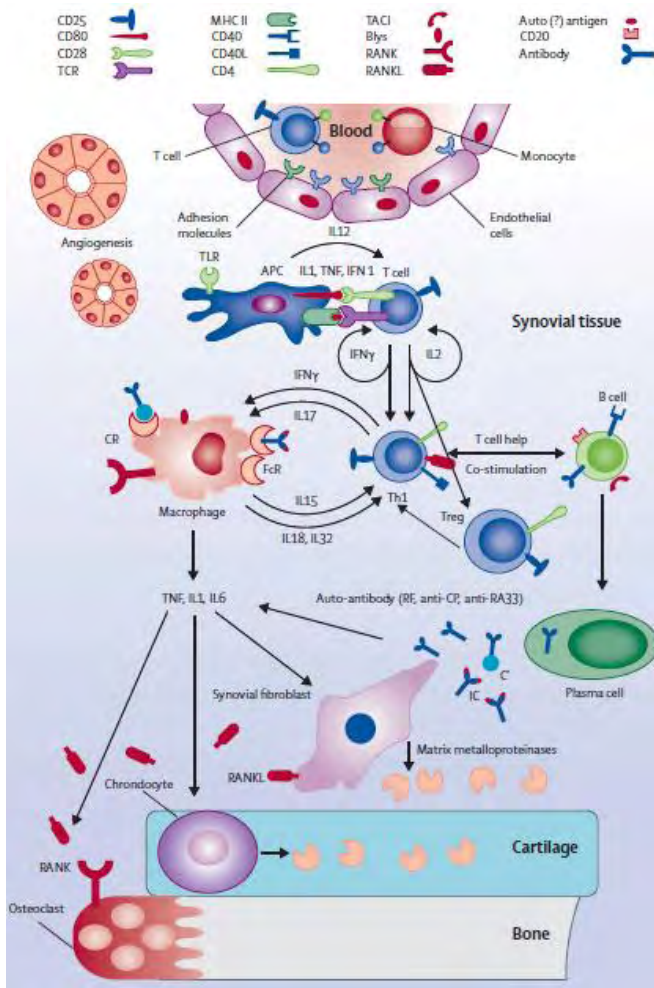
fibroblastes dans la PR. De même des mécanismes d'acétylation et l'expression de micro-ARN auraient un rôle dans l'expression de certaines cytokines inflammatoires (90).

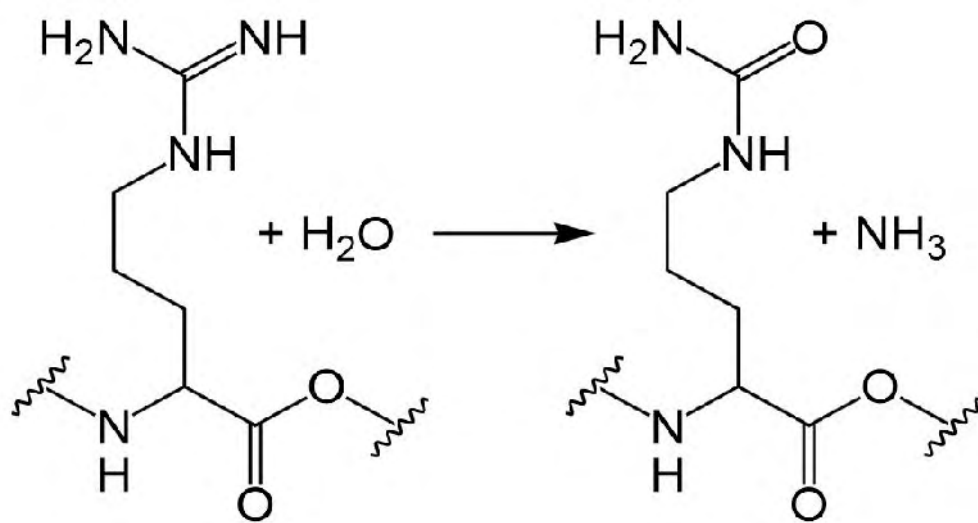
## 2.2. Cellules impliquées dans la physiopathologie de la PR

La phase initiale de la réponse immunitaire fait intervenir les cellules de l'immunité innée qui sont activées par des motifs d'origine exogène ou endogène (91). Les cellules présentatrices d'antigènes comprenant les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B activés présentent des peptides inducteurs d'arthrite aux lymphocytes T. De façon concomitante, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sécrétant de l'interleukine 2 (IL-2) et de l'interféron  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) infiltrent la membrane synoviale. La présentation de peptides inducteurs d'arthrite est favorisée par la présence de l'épitope partagé au sein de la 3<sup>ème</sup> région hypervariable des chaînes  $\beta$  des molécules HLA-DR. En présence d'un peptide inducteur d'arthrite et de l'épitope partagé, les lymphocytes T auto-réactifs sont stimulés prolifèrent et envahissent le tissu synovial et les relais lymphatiques (92).

Les lymphocytes B contribuent à la physiopathologie de la PR non seulement en tant que cellules présentatrices d'antigènes mais aussi en tant que cellules productrices d'auto anticorps tels les FR et les ACPA (93). Elles expriment des immunoglobulines de surface et des marqueurs de différenciation tels le CD20 ou le CD22. Les lymphocytes B sont stimulés notamment par la présence de B Cell Activating Factor (BAFF ou BlyS) qui une fois lié à son récepteur membranaire sur le lymphocyte B entraîne une expansion clonale et une différenciation en plasmocyte sécréteur d'immunoglobulines et notamment de FR et ACPA. Ces auto-anticorps forment de larges complexes immuns qui peuvent engendrer la stimulation de la production de cytokines pro-inflammatoires et notamment de TNF- $\alpha$  par le biais du complément et du récepteur au fragment Fc des immunoglobulines de type G appelé Fc $\gamma$ R.







L-arginine (chargée positivement)

L-citrulline (neutre)

citrullination de peptides endogènes comme les PAD bactériennes et notamment la PAD du *Porphyromonas gingivalis* présent dans la flore buccale et favorisant la survenue de parodontite (96). Les peptides qui peuvent être citrullinés sont nombreux dans le tissu synovial et comprennent notamment la fibrine, la vimentine, la fibronectine, l'alpha-énolase. Dans la PR les hypothèses actuelles suggèrent que la citrullination générerait une modification de la conformation tridimensionnelle des protéines générant de néo-peptides et qu'une rupture de la tolérance se ferait lors de la présentation des néo-peptides citrullinés par les cellules présentatrices d'antigènes via le CMH de classe II aux lymphocytes T CD4+ ce qui aboutirait après cascade inflammatoire à la production d'auto-anticorps dirigés contre ces peptides citrullinés. Cette étape pourrait se passer initialement dans le poumon, la citrullination étant favorisée par l'inhalation de fumée de tabac (30). Les raisons du tropisme de ces ACPA pour le tissu synovial restent pour l'instant inconnues puisque les peptides citrullinés sont ubiquitaires. De même les mécanismes aboutissant à l'inflammation du tissu synovial ne sont pour l'instant pas complètement élucidés bien que des études aient montré un effet pathogène propre des ACPA (97).

Les ACPA ont une très bonne spécificité dans le diagnostic de la PR de l'ordre de 95% mais leur sensibilité reste plus faible de l'ordre de 70% (94). Ainsi, 30% des PR en phase d'état n'ont pas d'ACPA et les études suggèrent que ces PR ont un phénotype différent des PR ACPA+. En effet, les PR ACPA- sont en général associées à une plus faible activité de la maladie, un taux plus élevé de rémission (98, 99), une moins grande sévérité avec des scores d'érosions plus bas (98, 100, 101). Certaines études suggèrent aussi une différence dans la réponse au traitement entre ces 2 phénotypes de PR et notamment une meilleure réponse au rituximab (102, 103) ou à l'abatacept (104) en cas de présence d'ACPA. Les ACPA précèdent le plus souvent le début de la maladie et des études ont montré la présence de ces auto-anticorps jusqu'à 15 ans avant le début des signes cliniques (105). C'est probablement au

cours de cette phase préclinique où se passent les phénomènes de rupture de tolérance que les enjeux thérapeutiques des prochaines années vont se jouer.

## 2.4. Cytokines

De nombreuses études ont démontré l'implication de cytokines pro-inflammatoires dans la physiopathologie de la PR (92). Parmi elles, l'IL-1, l'IL-6, l'IL-17, le TNF- $\alpha$  et le VEGF jouent un rôle majeur. Elles jouent un rôle clé dans l'inflammation du tissu synovial, la destruction du cartilage et du tissu osseux, la survenue d'effets systémiques tels la production de CRP, l'accélération de la VS, la survenue d'une anémie inflammatoire, la survenue de maladies cardio-vasculaires, la survenue d'une ostéoporose, la fatigue ou la dépression. Les principaux effets de ces cytokines sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Effet des cytokines jouant un rôle majeur dans la physiopathologie de la PR :

Cytokines	Rôle dans le processus pathologique de la PR
TNF- $\alpha$	<p>Effets locaux</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Activation des monocytes, production de cytokines, et de prostaglandines (PG)</li> <li>• Apoptose des lymphocytes T, régulation clonale</li> <li>• Augmentation des molécules d'adhésion des cellules endothéliales, production de cytokines</li> <li>• Diminution de la prolifération des fibroblastes synoviaux, synthèse de collagène</li> <li>• Synthèse de métalloprotéases matricielles (MMP) et de cytokines</li> </ul> <p>Effets systémiques</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Production de protéines de la phase aigüe de l'inflammation</li> <li>• Dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire (fatigue, dépression)</li> <li>• Promotion de maladies cardio-vasculaires</li> </ul>
IL-6	<p>Effets locaux</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Activation des ostéoclastes</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recrutement de polynucléaires neutrophiles</li> <li>• Formation du pannus synovial en favorisant la production de VEGF</li> <li>• Prolifération des lymphocytes B et production d'auto-anticorps</li> <li>• Prolifération des lymphocytes T et différenciation</li> </ul> <p>Effets systémiques</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Production de protéines de la phase aigüe de l'inflammation</li> <li>• Anémie</li> <li>• Promotion de maladies cardio-vasculaires</li> <li>• Ostéoporose</li> <li>• Dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire (fatigue, dépression)</li> </ul>
IL-1	<p>Effets locaux</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentation de la production de cytokines, chimiokines, MMP et PG par les fibroblastes synoviaux</li> <li>• Augmentation de la production de cytokines, dérivés oxygénés et PG par les monocytes</li> <li>• Activation des ostéoclastes</li> <li>• Expression des molécules d'adhésion des cellules endothéliales</li> </ul> <p>Effets systémiques</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Production de protéines de la phase aigüe de l'inflammation</li> <li>• Promotion de maladies cardio-vasculaires</li> <li>• Dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire (fatigue, dépression)</li> </ul>
IL-17	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recrutement des monocytes et des neutrophiles par production de chimiokines</li> <li>• Facilitation de l'infiltration de lymphocytes T et activation</li> <li>• Augmentation des cytokines produites par les fibroblastes synoviaux et relargage de MMP</li> <li>• Ostéoclastogénèse et destruction du cartilage</li> <li>• Activité synergique avec l'IL-1<math>\beta</math> le TNF-<math>\alpha</math> et l'INF-<math>\gamma</math></li> </ul>
VEGF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Angiogenèse permettant la formation du pannus synovial</li> </ul>

## 2.5. Destruction articulaire

La sévérité de la PR est conditionnée par la destruction articulaire et plusieurs mécanismes sont impliqués dans la pathogénie des érosions (91, 97).

- La prolifération des synoviocytes et l'infiltration de la membrane par les monocytes et les macrophages entraîne une hyperplasie tissulaire. Le synoviocyte de type ou fibroblastique (fibroblast-like synoviocyte) est la cellule dominante de l'hyperplasie synoviale et joue un rôle clé dans l'amplification de la cascade inflammatoire, faisant le lien entre l'immunité innée et adaptative. Ceci entraîne la formation du pannus synovial qui se comporte comme une tumeur invasive vis-à-vis des tissus avoisinants.
- Plusieurs cytokines notamment l'IL-1, l'IL-6 ou l'IL-17, les lymphocytes T et les synoviocytes stimulent les ostéoclastes. Le ligand du récepteur activateur de NF- $\kappa$ B (receptor activator of nuclear factor ligand [RANKL]) est exprimé par de nombreuses cellules et notamment les lymphocytes T et les synoviocytes. La présence de cytokines telles le TNF- $\alpha$  ou de certains facteurs de croissance comme le M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor), contribuent à la maturation et l'activation de l'ostéoclaste induite par la liaison de RANKL à son récepteur membranaire RANK.
- Les fonctions des chondrocytes et la synthèse de collagène sont altérés par les lymphocytes T, ce qui nuit aux capacités de réparation du cartilage articulaire. Une surproduction intra-articulaire de certaines collagénases, notamment les MMP-1 et MMP-3, principalement synthétisées par les synoviocytes de type B et accessoirement par les chondrocytes sont capables de dégrader les principaux

composants de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire conduisant ainsi aux destructions articulaires caractéristiques de la maladie.

### **3. Histoire naturelle de la PR**

L'inflammation de la membrane synoviale entraîne des douleurs et des gonflements et à moyen terme des destructions articulaires. La topographie de l'atteinte articulaire est classiquement distale et symétrique, les grosses articulations étant en général touchées plus tardivement. Les destructions articulaires entraînent des déformations caractéristiques et une impotence fonctionnelle. Les gaines tendineuses peuvent également être touchées par l'inflammation ce qui peut aboutir à terme à des ruptures tendineuses. Enfin des complications extra-articulaires sont souvent observées, surtout dans les formes tardives et sévères comme les nodules rhumatoïdes, l'atteinte interstitielle ou bronchiolaire pulmonaire, les vascularites, les sclérites ou épisclérites etc...

Toutes les PR n'évoluent pas vers une forme sévère destructrice. Les facteurs associés à la sévérité identifiés sont le sexe féminin, la présence de FR et d'ACPA, la présence de *HLA-DRB1\*SE+*, le bas niveau socio-économique, le tabagisme, l'activité du rhumatisme inflammatoire et notamment la CRP, le HAQ ou la présence d'érosions au début de la maladie et la progression rapide à 1 an d'évolution (8, 106-111).

La mortalité est accrue dans la PR du fait d'une augmentation du risque de maladies cardiovasculaires, d'une augmentation du risque d'infections, de cancers et du risque de iatrogénie (112). Cette surmortalité tend à diminuer depuis 50 ans du fait d'une meilleure prise en charge de la maladie et des comorbidités (3).

## 4. Diagnostic de la PR

Il repose sur un faisceau d'arguments combinant des signes cliniques, biologiques et radiologiques.

Les anciens critères encore souvent utilisés ont été définis par l'American College of Rheumatology (ACR) en 1987 (113). Ils sont résumés dans le tableau 4 suivant :

Tableau 4 : Critères ACR 1987 de classification de la polyarthrite rhumatoïde

1. Raideur articulaire matinale
2. Arthrite d'au moins 3 groupes articulaires
3. Arthrite des articulations des mains
4. Arthrite symétrique
5. Nodules rhumatoïdes
6. Facteur rhumatoïde sérique
7. Modifications radiologiques typiques

4 critères sur 7 sont requis pour poser le diagnostic de PR.

Récemment, de nouveaux critères de classification ont été proposés par les sociétés savantes de l'ACR et de l'European League Against Rheumatism (EULAR) : les critères ACR/EULAR 2010 (114). Devant un tableau d'arthrite récente (au moins une articulation gonflée), il convient d'écarter en premier lieu les autres causes d'arthrite (septique, micro-cristalline, autres rhumatismes inflammatoires). Si les radiographies montrent alors des érosions typiques, le patient est classé PR. En l'absence d'érosion, on calcule un score en fonction de la présence ou non d'un certain nombre d'items résumés dans le tableau 5.



Tableau 5 : critères diagnostiques de PR ACR/EULAR 2010 :

Signes	Score
Articulation(s) touchée(s), gonflées ou douloureuses:	
1 grosse articulation	0
2 à 10 grosses articulations	1
1 à 3 petites articulations (avec ou sans grosses articulations)	2
4 à 10 petites articulations (avec ou sans grosses articulations)	3
>10 articulations (dont au moins une petite)	5
Sérologies	
FR et ACPA négatifs	0
Faible taux de FR et/ou d'ACPA (de 1 à 3 fois la normale)	2
Taux élevé de FR ou d'ACPA (>3 fois la normale)	3
Syndrome inflammatoire	
VS et CRP normales	0
VS et/ou CRP anormales	1
Durée des symptômes	
<6 semaines	0
≥6 semaines	1

Si le score obtenu est supérieur ou égal à 6, le diagnostic de PR peut être retenu.

## 5. Traitement de la PR

Une fois le diagnostic établi, le traitement repose sur la mise en place d'un traitement de fond.

On distingue 2 types de traitements de fond : les traitements de fonds synthétiques ou DMARDs (Disease modifying Anti-Rheumatic Drugs) au premier du rang desquels se trouve le méthotrexate et les traitements de fonds biologiques ou biothérapies, développés depuis une

quinzaine d'année qui ciblent des facteurs clés de la cascade inflammatoire de l'auto-immunité. Actuellement, 5 classes thérapeutiques ont l'AMM en France dans le traitement de la PR : les anti-TNF $\alpha$ , un anti-IL-1, un anti-IL-6R, un anti-CD20 ciblant le lymphocyte B et un anti- CD80/CD86 inhibant la co-stimulation du lymphocyte T. En dehors de l'anti-IL-1 dont l'efficacité clinique est décevante, les autres biothérapies ont démontré leur efficacité en termes de réduction de l'activité de la maladie et de prévention des dommages structuraux.

Néanmoins, ils entraînent une augmentation du risque infectieux, restent des thérapies coûteuses et ne sont réservés qu'au patients en échec ou en cas d'intolérance au methotrexate.

Parmi ces biothérapies, nous développons ici quelques éléments de mécanismes d'action du rituximab qui fait l'objet d'un travail dans cette thèse.

Le rituximab est un anticorps monoclonal dirigé contre le CD20, une protéine de surface présente sur les lymphocytes B matures. Cette biothérapie avait été développée initialement dans le traitement du lymphome malin non Hodgkinien et s'avère efficace dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (115), entraînant une déplétion en lymphocytes B prolongée, à l'origine de son action sur l'activité de la maladie et sur la progression structurale. Il a été montré à plusieurs reprises que la réponse au rituximab était meilleure chez les patients ACPA + et FR+ ceci suggérant l'intérêt d'utiliser des biomarqueurs prédictifs de la réponse au traitement.

Il existe plusieurs critères d'évaluation de l'efficacité clinique du traitement. Un des critères d'efficacité est la réponse EULAR (116) qui se juge par l'importance de la variation du DAS28 avant et après traitement et par le DAS28 obtenu après traitement. Le DAS28 (117, 118) est un score composite qui comprend le nombre d'articulations douloureuses sur 28, le nombre d'articulations gonflées sur 28, la VS et l'appréciation globale de l'activité de la

maladie par le malade. Le DAS 28 se calcule selon la formule suivante :  $DAS\ 28 = [0,56 \times (\text{nombre d'articulations douloureuses})] + [0,28 \times (\text{nombre de synovites})] + [0,7 \times \text{Ln}(\text{vitesse de sédimentation})] + [0,014 \times (\text{appréciation globale de la maladie par le patient})]$ .

Le tableau 7 ci-dessous reprend les critères de réponse EULAR.

Tableau 7 : réponse EULAR en fonction du DAS28 :

Valeur actuelle du DAS28	Variation du DAS 28		
	>1,2	0,6 < variation du DAS28 < 1,2	0,6
3,2	Bonne	Modérée	Nulle
3,2 < DAS28 < 5,1	Modérée	Modérée	Nulle
>5,1	Modérée	Nulle	Nulle

Parmi les autres critères d'efficacité, citons la réponse ACR (20, 50 ou 70), critère composite clinique et biologique, le taux de patients en rémission, la rémission pouvant être définie à partir de différents critères composites tels le DAS28, le SDAI ou le CDAI, l'efficacité sur le taux de progression structurale.

A côté des traitements de fonds, des traitements symptomatiques sont souvent proposés et comprennent des antalgiques de pallier 1 ou 2, des anti-inflammatoires non stéroïdiens, des glucocorticoïdes et des infiltrations intra-articulaires de dérivés cortisoniques.

Des mesures non pharmacologiques sont souvent nécessaires comprenant la rééducation, la confection d'orthèses, des interventions orthopédiques avec mise en place d'arthroplastie ou d'arthrodèse, la prise en charge psycho-sociale.

La plupart des PR récentes répondent de façon satisfaisante au méthotrexate qui permet de contrôler l'activité de la maladie de façon satisfaisante et d'inhiber la progression structurale.

Cependant une faible proportion de patients aura une réponse inadaptée au méthotrexate avec activité résiduelle persistante et/ou progression structurale rapide au cours de la première année. L'identification de ces patients « à risque » est devenue un enjeu majeur ces dernières années afin de pouvoir leur proposer rapidement un traitement plus puissant que le méthotrexate et notamment une biothérapie. De plus tous les patients ne répondent pas de la même façon aux différentes biothérapies et là aussi l'identification de facteurs individuels prédictifs de réponse permettrait d'éviter de proposer à un patient une biothérapie qui aurait une faible probabilité d'efficacité. Parmi les facteurs de risque de sévérité et les facteurs de réponse aux traitements, le terrain génétique intervient de façon certaine (119).

## **OBJECTIFS DE LA THESE**

Cette thèse a pour objectif d'identifier des associations entre les polymorphismes de gènes candidats et la sévérité structurale de la maladie définie par le risque d'érosions et de progression structurale chez les patients souffrant de PR récente. Elle a également pour objectif d'identifier des facteurs génétiques prédictifs de la réponse au traitement par rituximab.

## **PATIENTS ET METHODES**

### **1. Etudes d'association entre des gènes candidats et la sévérité structurale de la maladie**

#### 1.1. Patients

Le travail a été réalisé en grande partie sur les patients issus de la cohorte ESPOIR (Etude et Suivi des Polyarthrites Indifférenciées Récentes), une cohorte multicentrique française comprenant 813 patients issus de 14 centres inclus entre 2002 et 2005 et qui souffraient d'arthrite récente depuis moins de 6 mois, et n'ayant jamais reçu de traitement de fond. Ces patients étaient suivis tous les 6 mois de façon prospective pendant 2 ans puis tous les ans pour une durée de 10 ans.

Les variables démographiques, les antécédents, la consommation de tabac, les variables d'activité de la maladie, les traitements étaient collectés à chaque visite.

Tous les patients inclus dans la cohorte avaient donné leur consentement et l'étude avait reçu l'accord du comité d'éthique du CHU de Montpellier.

La cohorte RMP (Rangueil-Midi Pyrénées) a été également étudiée afin de répliquer les résultats obtenus à partir des données d'ESPOIR. Il s'agit d'une cohorte de 160 patients souffrant de PR récente et suivis annuellement dans le centre de rhumatologie du CHU de Toulouse.

Tous les patients inclus dans la cohorte avaient donné leur consentement et l'étude avait reçu l'accord du Comité Consultatif de Protection des Personnes en matière de Recherche Biomédicale de Toulouse.

### 1.2. Données biologiques

La VS et la CRP ont été mesurées de façon centralisée à l'inclusion, dans les 2 cohortes.

Les anti-CCP ont également été dosés de manière centralisée dans ESPOIR (ELISA, DiaSorin, France, seuil de positivité >50U/mL) et dans RMP (ELISA, IMMUNOSCAN RA; Euro-Diagnostica, Arnhem, The Netherlands).

### 1.3. Génotypages

Les polymorphismes des gènes candidats ont été sélectionnés à partir des données de la littérature. Les polymorphismes d'intérêt étaient notamment localisés sur des gènes impliqués dans la physiopathologie de la PR ou bien étaient associés de façon significative à la susceptibilité de la PR dans des études de type GWAS. D'autres variants associés à d'autres pathologies auto-immunes et situés sur des gènes codant pour des protéines potentiellement impliquées dans la physiopathologie de la PR ont également été génotypés.

Le tableau 8 ci-dessous reprend la liste des SNPs qui ont été génotypés pour ce projet.

Nom du gène	Identifiant dbSNP	SNPs	% Alleles HapMap-CEU
TRAF1 C5 PHF19	ID: 7185	rs 10818488 rs 7021880 rs 1953126	A/G (A=0,53) C/G (C=0,50) C/T (C=0,55)
C5	ID : 727	rs 2269067	C/G (C=0,24)
PTPN22	ID: 26191	rs2476601	A/G (A=0,14)
CD40/TNFRSF5	ID : 958	rs 1800686	A/G (A=0,25)

		rs 1883832 rs 4810485	C/T (C=0,78) G/T (G=0,76)
STAT4	ID:6775	rs7574865	G/T (G=0,80)
IL2RA	ID : 3559	rs2104286	A/G (A=0,77)
IL2RB	ID : 3560	rs743777 rs3218253	A/G (A=0,73) C/T (C=0,79)
KAZALD1	ID:81621	rs10786617 rs807037	C/T (C=0,68) C/G (C=0,35)
TNFAIP2	ID : 7127	rs2771369 rs749206	A/G (A=0,15) A/G (A=0,70)
TNFAIP3	ID : 7128	rs6920220 rs10499194 rs661561	A/G (A=0,18) C/T (C=0,83) G/T (G=0,59)
IL6	ID : 3569	rs1800795	C/G (C=0,53)
IL10	ID : 3586	rs1800896 rs1800872	A/G (A=0,47) A/C (A=0,21)
TNF	ID : 7124	rs1800629 rs1799964	A/G (A=0,22) C/T (C=0,21)
IL4	ID : 3565	rs2243250	C/T(C=0,84)
IL4R	ID : 3566	rs180510 rs1801275	A/G (A=0,56) A/G (A=0,78)
MIC1 (GDF15)	ID : 9518	rs1059519 rs1059369	C/G (C=0,38) A/T (A=0,84)
COX2 (PTGS2)	ID: 5743	rs20417 rs5275	C/G (C=0,18) C/T (C=0,37)
IL1A	ID: 3552	rs3783526 rs17561	A/G (A=0,67) G/T (G=0,69)
IL1B	ID:3553	rs16944 rs1143634	A/G (A=0,35) C/T (C=0,78)
IL1RN	ID: 3557	rs419598 rs315951	C/T (C=0,28) C/G (C=0,26)
TLR4	ID: 7099	rs10759932 rs1927911	C/T (C=0,15) C/T (C=0,75)
RANK (TNFRSF11A)	ID: 8792	rs1805034 rs8086340 rs35211496	C/T (C=0,53) C/G (C=0,49) C/T (C=0,79)
RANKL (TNFSF11)	ID: 8600	rs1054016 rs7325635 rs2277438 rs7984870	G/T (G=0,50) A/G (A=0,49) A/G (A=0,77) C/G (C=0,50)
OPG	ID: 4982	rs2073618 rs2073617 rs10955911	C/G (C=0,54) C/T (C=0,56) A/G (A=0,14)
IL17A	ID : 3605	rs2275913 rs10484879 rs1974226	A/G (A=0,35) A/C (A=0,20) A/G (A=0,22)
IL17RA	ID : 23765	rs4819553 rs879577	A/G (A=0,82) A/G (A=0,38)
IL17RC	ID : 84818	rs708567	A/G (A=0,48)



		rs456520	A/T (A=0,38)
MIF	ID : 4282	rs755622 rs2096525 rs2070766	C/G (C=0,87) C/T (C=0,12) C/G (C=0,85)
FCGR3IA	ID : 2214	rs396991	G/T (G=0,45)
FCGR2IA	ID : 2212	rs1801274	C/T (C=0,51)
FCGR2IB	ID : 2213	rs1050501 rs3219018	C/T (C=0,12) C/G (C=0,17)
GSTM1	ID : 2944	rs2071487	C/T (C=0,68)
MBL2	ID : 4153	rs7095891 rs1838065	A/G (A=0,19) A/G (A=0,63)
NRAMP1 (SLC11A1)	ID : 6556	rs2276631 rs2290708 rs1059823	A/G (A=0,22) C/T (C=0,80) A/G (A=0,61)
SDF1 (CXCL12)	ID : 6387	rs2839687 rs7093481 rs1029153	A/G (A=0,84) A/G (A=0,68) C/T (C=0,34)
TGFB1	ID : 7040	rs2241715 rs4803455	G/T (G=0,70) A/C (A=0,48)
TNFR1 (TNFRSF1A)	ID : 7132	rs767455 rs4149576	C/T (C=0,51) A/G (A=0,50)
TNFR2 (TNFRSF1B)	ID : 7133	rs1061622 rs1768642	G/T (G=0,25) C/T (C=0,77)
MHC2TA	ID : 4261	rs3087456 rs4774	G/A (G=35,9) C/G (G=0,32)
E-Selectin	ID : 6401	rs2076059 rs3917436	C/T (C=0,56) C/T (C=0,80)
APRIL (TNFSF13)	ID : 8741	rs11552708 rs3803800	A/G (A=0,15) A/G (A=0,23)
BAFF (TNFSF13B)	ID : 10673	rs9514828 rs9514829	C/T (C=0,52) C/G (C=0,28)
TACI (TNFRSF13B)	ID : 23495	rs34562254 rs4985700	C/T (C=0,78) A/C (A=0,63)
BCMA (TNFRSF17)	ID : 608	rs11570136 rs1126889	A/T (A=0,37) C/G (C=0,61)
BAFFR (TNFRSF13C)	ID : 115650	rs7290134	A/G (A=0,78)
NFKB1	ID : 4790	rs3774932 rs230526	A/G (A=0,36) C/T (C=0,53)
NFKB2	ID : 4791	rs12772374 rs7897947	A/G (A=0,82) G/T (G=0,16)
IKBL	ID : 4795	rs2071592 rs2523500	A/T (A=0,64) C/T (C=0,36)
VEGF	ID : 7422	rs2010963 rs10434	C/G (C=0,42) A/G (A=0,37)
AMPD1	ID: 270	rs17602729	A/G (A=0,13)
ITPA	ID: 3704	rs1127354	A/C (A=0,08)
ATIC (AICARFT)	ID: 471	rs2372536	C/G (C=0,73)
MTHFD1	ID : 4522	rs2236225	C/T (C=0,54)
MTHFR	ID : 4524	rs1801133	C/T (C=0,76)

		rs1801131	A/C (A=0,64)
ABCB1 (MDR1)	ID : 5243	rs2032582 rs9282564	G/T (G=0,6) A/G (A=0,9)
ABCC2	ID : 1244	rs717620 rs2273697	A/G (A=0,23) A/G (A=0,23)
MTR (MS)	ID : 4548	rs1805087	A/G (A=0,83)
MTRR	ID : 4552	rs1801394	A/G (A=0,55)
SHMT1	ID : 6470	rs1979277	A/G (A=0,34)
VIP	ID : 7432	rs3799142 rs688136	A/G (A=0,86) C/T (C=0,38)
VIPR1 (VPAC1)	ID : 7433	rs897 rs342511 rs8913	C/T (C=0,59) C/T (C=0,29) C/T (C=0,44)
VIPR2 (VPAC2)	ID : 7434	rs885863 rs1062610 rs885861	A/G (A=0,63) A/G (A=0,62) C/T (C=0,38)
DKK1	ID : 22943	rs2241529 rs1569198	A/G (A=0,48) A/G (A=0,58)
LRP5	ID : 4041	rs312016 rs3736228	A/G (A=0,33) C/T (C=0,88)
FRZB	ID : 2487	rs288324 rs228330	A/G (A=0,56) C/T (C=0,63)
IL12A	ID : 3592	rs583911 rs568408	A/G (A=0,75) A/G (A=0,18)
IL12B	ID : 3593	rs6887695 rs3212227	C/G (C=32) A/C (A=0,63)
IL23R	ID : 149233	rs1884444 rs7530511 rs10889677	G/T (G=0,44) C/T (C=0,88) A/C (A=0,28)
BAT1	ID : 7919	rs2239528 rs3130059	A/G (A=0,32) C/G (C=0,37)
HMOX1	ID : 3162	rs2071746 rs2071747 rs2071748	A/T (A=0,54) C/G (C=0,36) A/G (A=0,38)

Tous les génotypages d'ESPOIR ont été réalisés par Kbiosciences (Herts, Grande Bretagne) par PCR par méthode KASPar. En cas d'association significative sur ESPOIR, les SNPs associés ont été génotypés sur la cohorte RMP par Kbiosciences selon la même procédure.

Les génotypages concernant les allèles d'*HLA-DRBI* ont été réalisés en 4 digits par le laboratoire d'immunologie du CHU de Montpellier sur ESPOIR et au laboratoire d'immunologie du CHU de Toulouse sur RMP. La séquence d'acides aminés de la molécule

HLA-DRB1 correspondant à chaque allèle a été identifiée par méthode de maximum de vraisemblance par Pierre-Antoine Gourraud, ingénieur en biostatistiques (Service de Neurologie, université de Californie, San Francisco, Etats Unis).

#### 1.4. Radiographies

Les radiographies d'ESPOIR ont été lues de manière centralisée à l'inclusion et à 1 an dans ESPOIR par le Dr Cédric Lukas (Montpellier) et un score de Sharp modifié par van der Heijde a été attribué à chaque patient comprenant un score de Sharp total (mTSS), un score de Sharp érosion (mESS) et un score de Sharp pincement (mNSS).

La plus petite différence mise en évidence par le score de Sharp (SDD) a été calculée et était de 1 point. La reproductibilité intra-observateur a également été calculée avec un coefficient de corrélation intra-classe qui était excellent autour de 0.99.

Les radiographies de RMP à l'inclusion, 1 an, 2 ans et 3 ans ont également été lues de manière centralisée par le Pr Alain Cantagrel et le Dr Frédérique Navaux ou le Dr Arnaud Constantin et le score de Sharp modifié par van der Heijde a été attribué à chaque radiographie. La reproductibilité intra-observateur était également excellente avec un coefficient de corrélation intra-classe de 0.98.

Etant donné que le SDD était de 1 point de mTSS, le statut érosif a été défini par la présence d'un score de Sharp érosion  $\geq 1$  point, le statut progressateur a été défini par la variation du score de Sharp total  $\geq 1$  point au cours de la première année, le statut progressateur rapide par la variation du score de Sharp total  $\geq 5$  points au cours de la première année.

## 1.5. Analyses statistiques

### *1.5.1. Associations entre les polymorphismes des gènes candidats (hors HLA) et la sévérité structurale*

L'analyse a porté sur les patients répondant aux critères ACR87 (n=579)

La recherche d'association entre les SNPs génotypés et la sévérité structurale a été réalisée en comparant les fréquences suivantes au sein des génotypes pour chaque SNP :

- Proportion de patients érosifs à l'inclusion et à un an
- Proportion de patients progresseurs
- Proportion de patients progresseurs rapides

Les moyennes de score de Sharp total et Sharp érosion, ainsi que les variations de score de Sharp en 1 an ont été comparées en fonction des génotypes pour chaque SNP.

Ces comparaisons ont été réalisées à l'inclusion et à 1 an et pour intégrer le caractère répété des mesures en fonction du temps et éviter de multiplier les tests multiples, un modèle linéaire mixte généralisé a été utilisé.

Une correction de Bonferroni pour les tests multiples a été appliquée en cas d'association statistiquement significative.

En cas d'association significative, les génotypages des SNPs associés ont été réalisés sur les patients de la cohorte RMP et une recherche d'association a été réalisée selon la même méthode et après méta-analyse par la méthode de Mantel-Haenszel.

La recherche de l'indépendance de l'association avec les autres variables habituellement associées au risque d'érosions a été recherchée par un modèle multivarié de type linéaire mixte généralisé, intégrant comme co-variables, l'âge, le sexe, la durée d'évolution des

symptômes, le DAS28, la consommation de tabac, l'usage de corticoïdes ou la mise en place d'un traitement de fond, la présence d'*HLA-DRBI SE+*.

*1.5.2. Association entre les allèles de HLA-DRBI et le risque d'ACPA et de progression structurale en 1 an*

L'analyse a porté sur les patients répondant aux critères ACR/EULAR à l'inclusion dans la cohorte (n=612).

L'objectif principal du travail était de proposer une nouvelle classification des allèles *HLA-DRBI* basée sur les propriétés acido-basiques des acides aminés aux positions 70 et 71 et de la comparer aux différentes classifications des allèles de *HLA-DRBI* en termes d'association avec le statut ACPA+ et le statut progresseur à un an défini par la variation du score de Sharp total entre l'inclusion et un an d'au moins un point (définition du SDD).

- Comparaison des systèmes de classification des allèles à risque : 4 systèmes de classification ont été analysés :
  - La classification acide-base : les allèles n'encodant pas le motif RAA en position 72-74 ont été appelés allèles X, ceux encodant le motif RAA en position 72-74 sont regroupés en allèles du groupe S. Ces derniers sont ensuite divisés en 3 groupes en fonction du pouvoir acido-basique des AA des positions 70 et 71 : les allèles encodant des AA basiques/basiques (Q-R-RAA et R-R-RAA) ou basiques/neutres (Q-K-RAA) ont été regroupés dans le groupe SB, les allèles encodant des AA acides/acides (D-E-RAA) dans le groupe SA, enfin les allèles encodant des AA neutres/neutres ou basiques/acides dans le groupe SN.

- La classification de Matthey : sépare les allèles en 3 groupes : ceux encodant l'épitope partagé (SE), ceux non SE encodant un D en position 70 (D70+) et ceux non SE n'encodant pas de D en position 70 (D70-)
- La classification de de Vries : sépare les allèles en 3 groupes : ceux encodant l'épitope partagé (SE), ceux encodant une isoleucine en position 67 (P) et ceux n'encodant pas une isoleucine en position 67 (N)
- La classification de Tezenas du Montcel : les allèles encodant le motif RAA sont regroupés dans le groupe S les autres le groupe X. Ceux du groupe S encodant un E ou un A en position 71 sont regroupés dans le groupe S1, ceux encodant un K dans le groupe S2, ceux encodant un R dans le groupe S3 lui-même divisé en 2 en fonction de l'AA en position 70 : s'il s'agit d'un R : les allèles sont regroupés en S3P, s'il s'agit d'un D, en S3D.

Pour chaque système de classification, le risque de statut ACPA+ ou progresser a été estimé en fonction du groupe d'allèles par régression logistique en prenant comme comparateur les non porteurs de ce groupe d'allèles, en ajustant sur le portage de l'épitope partagé. Enfin, ces analyses ont été répétées dans un modèle multivarié visant à expliquer le risque d'être progresser incluant les autres variables cliniques et biologiques associées au risque d'ACPA et de progression (âge, sexe, durée de la maladie, DAS28 à l'inclusion, traitements par corticoïdes et/ou DMARDs).

L'analyse par génotype n'a pas été réalisée du fait du faible effectif et du grand nombre de génotypes ne permettant pas un effectif suffisant pour tester les associations en fonction de chaque génotype étudié.

### 1.5.3. Matrice de prédiction du risque de progression structurale rapide

L'objectif principal était d'établir une matrice de prédiction du risque de progression structurale rapide à partir de données cliniques, biologiques, structurales et génétiques à l'inclusion dans la cohorte ESPOIR.

L'analyse a porté sur les patients ayant débuté un traitement de fond par méthotrexate ou léflunomide au cours de la première année de suivi.

La progression structurale rapide a été définie par la variation du score de Sharp total d'au moins 5 points en 1 an.

Une recherche d'association entre les SNPs décrits plus haut et le statut progressateur rapide a été réalisée par un test de Chi<sup>2</sup>. Une recherche d'association entre le portage des allèles encodant l'*épitope partagé* et le statut progressateur rapide a été réalisée par un test du Chi<sup>2</sup>

La recherche d'association entre les variables cliniques (âge, sexe, durée de la maladie, DAS28, nombre d'articulations gonflées, nombre d'articulations douloureuses), biologiques (VS, CRP, ACPA, FR) et radiologiques (statut érosif à l'inclusion) et le risque de progression rapide a déjà été réalisée dans une étude précédente (120).

A partir des variables associées à la progression structurale rapide, un modèle multivarié a été construit par régression logistique expliquant le risque d'être progressateur rapide. Des modèles de sélection en avant, en arrière et stepwise ont été pratiqués pour ne garder que les variables liées de manière indépendante au statut progressateur rapide. A partir des variables ainsi sélectionnées, une matrice de prédiction du risque de progression rapide a été élaborée. Les intervalles de confiances ont été calculés par méthodes de Bootstrap. Les différents modèles ont été comparés par méthodes des aires sous la courbe.

## 2. Etudes d'associations avec la réponse au traitement

### 2.1. Patients :

Le travail a porté sur les patients issus d'un essai contrôlé randomisé (SMART) visant à évaluer l'intérêt de 2 stratégies de retraitement par rituximab après un premier cycle de rituximab chez des patients atteints de PR en échec à au moins un anti-TNF $\alpha$ . En bref, 224 patients traités par méthotrexate recevaient un cycle standard de rituximab et étaient réévalués à 24 mois, l'efficacité étant jugée sur la réponse EULAR. Sur ces 224 patients, 115 ont donné leur consentement pour une étude ancillaire visant à tester l'association entre certains SNPs de gènes candidats et la réponse EULAR à 24 mois et sont donc inclus dans cette étude.

### 2.2. Données analysées

Les biomarqueurs de l'activité de cellules B tels que les ACPA et les FR étaient prélevés avant le premier cycle de rituximab.

Vingt SNPs issus de 10 gènes encodant des marqueurs membranaires des cellules B, des molécules d'activation des cellules B, des molécules impliquées dans la signalisation du récepteur des cellules B ou des récepteurs membranaires du Fc des immunoglobulines ont été génotypés par Kbiosciences (Herts, Grande Bretagne) par PCR par méthode KASPar.

Tableau 9 : liste des SNPs génotypés dans l'étude SMART :

<b>HUGO Name</b>	<b>Chs</b>	<b>Locus Link ID</b>	<b>db SNP ID</b>	
MS4A1 (CD20)	11q13	931	rs1941030 rs1051593	Intron1 Exon8 3'UTR



FCGR3A (CD16)	1q23	2214	rs396991 rs396716	Exon4 V212F Exon H158Y
FCGR2A (CD32A)	1q21-23	2212	rs6671847 rs1801274	Intron 3 Exon4 R166H
FCGR2B (CD32B)	1q22	2213	rs1050501 rs3219018	Ile187Thr -343 functional promoter
INPP5D (SHIP Phosphatase)	2q36-q37	3635	rs1057258 rs9247	3'UTR Exon NS
SYK kinase	9q22	6850	rs2290888 rs158688	Exon 10 - Syn Exon14 – 3'UTR
LYN oncogene	8q13-qter	4067	rs1050855 rs2227980	Exon 1 – 5'UTR Exon 8 – Syn
TNFSF13 (APRIL)		8741	rs11552708 rs3803800	Exon 1 – ArgGly Exon 2 – SerAsn
TNFSF13B (BAFF)	13q32-q34	10673	rs9514828 rs9520836	5' near gene Intron 5
TNFRSF13B (TACI)	17p11.2	23495	rs6502543 rs2274892	Intron 1 Intron 3

### 2.3. Analyses statistiques

La réponse EULAR à 24 semaines a été comparée en fonction du portage des génotypes des différents SNPs analysés à l'aide d'un test du Chi2 ou Exact de Fisher si approprié. En cas d'association positive, un modèle multivarié a été construit de régression logistique intégrant les variables cliniques associées à la réponse EULAR en univarié : le DAS28 CRP à l'inclusion, la présence de FR, la présence d'ACPA, le taux d'IgG, la prise de glucocorticoïdes.

## RESULTATS

### **1. Association entre les SNPs de gènes candidats et la sévérité structurale de la PR :**

Sur les 137 SNPs testés, 17 sont associés de manière significative avec un  $p < 0,05$  avec la présence d'érosions à l'inclusion ou à un an.

Parmi ces SNPs, 2 présents sur le gène d'*IL2RB* sont associés de façon très significative avec le risque d'érosions chez les patients ACPA +. L'étude d'association en haplotype de ces polymorphismes avec le risque d'érosions sur la cohorte RMP a montré une tendance significative d'association entre l'haplotype AC et le risque d'érosions à 1 an. La méta-analyse a confirmé cette association chez tous les patients et chez les patients ACPA+ (cf annexe 3).

Pour les autres SNP associés au risque d'érosion, une étude de répliation sur une cohorte indépendante de 800 patients atteints de PR est en cours.

## 2. Nouvelle classification des allèles de *HLA-DRB1* basée sur les propriétés acido-basiques des AA en position 70 et 71 de la molécule

En classant les allèles en fonction des propriétés acido-basiques des AA aux positions 70 et 71, on observe une hiérarchie du risque de production d'ACPA ou de progression structurale :

- les allèles classés dans le groupe SB qui regroupe les allèles encodant les motifs Q-K-RAA, Q-R-RAA et R-R-RAA sont associés de manière indépendante au statut ACPA + (OR=2,59 [IC 95% : 1,60-4,19], p=0,0001) et à la progression structurale (OR=2,20 [IC 95%=1,34-3,59], p=0,002)
- Les allèles classés dans le groupe SA qui regroupe les allèles encodant le motif D-E-RAA sont statistiquement associés à la protection de la production d'ACPA (OR=0,41 [IC 95% : 0,24-0,68], p=0,0005) et à la protection du risque de progression structurale (OR=0,51 [IC 95% : 0,28-0,92], p=0,02)
- Les allèles classés dans le groupe SN regroupant qui regroupe des allèles encodant des AA neutres aux positions 70 et 71 ou un AA acide et un AA basique aux positions 70 et 71, ainsi que le motif RAA en position 72-74, ne sont pas statistiquement associés de manière indépendante au risque de production d'ACPA (OR=0,79 [IC 95% :0,48-1,30], p=0,4) ou à la progression structurale (OR=0,62 [IC 95% :0,33-1,14], p=0,1)
- Les allèles classés dans le groupe X regroupant les allèles n'encodant pas le motif RAA en position 72-74 sont statistiquement associées à la protection vis-à-vis de la production d'ACPA (OR=0,38 [0,24-0,61], p<0,0001) tandis qu'ils ne sont pas associés indépendamment à la progression structurale (OR=0,93 [0,51-1,68], p=0,8).

Cf annexe 4

### 3. Matrice de prédiction du risque de progression rapide

#### Caractéristiques des patients :

Parmi les patients de la cohorte ESPOIR, 420 ont débuté un traitement par méthotrexate ou léflunomide et font partie de la population d'intérêt.

Les caractéristiques des patients inclus dans l'étude sont résumées dans le tableau 1 suivant :

Tableau 1 : caractéristiques des patients inclus dans l'étude :

Caractéristiques	Progresseurs rapides (n=43)	Non progresseurs rapides (n=318)
Age, médiane [EIQ]	52,2 [41,7-57,1]	51,1 [41,1-57,1]
Sexe, nombre de femmes (%)	32 (74)	240 (75)
Durée de la maladie, mois, médiane [EIQ]	6 [3-10]	5 [3-8]
NAD, médiane [EIQ]	6 [3-13]	7 [4-14]
<b>NAG, médiane [EIQ]</b>	8 [4-13]	7 [4-11]
VS, médiane [EIQ]	31 [16-48]	23 [12-40]
<b>CRP, médiane [EIQ]</b>	<b>16 [7-45]*</b>	<b>10 [0-26]*</b>
Facteur Rhumatoïde +, nombre (%)	30 (70)	174 (55)
<b>ACPA, nombre (%)</b>	<b>33 (77)*</b>	<b>155 (49)*</b>

<b>Porteurs de l'épitope partagé, nombre (%)</b>	<b>33 (80)*</b>	<b>180 (58)*</b>
<b>Erosifs à l'inclusion, nombre (%)</b>	<b>38 (88)*</b>	<b>193 (61)*</b>
Score de Sharp total, médiane [EIQ]	<b>9 [5-19]*</b>	<b>3 [1-7]*</b>

---

EIQ : espace interquartile, ACPA : anticorps anti-peptides citrullinés, NAD : nombre d'articulations douloureuses, NAG : nombre d'articulations gonflées, VS : vitesse de sédimentation, CRP : protéine C-réactive, \* comparaison avec p value<0,05.

Les patients ayant une progression rapide dans l'année avaient une CRP plus élevée en médiane à l'inclusion, étaient plus fréquemment ACPA+, plus fréquemment érosifs à l'inclusion et plus fréquemment porteurs de l'épitope partagé.

### **Analyse multivariée pour tester l'indépendance de l'association avec la progression structurale rapide**

Un modèle de régression logistique a été réalisé pour tester l'indépendance des associations observées en analyse univariée avec la progression structurale rapide comme variable à expliquer. Après processus de sélection en arrière, en avant et stepwise, seules les variables nombre d'articulations gonflées en classe, présence d'érosions typiques et présence d'ACPA étaient significativement associées à la progression rapide avec un p<0.05 (tableau 2).

Tableau 2 : Analyses multivariées testant l'association avec le risque de progression structurale rapide

<b>Variables explicatives</b>	<b>OR [IC 95%]</b>	<b>p value</b>
NAG	1	-
• <14	1,64 [0,55-4,87]	0,4
• 14-20	4,23 [1,15-15,6]	0,03
• 20		
CRP	1	-
• < 4	1,85 [0,65-5,23]	0,2
• 4-35	2,23 [0,69-7,21]	0,2
• 35		
ACPA	2,63 [1,17-5,88]	0,02
Erosions à l'inclusion	4,26 [1,58-11,5]	0,004
Portage de l'Epitope Partagé	2,08 [0,89-4,88]	0,09

NAG : nombre d'articulations gonflées, CRP : protéine C réactive, ACPA : anticorps anti-peptides citrullinés.

Cependant, en comparant les différents modèles par méthodes des aires sous la courbe et tests de Hosmer-Lemeshow, il apparaît que le portage de l'épitope partagé augmente les qualités du modèle en termes de prédiction du risque. Le modèle de régression logistique final garde

donc comme variables explicatives la présence d'érosions typiques, la présence d'ACPA, le nombre d'articulations gonflées et la présence de l'épitope partagé.

Matrice de prédiction du risque de progression structurale rapide :

		Non Erosifs		Erosifs	
		Absence d'EP	Présence d'EP	Absence d'EP	Présence d'EP
ACPA +	NAG ≥ 20	0,14 [0,00, 0,82]	0,25 [0,00, 0,96]	0,42 [0,01, 0,98]	0,60 [0,01, 1,00]
	14 NAG < 20	0,05 [0,00, 0,58]	0,11 [0,00, 0,90]	0,20 [0,00, 0,95]	0,35 [0,00, 0,99]
	NAG < 14	0,03 [0,00, 0,20]	0,06 [0,00-0,60]	0,12 [0,01, 0,78]	0,22 [0,00, 0,96]
ACPA -	NAG ≥ 20	0,05 [0,00, 0,42]	0,11 [0,00, 0,81]	0,20 [0,00, 0,91]	0,35 [0,00, 0,98]
	14 NAG < 20	0,02 [0,00, 0,18]	0,04 [0,00, 0,58]	0,08 [0,00, 0,76]	0,16 [0,00, 0,95]
	NAG < 14	0,01 [0,00, 0,04]	0,02 [0,00, 0,19]	0,05 [0,00, 0,36]	0,09 [0,00, 0,77]
<b>Risque de progression rapide dans l'année</b>		< 10%	10-25%	25-50%	>50%

#### 4. Association entre des polymorphismes de gènes candidats et la réponse au rituximab dans la PR

Sur les 20 SNPs génotypés, 2 sont associés de manière significative à la réponse à 24 semaines au rituximab :

- Un SNP (rs396991) localisé sur le gène *FCGR3A*, qui se traduit par la substitution d'une valine par une phénylalanine en position 158 de la molécule FcγRIIIA (CD16), affectant l'expression, l'affinité du rituximab au FcγRIIIA et la toxicité liée au rituximab. Des études préliminaires avaient montré que le génotype VV du *FCGR3A* était associé à une meilleure réponse biologique au rituximab dans les proliférations clonales B et dans la cryoglobulinémie associée à l'hépatite C (121-123). Dans l'étude SMART, le portage de l'allèle V est associé à une meilleure réponse EULAR 24 semaine après un premier cycle de rituximab comparé aux patients non porteurs (91% de répondeurs vs 70%, OR 4,6 (IC 95% :1,5-13,6), p=0,006), cf annexe 5. Depuis la publication de ce travail d'autres études sont venues conforter ce résultat (124-126).
- Un SNP (rs 9514828) situé en amont du gène encodant *BAFF*, est associé aux taux de BAFF soluble dans les hémopathies, la cryoglobulinémie mixte associée à l'hépatite C, ou le syndrome de Sjögren primitif (123, 127-129). Dans l'étude SMART, l'allèle C du polymorphisme *BAFF-871C>T* est associé significativement à la réponse EULAR 24 semaines après un premier cycle de rituximab (OR = 4,1; IC 95% : 1,3-12,7; p = 0,017), cf annexe 6, ce qui a été confirmé par une étude italienne récente (130).



## CONCLUSIONS ET AGENDA DE RECHERCHE

Nous avons identifié un certain nombre de marqueurs génétiques prédictifs de la sévérité de la PR et de la réponse aux traitements. Certains d'entre eux pourraient être utiles pour focaliser précocement les approches thérapeutiques les plus agressives chez les malades susceptibles de développer les formes les plus sévères de PR.

Parmi les associations mises en évidence nous avons identifié une association entre 2 loci formant un haplotype AC situés sur le gène d'*IL2RB* et le risque de maladie érosive à l'inclusion et à un an dans une population de polyarthrite rhumatoïde récente. Ces SNPs avaient déjà été identifiés comme associés à la susceptibilité dans une étude de type GWAS portant sur environ 2000 patients atteints de PR et 3000 contrôles et validés dans une étude de réplication portant sur 4160 PR et 11238 patients contrôles mais à ce jour, aucune étude n'a mis en évidence d'association entre ces SNPs et le phénotype de la maladie, ici le caractère érosif de la maladie. L'association très forte mise en évidence sur ESPOIR n'est pas retrouvée de manière statistiquement significative sur notre cohorte de réplication RMP probablement du fait d'un manque de puissance. Un des principaux problèmes soulevés par ce type de résultat est son extrapolation à d'autres populations. En effet, la cohorte ESPOIR a la particularité d'être composée de patients dont le phénotype est extrêmement bien détaillé mais comporte un faible effectif de patients comparé à d'autres cohortes d'Europe du Nord ou Américaines qui comprennent plusieurs milliers de patients. L'association mise en évidence dans ESPOIR est peut être le fruit du hasard et seule une validation sur une population plus importante permettra de confirmer cette association. Nous sommes actuellement en train

d'effectuer des études de répliation sur un échantillon de 800 sujets atteints de polyarthrite rhumatoïde issues de 4 cohortes régionales dont RMP mais qui est très hétérogène avec des durées d'évolution de la maladie variables (en moyenne 11 ans) et des dates d'inclusion (dès 1992) très différentes impliquant des stratégies thérapeutiques différentes. Néanmoins, des échantillons ADN sont disponibles chez ces 800 sujets permettant d'effectuer une répliation sur le statut érosif et ACPA+. Dans cette étude l'association entre les variants d'IL2RB a été mise en évidence qu'avec le statut érosif défini par un score de Sharp érosion non nul. L'association en critère continu n'était pas significative, mais une tendance était néanmoins mise en évidence ; l'absence d'association statistiquement significative du score de Sharp analysé en variable continue peut être expliquée en partie par le fait que la majorité des patients avaient un score de Sharp total et érosion nul à l'inclusion et à 1 an et très peu ont progressé la première année.

Un autre problème soulevé par ce type d'analyse sur ESPOIR est l'absence de stratégie thérapeutique chez les patients inclus dans cette cohorte ce qui rend les études d'association avec l'activité ou la progression structurale difficiles d'interprétation. Nous avons fait le choix dans nos analyses de tester l'association entre ces polymorphismes et le risque d'érosions à l'inclusion des patients dans la cohorte alors que ceux-ci n'avaient reçu aucun traitement de fond afin d'éviter ces difficultés dans l'interprétation des résultats. Les tests d'association avec le risque d'érosions à un an ont été en revanche ajustés entre autres sur la prise de traitement de fond la première année, la prise de corticoïdes et la présence d'érosions à un an.

Nous présentons dans cette thèse un travail portant sur une nouvelle classification des allèles de *HLA-DRB1* basée sur les propriétés acido-basiques des acides aminés des positions 70 et 71 de la molécule HLA-DRB1. Dans cette classification les acides aminés acides en

position 70 et 71 semblent protecteurs contre le risque de développer des ACPA et d'érosions alors que ceux basiques sont à risque et regroupent l'Épitope Partagé. Notre travail ne prend en revanche pas en compte les travaux récents publiés en 2012 retrouvant une association avec les acides aminés en position 11, 71 ou 74 de *HLA-DRB1* ainsi qu'un acide aminé en position 9 de HLA-B et un acide aminé en position 9 de *HLA-DPBI* et le risque de développer une PR (69). Un travail sur l'association de ces acides aminés et le risque de développer des ACPA est actuellement en cours et permettra probablement d'enrichir cette classification.

Nous présentons également le travail portant sur l'élaboration d'une matrice de prédiction du risque de progression structurale rapide en un an intégrant les données de génétiques. Les analyses univariées ont montré que seul l'Épitope Partagé d'*HLA-DRB1* était statistiquement associé au risque de progression structurale rapide et ont donc été intégrés dans la matrice. Trois autres SNPs (rs10912580 situé à proximité d'*OX40L*, molécule co-stimulatrice impliquée dans la régulation de l'immunité T-dépendante, le rs767455 situé sur un gène codant pour un récepteur du TNF, le *TNFRSF1A*, et le rs2523500 situé sur *NKBIL1*, gène membre de la famille des protéines I-kappa-B dont le rôle est inconnu mais situé au sein du CMH I sur le chromosome 6) ont également été retrouvés comme associés au risque de progression structurale rapide, mais ne disposant pas d'autres études retrouvant ce type d'association, nous restons prudents quant à ces résultats et n'intégrons pas ces SNPs dans la matrice. Une fois encore, absence de stratégie thérapeutique dans la cohorte ESPOIR est un facteur limitant de l'appréciation de la réponse au traitement. Dans cette étude nous n'avons sélectionné que les patients traités par méthotrexate ou leflunomide afin d'homogénéiser notre population.

Un des points les plus prometteurs de ces recherches est l'association significative entre 2 SNPs et la réponse au traitement par rituximab. Depuis une quinzaine d'années, le nombre de biothérapies indiquées dans le traitement de la PR ne cesse de s'accroître et les cliniciens sont actuellement confrontés à des objectifs thérapeutiques de plus en plus ambitieux. Les enjeux actuels sont de développer des biomarqueurs prédictifs de réponse dans l'optique d'une médecine personnalisée (131). Dans le cadre du traitement par rituximab, des biomarqueurs prédictifs de réponse ont déjà été identifiés comme la présence de FR ou d'ACPA ainsi que le taux de gammaglobulines. L'essai thérapeutique SMART a permis d'étudier d'autres marqueurs tels le taux de BAFF (132) circulants ou bien le phénotype des populations B. Le FCGR3A est un gène codant pour un récepteur de surface aux immunoglobulines le FcγRIIIA et le polymorphisme impliqué dans cette étude implique la substitution d'une Valine par une Phénylalanine. Ceci entraînerait une diminution d'affinité du FcγRIIIA avec les IgG1 ce qui pourrait expliquer l'action de ce polymorphisme sur le niveau de déplétion B. L'association entre ce polymorphisme et le traitement par rituximab a déjà été retrouvée dans le traitement du lymphome malin non Hodgkinien (121) et les cryoglobulinémies associées à l'hépatite C (123). Enfin, une étude italienne a récemment retrouvé la même association entre le polymorphisme 158 V/F de *FCGR3A* et la réponse au traitement dans la PR (125).

Nous avons également identifié une association entre une SNP situé en amont du promoteur de BAFF et la réponse au traitement par rituximab. BAFF est une cytokine pro-inflammatoire de la famille du TNF, est principalement sécrétée par des cellules myéloïdes et joue un rôle important dans la maturation, l'homéostasie et la survie des lymphocytes B. le polymorphisme BAFF 187C>T a été rapporté comme associé avec le taux de BAFF dans certaines lymphoproliférations (129), le syndrome de Gougerot Sjogren primitif (129) mais pas dans la PR (127). Dans notre étude ce polymorphisme est également associé à la réponse

au rituximab et sa position en amont du promoteur suggère un rôle dans la régulation de l'expression du gène. Une étude récente a retrouvé une association entre un haplotype de 3 SNPs situés sur BAFF comprenant le BAFF 187 C>T et la réponse au rituximab dans la PR (130) permettant de conforter nos résultats.

Ce type de recherche est probablement très prometteuse dans l'avenir d'une médecine personnalisée et a déjà des applications dans d'autres disciplines, citons par exemple (133):

- l'allèle *HLA-B\*5701* qui augmenterait le risque d'hépatotoxicité à l'ofloxacine et les réactions d'hypersensibilité à l'abacavir, dans le traitement du VIH,
- Un SNP situé sur le gène *IL-28B* qui serait prédictif de réponse à l'association interféron a pegylé-ribavirine dans le traitement de l'hépatite C de génotype 1
- Un SNP situé sur *CYP2C9* et un sur *VKORC1* associés au risque hémorragique lié à l'utilisation de warfarine
- De nombreux SNP situés sur des gènes impliqués dans le métabolisme du methotrexate et associés à la toxicité du methotrexate ou à l'efficacité : citons notamment les gènes *MTHFR*, *MDR1*, *ABCB1*, *AMPD1*, *ATIC*, *ITPA* (119).

Notre agenda de recherche comporte notamment les points suivants :

- Répliquer les résultats obtenus à partir d'ESPOIR sur une cohorte indépendante de polyarthrites rhumatoïdes. En effet, la cohorte RMP ne comprend que 160 patients atteints de PR. Les associations significatives obtenues dans ESPOIR sont en rapport avec des différences de proportion de patients érosifs de l'ordre de 20% et surtout des effectifs déséquilibrés. La puissance des tests lorsqu'ils sont réalisés sur RMP est donc de l'ordre de 60 à 70% ce qui est insuffisant. Une cohorte de répllication constituée de 4 cohortes de PR existantes provenant de 4 centres cliniques (Paris, Bordeaux, Rouen et Toulouse) a été rassemblée et comprend plus de 800 patients. Cette cohorte fait donc l'objet d'une répllication des associations identifiées dans ESPOIR. La

réplication des données sur cette cohorte indépendante permettra d'établir avec certitude les associations observées. Quatorze SNP identifiés comme associés à la production d'ACPA et au statut érosif dans ESPOIR ont ainsi été génotypés sur cette cohorte et les analyses sont en cours.

- La recherche bibliographique qui avait motivé la réalisation des 170 SNPs initiaux date de 2008. Nous avons réactualisé notre recherche bibliographique et identifiés de nouveaux polymorphismes qui mériteraient d'être étudiés sur ESPOIR. Ainsi 15 nouveaux SNPs ont été génotypés et les analyses sont en cours d'exploitation.
- Améliorer la matrice de prédiction du risque de progression structurale rapide des patients de la cohorte ESPOIR. En effet, des études récentes ont montré que certains biomarqueurs étaient associés à la progression structurale comme l'IL-6, l'IL-18, l'IL-21, les TNFR I et II, les MMP1, MMP3, TIMP-1, ou des marqueurs génétiques des polymorphismes situés sur les gènes de l'*IL-6*, *TGFs*, *IL-10*. Le but du prochain travail est de tester en analyse univariée l'éventuelle association entre ces biomarqueurs et la progression structurale rapide dans ESPOIR. Si certains de ces marqueurs sont associés à la progression rapide, un nouveau modèle de prédiction pourrait être réalisé intégrant ces différents biomarqueurs et si le modèle prédictif est meilleur, une nouvelle matrice de prédiction du risque de progression structurale rapide pourrait être élaborée intégrant ces biomarqueurs.
- Un travail très préliminaire a permis d'objectiver des associations entre certains polymorphismes situés dans des gènes impliqués dans la voie du métabolisme du méthotrexate et dans la physiopathologie de la cascade inflammatoire de la PR et la réponse au traitement par méthotrexate définie par la réponse EULAR à 1 an après l'inclusion dans la cohorte ESPOIR ou le maintien thérapeutique. L'association entre ces polymorphismes et la réponse au traitement dans ESPOIR n'a encore jamais été

décrite et nous recherchons actuellement d'éventuelles collaborations avec des industriels pour répliquer ces résultats sur des données d'essais thérapeutiques.

- Les SNPs situés sur *FCGR3A* et *BAFF* semblent être de nouveaux biomarqueurs intéressants dans la prédiction de la réponse au traitement. Une utilisation combinée des 2 pourraient améliorer la prédiction de la réponse au traitement et nous projetons de réaliser une analyse complémentaire en utilisant un modèle additif.
- Au-delà de la PR, la génétique des spondyloarthrites est également en plein développement avec l'identification de nouveaux marqueurs de polymorphismes impliqués dans la susceptibilité de la maladie à côté du simple portage du *HLA-B27*. Nous avons ainsi pour projet de réaliser une étude de type gènes-candidats sur les patients de la cohorte de DESIR et de tester un certain nombre d'associations entre des polymorphismes génétiques et le phénotype de la spondyloarthrite.

En conclusion, nous restons persuadés que la génétique épidémiologique a sa place pour nous aider à mieux comprendre la physiopathologie de la PR et à prédire la sévérité de la maladie, mais aussi la réponse ou la tolérance thérapeutique. Les approches globales utilisant le criblage génomique et les approches plus ciblées utilisant une stratégie gènes candidats sont bien sûr complémentaires. Cependant, en attendant que les résultats issus des études de génétique épidémiologique soient transposables à la pratique quotidienne, l'information et l'éducation des malades, l'accès précoce à un médecin (rhumatologue) spécialisé dans la prise en charge des rhumatismes inflammatoires débutants, l'instauration précoce d'un traitement efficace (faute d'être adapté pour l'instant à la sévérité potentielle) et la surveillance adéquate de la tolérance et de l'efficacité d'un tel traitement sont autant d'exigences auxquelles peuvent prétendre tous les malades atteints de formes débutantes de PR (134).





## ANNEXES

### **1. Annexe 1: New insights into the genetics of immune response of rheumatoid arthritis.**

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie multifactorielle complexe avec une forte influence du terrain génétique de nombreuses réponses immunitaires aberrantes ont été décrites au cours de l'évolution de la maladie. Ces dernières années, la présence d'ACPA a été identifiée comme un élément clé du diagnostic et du pronostic de la maladie. La transformation post-traductionnelle de l'arginine en citrulline sur certaines protéines conduit à des modifications de la conformation de protéines et est un processus naturel. Dans certaines circonstances inconnues, une auto-réactivité dirigée contre ces protéines citrullinées se développe chez des sujets prédisposés. Les ACPAs précèdent souvent le diagnostic et le début des symptômes de nombreuses années. Les ACPAs sont présents chez 70% des sujets atteints de PR et constituent un important marqueur de la maladie différenciant des sous-groupes de patients avec un pronostic différent et une réponse au traitement différente. Au sein de la région HLA, des allèles de HLA-DRB1 sont fortement associés au risque de développer une PR et à la production d'ACPA. Des études d'association pan-génomiques ont permis d'identifier de nombreux loci situés en dehors de la région HLA associés à la production d'ACPA. Ces marqueurs de polymorphismes se situent en général à proximité de gènes impliqués dans la réponse immunitaire ou dans la transduction du signal des cellules immunitaires. Certains facteurs environnementaux comme le tabac sont fortement associés à la production d'ACPA. Dans cette revue, nous avons détaillé les gènes et loci associés aux PR ACPA+ ou aux PR ACPA- et avons clarifié le rôle éventuel de ces gènes dans le développement de la maladie.

REVIEW ARTICLE

## New insights into the genetics of immune responses in rheumatoid arthritis

A. Ruysen-Witrand<sup>1,2,3</sup>, A. Constantin<sup>1,2,3</sup>, A. Cambon-Thomsen<sup>1,2</sup> & M. Thomsen<sup>1,2</sup>

1 INSERM, UMR1027, Toulouse, France

2 University of Toulouse III - Paul Sabatier, UMR1027, Toulouse, France

3 CHU Toulouse Purpan, Rheumatology Center, Toulouse, France

### Key words

autoantibodies; citrullination; genetics; immune response; rheumatoid arthritis; single nucleotide polymorphisms

### Correspondence

Mogens Thomsen,  
Faculty of Medicine,  
INSERM, UMR 1027,  
Toulouse, France  
Tel: +335 6114 5621  
Fax: +335 6114 5623  
e-mail: thomsen@cict.fr

doi: 10.1111/j.1399-0039.2012.01939.x

### Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is a common autoimmune disease with a strong genetic component. Numerous aberrant immune responses have been described during the evolution of the disease. In later years, the appearance of anti-citrullinated protein antibodies (ACPAs) has become a hallmark for the diagnosis and prognosis of RA. The post-translational transformation of arginine residues of proteins and peptides into citrulline (citrullination) is a natural process in the body, but for unknown reasons autoreactivity towards citrullinated residues may develop in disposed individuals. ACPAs are often found years before clinical manifestations. ACPAs are present in about 70% of RA patients and constitute an important disease marker, distinguishing patient groups with different prognoses and different responses to various treatments. Inside the human leukocyte antigen (HLA) region, some *HLA-DRB1* alleles are strongly associated with their production. Genome-wide association studies in large patient cohorts have defined a great number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) outside of the HLA region that are associated with ACPA positive (ACPA+) RA. The SNPs are generally located close to or within genes involved in the immune response or signal transduction in immune cells. Some environmental factors such as tobacco smoking are also positively correlated with ACPA production. In this review, we will describe the genes and loci associated with ACPA+ RA or ACPA- RA and attempt to clarify their potential role in the development of the disease.

### Introduction

Autoimmune diseases are phenotypically heterogeneous. Some are organ specific such as type-1 diabetes, myasthenia gravis and Graves' disease, and others are systemic such as systemic lupus erythematosus (SLE), Sjögren's disease or rheumatoid arthritis (RA). They are all multifactorial diseases, with a complex interplay between genes and environment. The principal susceptibility genes are located in the major histocompatibility complex, or the human leukocyte antigen (HLA) region in humans. In RA patients, the susceptibility is primarily associated with certain *HLA-DRB1* alleles (1). Most recently, associations with *HLA-B* and *HLA-DP* have been demonstrated when combining six large independent genome-wide datasets (2). Genome-wide association studies (GWAS) using single nucleotide polymorphisms (SNPs) have indicated that in addition to genes in the HLA region, a multitude of other genes may be involved in disease susceptibility, in particular genes encoding immune regulatory

factors (3). Among environmental factors, tobacco smoking has been shown to be associated with RA (4).

Rheumatoid arthritis is the most common chronic inflammatory arthritis affecting 0.5–1% of adults in developed countries (5). Three times more women than men are affected and the mean age-of-onset is about 50 years (6). The presence of anti-citrullinated protein antibodies (ACPAs) has become an important diagnostic and prognostic criterion for RA, and it has been suggested that ACPA positivity or negativity may define different disease entities (7, 8). In order to take into account the importance of ACPAs for the diagnosis of RA, new classification criteria for RA were established in 2010 (9). In this review, the possible role of candidate genes for the development of ACPA positive (ACPA+) RA will be discussed. The overview represents an update of a review in French published previously by one of us (10), extended to take into account recent GWAS data and to integrate the present knowledge on genes involved.

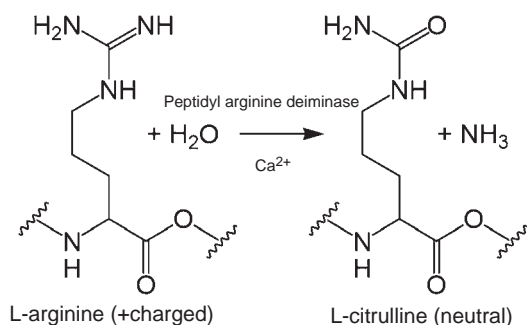
## Pathophysiology

### Targets of autoantibodies

The presence of autoantibodies, in particular rheumatoid factor (RF) and ACPA, is a well-established indicator of RA disease severity. The antibodies may precede the onset of the disease by many years (11–13). RF is a classical pathogenic marker consisting of IgM and IgA antibodies directed against the Fc fragment of IgG. ACPAs seem to be more specific and sensitive for diagnosis of RA and are also better predictors of poor prognostic features such as progressive joint destruction. Although ACPAs have a good specificity for RA diagnosis, about 95%, the sensitivity is somewhat lower, 67% (14). The corresponding figures for RF are 85% and 69%, respectively. Clinical studies show that RA patients with both RF and ACPAs differ from the so-called autoantibody negative patients in term of disease activity, structural severity and response to various treatments (12, 15).

### Citrullination

Citrullination of proteins is a post-transcriptional modification featuring the conversion of a positively charged arginine residue into the neutral citrulline (Figure 1). This conversion may alter the three-dimensional structure of proteins and also generate neo-epitopes on peptides presented by HLA molecules. Citrullination of proteins is a constitutive phenomenon in many tissues, in particular observed in the normal epidermis. It is caused by the enzyme peptidyl-arginine deiminase (PAD) with five isoforms expressed differently in various tissues (16). Citrullination may also be induced under inflammatory conditions in the synovium of patients with RA or in the upper airways of smokers (17). Among the proteins in the joint that undergo citrullination are fibrin, vimentin, fibronectin and alpha-enolase (18). Studies in experimental animals show that citrullinated peptides are generated constitutively in dendritic cells and macrophages, and in B cells after



**Figure 1** Post-translational conversion of the charged arginine residue to the uncharged citrulline residue. The conversion is facilitated by the enzyme peptidyl arginine deiminase which is present in many cells and tissues in the body. The conversion is enhanced in lung tissues of smokers (17).

engagement of the antigen receptor (19). Citrullinated peptides are believed to fit well into HLA-DR molecules because charged arginine residues are replaced by neutral citrulline residues creating a favorable binding energy. In disposed individuals a loss of immune tolerance to citrullinated proteins and peptides may develop because T cells in the periphery are confronted with peptide-HLA complexes against which they have not been tolerized in the thymus. T cells from ACPA+ RA patients recognize citrullinated vimentin peptides *in vitro* restricted by HLA-DR4 and similar findings have been made in *HLA-DR4* transgenic mice (20). It has been shown that peripheral B lymphocytes from a majority of RA patients are able to produce ACPA after non-specific stimulation *in vitro* (21). The production of antibodies was mainly detected in cultures from patients with *HLA-DR* alleles associated with RA. Interestingly, B cells from about one third of normal subjects carrying these *HLA-DR* alleles, but without family history of RA, also produced ACPA antibodies *in vitro*.

### Dysregulation of the Immune response

The presence of autoantibodies years before clinical manifestations points towards an important role of the adaptive immune system in the early pathogenesis of RA, at least in the ACPA+ patients (22). T cells are found abundantly in inflamed joints and autoreactive T cells have been identified within the joints (23). RA is traditionally considered to be mediated by type 1 helper T cells, but the role of so-called type 17 helper T cells is increasingly evoked (24). A great number of cytokines are produced by such cells and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) together with interleukin (IL)-17A provoke activation of synoviocytes and chondrocytes (25). Humoral adaptive immunity is central in RA (26). Synovial B lymphocytes are localized in aggregates together with T cells and in some tissues can be found ectopic follicles. The efficacy of clinical treatment with antibodies towards CD20 suggests that the role of B lymphocytes is not limited to the production of autoantibodies but also includes production of certain cytokines (27). A great number of innate effector cells are found in the synovial membrane and/or synovial fluid, and macrophages are important as they release a multitude of inflammatory cytokines (28). ACPAs have been shown to enhance nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B) activity and TNF- $\alpha$  production in monocytes and macrophages by binding citrullinated GRp78, expressed on the surface of these cells (29). Neutrophils and mast cells also contribute to the synovitis by production of proteases and other inflammatory intermediates (30, 31). Many cytokines contribute to the disease process and TNF- $\alpha$  plays an important role as mentioned above. Other important cytokines are IL-6 and the IL-1 cytokine family (32) and much research has been dedicated to unraveling the intracellular signaling pathways that regulate cytokine production (33, 34). The synoviocytes also participate in the disease process as they develop a phenotype that contributes to local

cartilage destruction and sustains T- and B-cell survival (35, 36). Figure 3 shows schematically the initiation of the immune response in RA and the inflammatory phase of the disease.

### Genetic factors associated with ACPA+ RA

Most of the factors described below and in Table 1 have been defined in GWAS. A meta-analysis of results from independent GWAS has permitted to accumulate very large materials. Stahl and colleagues from Europe and North America have for instance first done a meta-analysis on 5839 autoantibody positive RA patients and 20,169 controls followed by replication in an independent set of 6768 patients and 8806 controls, all of European descent (37). Because of the large number of comparisons made, an association is only considered significant when  $P$  is less than  $5 \times 10^{-8}$ . When the SNPs at risk are not located within a gene, the so-called GRAIL analysis has been performed to assign the most probable candidate gene(s) in linkage disequilibrium with the SNP (38). Kurreeman *et al.* have recently used electronic health records to track RA patients and obtain biospecimens for SNP analysis and antibody testing (39). In order to ensure European ancestry, a great number of ancestry informative markers were used. This also permitted to define patients and controls of other ethnic origins (e.g. Asians, Africans and Hispanics). A number of those results are also reported in Table 1.

### HLA genes

The association between HLA and RA was reported by several groups in the mid-1970s. A rather weak association with HLA-B was first reported, and when cellular and serological methods for defining HLA class II antigens became available, the association with *HLA-DR4* was found to be stronger (40, 41). The possible associations with HLA-B were then considered to be due to linkage disequilibrium between *HLA-B* and *HLA-DR* alleles. The development of molecular biology methods revealed that a number of *HLA-DRB1* alleles were associated with the disease and it was then proposed that a shared epitope (SE) of the DR $\beta$ 1 chain (amino acid residues 70–74) was the main factor causing the association between *HLA-DRB1* and RA (1). These residues are located on the  $\alpha$ -helix of the DR $\beta$ 1 chain. In a very recent analysis (GWAS) on a large combined material of European origin, amino acid polymorphisms were tested across the HLA class I and II molecules (2). As shown in Table 1, four amino acid positions of HLA-DR $\beta$  were important for the susceptibility to ACPA+ RA, namely positions 11, 13, 71 and 74. The latter two are part of the so-called shared epitope on the  $\alpha$ -helix (1) while the two others are located in the floor of the peptide binding groove, as shown in Figure 2. All four amino acids have side-chains pointing into the groove and are thus important for the peptide binding properties of the HLA molecule. On the basis of the polymorphisms of amino acids in these four

positions, the *DRB1* alleles can be classified according to their association with ACPA+ RA. *DRB1\*04:01* is the most strongly associated, with an odds ratio of 4.44 in Europeans. The same authors showed an independent association for *HLA-B\*08* that encodes an asparagine in position 9 and for a group of *HLA-DP1* alleles that encode a phenylalanine in position 9 on the  $\beta$ -chain. For both molecules, position 9 is located in the floor of the peptide-binding groove. A recent study in ethnically mixed RA patients and controls suggested that position 67 on the DR $\beta$ 1 chain was also associated with the disease (42). It could be shown that this position is important for the binding of a citrullinated vimentin peptide, a likely auto-antigen in RA. In non-European populations, additional *HLA-DR* alleles may be associated. A recent study in Japanese showed no HLA association for ACPA– RA, and the strongest association for ACPA+ RA was observed for *DRB1\*04:05* (43). Interestingly, the data also suggest significant and independent associations with HLA loci other than *HLA-DRB1* (*HLA-DP*, *HLA-B* and *HLA-C*).

### Non-HLA genes

The genes below are listed according to their position on chromosomes.

#### *PTPN22* (*1p13*)

The *PTPN22* gene encodes a tyrosine phosphatase (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22), also called LYP. It negatively regulates activation of T and B cells via the T cell antigen receptor (TCR) and B cell antigen receptor (BCR). One SNP (rs2476601), characterized by a C/T mutation in position 1858, gives rise to the substitution of an arginine (R) by a tryptophan (W) in position 620 of the protein, in the binding domain of LYP. The 620W variant, encoded by allele *1858T*, seems to be associated with a gain in catalytic function of LYP, resulting in a reinforcement of the negative regulation of activation of T and B cells. This may result in a reduced negative selection of autoreactive T and/or B precursors as well as in a reduced activity of regulatory T cells, thus promoting autoimmunity. Several independent studies have reported an association between carriage of allele *1858T* and susceptibility to ACPA+ RA (44). During the preclinical phase of RA, carriage of allele *1858T* is significantly associated with positivity of ACPAs (45). This allele is not found in Asian populations (46), but a polymorphism in the promoter region seems to be associated with RA in Chinese (47). A recent GWAS showed an association of another SNP located in the *PTPN22* gene, rs6679677, in a European sample (48). A weaker association was found with ACPA– RA.

#### *CD2*, *CD58* (*1p13.1*)

CD2 is a cell adhesion molecule with costimulatory properties. It is present on the surface of peripheral T cells and some

**Table 1** Genes and proteins associated with anti-citrullinated peptide antibody (ACPA) positive RA

Gene (localization)	Protein and its function	SNP or allele	Odds ratio	95% confidence interval	Reference(s)
<i>HLA-DRB1</i> (6p21.3)	The polymorphic HLA-DRβ1 chain presents together with the non-polymorphic α-chain antigenic peptides to CD4+ T cells Amino acids at position 11, 13, 71 and 74 determine the susceptibility to ACPA+ RA	<i>HLA-DRB1*04:01</i>	4.44	4.02–4.91	(2)
		<i>HLA-DRB1*04:04, *04:05, *04:08, *10:01</i>	4.22	3.75–4.75	(2)
		<i>HLA-DRB1*01:01, *01:02</i>	2.17	1.94–2.42	(2)
		<i>HLA-DRB1*16:01</i>	2.04	1.59–2.62	(2)
		<i>HLA-DRB1*04:03, *04:07</i>	1.65	1.24–2.19	(2)
		<i>HLA-DRB1*09:01</i>	1.65	1.29–2.10	(2)
		<i>HLA-DRB1*04:02</i>	1.43	1.04–1.96	(2)
<i>HLA-B</i> (6p21.3)	HLA class I molecules present antigenic peptides to CD8+ T cells	<i>HLA-B*08</i>	2.12	1.89–2.38	(2)
<i>HLA-DPB1</i> (6p21.3)	The polymorphic HLA-DPβ1 chain presents together with the non-polymorphic α-chain antigenic peptides to CD4+ T cells	Several alleles with Phe in position 9	1.40	1.31–1.50	(2)
<i>PTPN22</i> (1p13)	Protein-tyrosine phosphatase (LYP) is a lymphocyte-specific intracellular phosphatase involved in regulation of lymphocyte activation	rs2476601	1.94	1.81–2.08	(37)
		rs6679677	2.06	1.68–2.53	(48)
<i>CD2, CD58</i> (1p13)	CD2 is a surface antigen expressed on T cells and NK cells CD58 is the ligand of CD2	rs11586238	1.13	1.07–1.19	(37)
<i>TNFRSF14</i> (1p36)	TNFRSF14 is a member of TNF receptor superfamily mediating signals induced by TNF receptor associated factors (TRAF)	rs3890745	1.12	1.06–1.18	(37)
<i>PADI4</i> (1p36.13)	PAD is isoform 4 of a family of 5 enzymes responsible for the conversion of arginine residues to citrulline residues	Association in Asians but not in Europeans, see text			(46, 50, 51)
<i>FCGR</i> (1q21-23)	FcγR are receptor proteins for the Fc part of IgG, involved in the process of phagocytosis and clearing of immune complexes	FCGR2B rs1050501	1.35	1.09–1.66	(52)
			(Taiwanese)		
		FCGR3A rs393991 FCGR2A rs12746613	1.3 1.13	1.01–1.55 1.06–1.21	(53) (49)
<i>LCE3C_LCE3B-del</i> (1q21.3)	Late cornified envelope genes located in the epidermal differentiation complex	Homozygous deletion of gene associated with rs4112788	1.51	1.09–2.13	(55)
<i>PTPRC</i> (1q31.3)	PTPRC is member of the protein tyrosine phosphatase (PTP) family, CD45	rs10919563	1.14	1.06–1.22	(37)
<i>REL</i> (2p13)	c-Rel is member of NF-κB family important for Th1 immune responses	rs13031237	1.13	1.07–1.18	(37)
<i>SPRED2</i> (2p14)	SPRED2 regulates activation of CD45+ hematopoietic cells via the Ras-MAP kinase pathway	rs934734	1.13	1.06–1.21	(37)
<i>AFF3</i> (2q11)	AFF3 is a tissue restricted nuclear transcriptional activator preferentially expressed in lymphoid tissue.	rs11676922	1.12	1.07–1.17	(37)
<i>STAT4</i> (2q32)	STAT4 is member of the STAT family of transcription factors	rs7574865	1.16	1.10–1.23	(37)
<i>CD28</i> (2q33)	CD28 is a surface protein essential for T-cell proliferation and survival	rs1980422	1.12	1.06–1.18	(37)
<i>CTLA4</i> (2q33)	CTLA-4 is a surface protein on T cells which transmits an inhibitory signal	rs3087243	1.15	1.10–1.20	(37)
<i>PXK</i> (3p14)	PXK modulates Na,K-ATPase enzymatic and ion pump activities	rs13315591	1.13	1.04–1.23	(37)
<i>RBPJ</i> (4p15)	RBPJ is a transcriptional regulator important in the Notch signaling pathway	rs874040	1.18	1.12–1.24	(37)
<i>IL2, IL21</i> (4q27)	IL-2 and IL-21 are cytokines important for cellular immune responses	rs6822844	1.11	1.05–1.19	(37)

**Table 1** Continued

Gene (localization)	Protein and its function	SNP or allele	Odds ratio	95% confidence interval	Reference(s)
<i>ANKRD55</i> , <i>IL6ST</i> (5q11)	The function of ANKRD55 is unknown IL-6ST is a signal transducer shared by cytokines as IL-6	rs10040327 rs6859219	1.28 1.18	1.05–1.57 1.08–1.28	(44) (37)
<i>ADRB2</i> (5q32-q34)	ADRB2 is a Beta-2-adrenergic receptor	Arg16	4.43	2.81–7.02	(61)
<i>AIF1</i> (6p21.3)	AIF-1 is a cytoplasmic inflammation responsive protein expressed in joints from RA patients	rs2269475 rs2259571	8.8 2.30	2.1–37.7 1.25–4.25	(62) (63)
<i>PRDM1</i> (6q21)	PRDM1 acts as a repressor of beta-interferon gene expression	rs548234	1.10	1.05–1.16	(37)
<i>TNFAIP3</i> (6q23)	The TNFAIP3 protein inhibits NF-kappa B activation as well as TNF-mediated apoptosis	rs10499194 rs6920220 rs5029937 rs394581	1.10 1.22 1.40 1.10	1.04–1.15 1.16–1.29 1.24–1.58 1.04–1.15	(37) (37) (37) (37)
<i>TAGAP</i> (6q25)	TAGAP has a function as a Rho GTPase-activating protein	rs394581	1.10	1.04–1.15	(37)
<i>CCR6</i> (6q27)	CCR6 is member of the beta chemokine receptor family expressed by immature dendritic cells and memory T cells	rs3093023	1.11	1.06–1.16	(37)
<i>IRF5</i> (7q32)	IRF5 is member of the interferon regulatory factor (IRF) family, a group of transcription factors with diverse roles	rs10488631	1.25	1.14–1.37	(37)
<i>BLK</i> (8p23)	BLK is nonreceptor tyrosine-kinase of the src family of proto-oncogenes	rs13277113 rs2736340	1.15 1.12	1.00–1.33 1.07–1.18	(44) (37)
<i>CCL21</i> (9p13)	CCL21 is a chemokine that inhibits hemotopoiesis and stimulates chemotaxis,	rs2812378	1.10	1.05–1.16	(37)
<i>TRAF1/C5</i> (9q33-34.1)	The TRAF1 protein associates with and mediates the signal transduction from various receptors of the TNFR superfamily C5 is the fifth component of complement	rs3761847 rs2900180 rs10118357	1.13 1.28 1.19	1.08–1.18 1.13–1.44 1.05–1.34	(37) (65) (48)
<i>IL2RA</i> (10p15)	The IL-2 receptor alpha chain is part of the IL-2 receptor	rs706778	1.11	1.06–1.17	(37)
<i>PRKCK</i> (10p15)	Protein kinase C theta is one of the PKC family members	rs4750316	1.15	1.09–1.22	(37)
<i>RAG1, TRAF6</i> (11p12)	RAG1 is Involved in activation of immunoglobulin V-D-J recombination TRAF6 is member of the TNF receptor associated factor protein family	rs540386	1.16	$P = 6.1E-04$	(49)
<i>IKZF3</i> (17q12)	IKZF3 (IKAROS family zinc finger 3) participates in regulation and proliferation of B cells	rs2872507	1.10	$P = 1.7E-09$	(39)
<i>CD40</i> (20q13)	CD40 is member of the TNF-receptor superfamily, essential in mediating a broad variety of immune and inflammatory responses	rs4810485	1.23	1.11–1.37	(69)

The genes are sorted according to their chromosomal localization, except HLA genes that are on the top. Most of the data are derived from genome-wide association studies (GWAS) on large materials and concern patients and controls of European ancestry, except where indicated. As detailed in the text, most of the genes are involved in T-cell activation, either coding for surface molecules on immune cells, cytokines or proteins participating in signal transduction in immune cells.

natural killer (NK) cells. The ligand is CD58, a member of the immunoglobulin superfamily, carried by antigen presenting cells. The ligation of CD2 and CD58 causes activation of T lymphocytes and NK cells. The SNP rs11586238 is about 50 kb upstream of the *CD2* gene and also close to other important genes as *CD58* and *IGSF* (49).

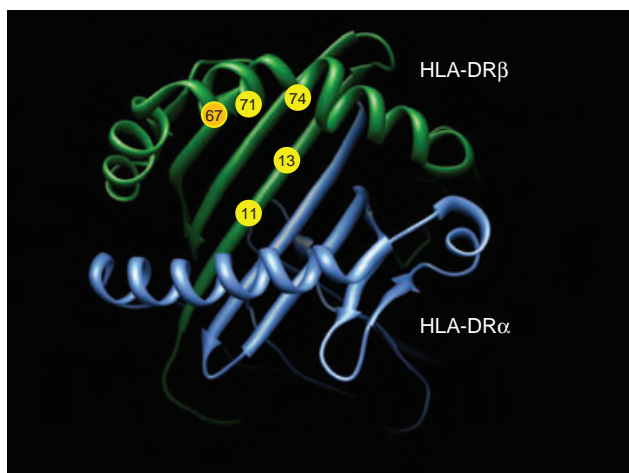
#### ***TNFRSF14* (1p36)**

The protein TNFSF14 is member 14 of the TNF receptor superfamily. The cytoplasmic region of this receptor binds to several TRAF (TNF receptor associated factors) family

members, which may mediate signal transduction pathways that activate the immune response. The SNP rs3890745 is close to the *TNFRSF14* gene but is actually located in an intron of the *MMEL1* gene, which codes for a neutral endopeptidase. However, no polymorphism of this gene is suspected to be associated with RA and the GRAIL analysis pointed to *TNFRSF14* as the causative gene (39).

#### **Peptidyl arginine deiminase, type 4 (*PADI4*) (1p36.13)**

PADI4 is member of a family of five calcium-dependent enzymes that are expressed in various tissues, responsible for



**Figure 2** Ribbon model of HLA-DR. The model has been elaborated based on the 3L6F entry in the Protein Data Bank. The peptide binding groove is shown and the four residues on the DR $\beta$  chain that were associated with ACPA+ RA in a large genome-wide association studies (GWAS) are highlighted (2). Another study in a mixed population suggested that also residue 67 is important, and this residue has been shown to interact with the binding of citrullinated vimentin peptide (42). The UCSF Chimera program was used to create the figure (85).

transformation of arginine residues into citrulline. PADI4 is found in the cytoplasm of monocytes, T and B cells, polynuclear neutrophils and eosinophils, as well as in NK cells. The PADI4 enzyme may translocate into the nucleus of activated cells and it plays a physiological role in regulating the transcriptional activity of numerous genes by counterbalancing the methylation of arginine residues of histones. A number of SNPs have been defined that characterize *PADI4* haplotypes influencing ACPA positivity in RA populations of Asian origin (46, 50). However, a meta-analysis of all European studies failed to show an association between *PADI4* haplotypes and RA (51).

#### ***FCGR* (Fc fragment of IgG receptor) (*1q21-23*)**

Receptors for the Fc fragment of IgG (Fc $\gamma$ R) play an important role in the immune response. In humans, eight *FCGR* genes are assembled in the *1q21-23* region. Fc $\gamma$ RIIb (CD32B) is generally considered to regulate negatively the activity of B cells. One non-synonymous SNP (rs1050501) in the *FCGR2B* gene causes the substitution of an isoleucine with a threonine in the transmembrane segment (187 Ile/Thr) of Fc $\gamma$ RIIb, affecting its immunoregulatory functions. A study carried out in Taiwanese patients with RA showed an overrepresentation of variant 187-Ile in the ACPA+ RA patient group, in comparison with controls (52). Fc $\gamma$ RIIIa (CD16) is generally considered to regulate positively the activity of monocytes/macrophages. One non-synonymous SNP (rs396991) in the gene *FCGR3A* causes the substitution of a valine with a phenylalanine in position 158 (158 V/F) of Fc $\gamma$ RIIIa, affecting

its immunoregulatory functions. A study carried out in Dutch patients with RA revealed an association between genotype VV and susceptibility to ACPA+ RA but not ACPA – RA (53). This study was confirmed by a British group that also performed a meta-analysis showing an association between VV genotype and ACPA+ RA (54). Another meta-analysis showed an association between one SNP (rs12746613) located on *1q23.3* near *FCGR2A* genes and RA (49).

#### **Deletion of the late cornified envelope gene (*LCE3C\_LCE3B del*) (*1q21.3*)**

The epidermal differentiation complex contains several genes that are expressed in different types of epithelia such as skin, intestine and lung. An association was observed between patients homozygous for the deletion of the above-mentioned gene and ACPA+ RA in two cohorts of RA (55). The same deletion is associated with psoriasis.

#### **Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C (*PTPRC*) (*1q31.3*)**

This enzyme is member of the protein tyrosine phosphatase (PTP) family, essential regulator of T- and B-cell antigen receptor signaling; it suppresses JAK kinases, and thus functions as a regulator of cytokine receptor signaling. The SNP that has been shown to be associated with RA (rs10919563) is located within a *PTPRC* intron, 35 kb away from a rare non-synonymous SNP that alters *PTPRC* splicing (49).

#### ***REL* (*2p13*)**

The protein c-Rel is a transcription factor that is a member of the Rel/NF $\kappa$ B family. The 'Rel domain', is responsible for DNA binding, dimerization, nuclear localization and binding to the NF $\kappa$ B inhibitor. C-Rel controls multiple steps in the development of regulatory T cells (56).

#### ***SPRED2* (*2p14*)**

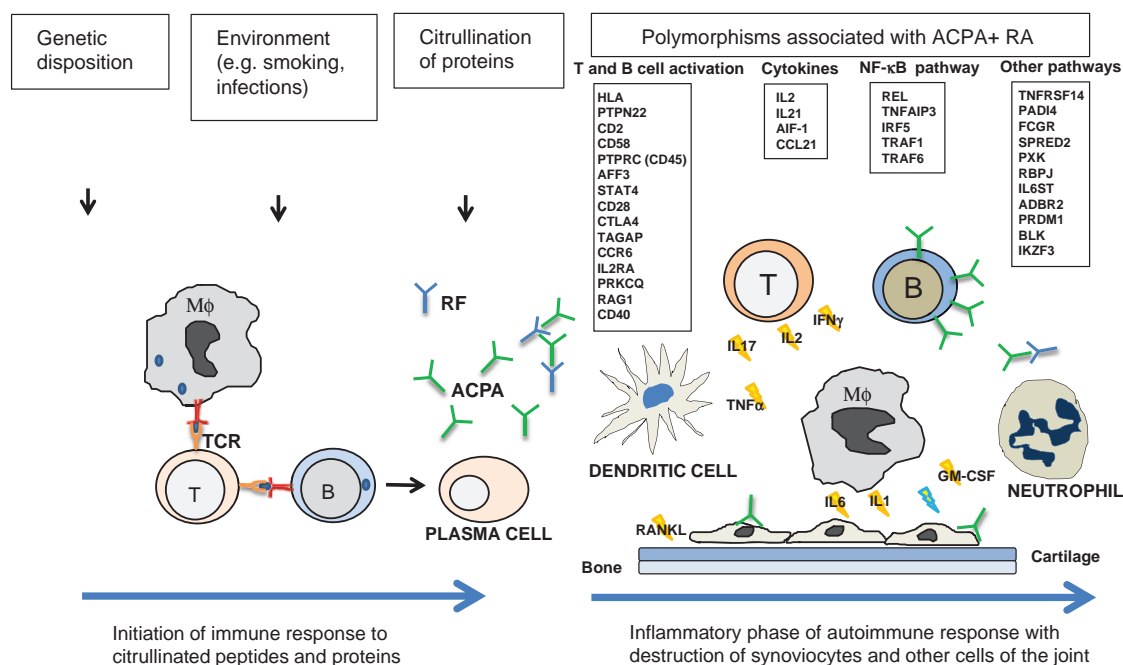
The Sprouty-related EVH1 domain containing protein regulates growth factor induced activation of the MAP kinase pathway in CD45+ hematopoietic cells (37).

#### ***AFF3* (*2q11*)**

AFF3 is an RNA binding protein. It is a tissue restricted nuclear transcriptional activator preferentially expressed in lymphoid tissue (57).

#### ***STAT4* (*2q32*)**

STAT4 is member of the STAT family of transcription factors that are essential for mediating responses to IL-12 in lymphocytes, and regulating the differentiation of T helper cells (58).



**Figure 3** Schematic representation of initiation of the auto-immune response in RA and the inflammatory phase. The citrullination of peptides and proteins is an essential step in the initiation of the autoimmune response. A large number of the genes associated with RA code for surface molecules important for T- and B-cell activation, as for example HLA, CD22, CD28, CD40, CD45, CD58, CTLA-4. Other genes code for cytokines or for factors involved in various pathways, as indicated in the boxes. See also Table 1 and the text. After the initiation of an immune response towards citrullinated peptides and proteins, a clinical disease usually develops, with inflammatory responses towards the cells of the joints. Activated macrophages, neutrophils and cytokines are important actors in the destructive process. RANKL (receptor activator of NF-κB ligand) has not been found to display a polymorphism associated with RA, but is important for the destruction of bone tissue via activation of osteoclasts.

### *CD28 (2q33)*

CD28 is a co-stimulatory molecule required for T-cell activation. Its ligands are CD80 and CD86 molecules on antigen presenting cells (49).

### *CTLA4 (2q33)*

The CTLA-4 molecule belongs to an immunoglobulin superfamily expressed by activated T cells. CTLA-4 binds to CD80/CD86 molecules expressed by antigen-presenting cells. It negatively regulates activation of T cells by preventing the co-stimulatory CD28 molecules from binding to CD80/86 molecules (8). A study involving Dutch RA patients, together with a meta-analysis of published studies concluded that there was an association between a SNP (rs3087243) of gene *CTLA4* and susceptibility to RA in ACPA+ Caucasoid patients, but not in ACPA- patients (59). A recent meta-analysis in populations of European descent confirmed the association (48).

### *PX domain containing serine/threonine kinase (PXX) (3p14)*

Phlox homology (PX) domains bind to phosphoinositides and PXX is a serine/threonine kinase. It modulates Na-K ATPase

enzymatic and ion pump activities. A SNP located in *PXX* gene (rs13315591) is associated with ACPA+ RA (48).

### *Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region (RBPJ) (4p15)*

RBPJ is a transcriptional regulator important in the Notch signaling pathway that can bind specifically to the recombination signal sequence of immunoglobulin kappa type J segments. A significant association between a SNP located in *RBPJ* gene (rs874040) and ACPA+ RA was identified (48).

### *IL2, IL21 (4q27)*

The IL-2 cytokine plays an important role for T-cell homeostasis and survival. IL-21 has a central role for antibody mediated immune responses. It acts on NK cells, CD4+ T and B lymphocytes to induce antibody production and mediate class switching. It also induces Th17 differentiation and Th17 T cells are mediators of inflammation (60).

### *Ankyrin repeat domain 55; IL-6 signal transducer (ANKRD55, IL6ST) (5q11)*

The function of the *ANKRD55* gene is unknown. IL6ST is a signal transducer shared by many cytokines, including



IL-6. A significant association is present between a SNP (rs6859219) located near *IL6ST* gene and RA susceptibility (37). A significant association between a SNP located in *ANKRD55* gene (rs10040327) near *IL6ST* gene and ACPA+ RA was identified (48).

#### **Beta-2-adrenergic receptor (*ADRB2*) (5q32-q34)**

The *ADRB2* gene encodes the  $\beta$ 2 adrenergic receptor. The lymphocytes of patients with RA are characterized in particular by a lesser expression of  $\beta$ 2 adrenergic receptors, correlated negatively to the activity of the disease. In German RA patients, a polymorphism causing a non-synonymous mutation of codon 16 (Gly16Arg), characterized by the substitution of a glycine with an arginine, was found to be associated with susceptibility to the disease as well as with a positivity of ACPAs (ACPA+ in 93% of homozygotes for the allele encoding arginine compared with 75% of homozygotes for the allele encoding glycine) (61).

#### **Allograft inflammatory factor 1 (*AIF1*) (6p21.3)**

The AIF-1 is a protein which plays a role in certain inflammatory and autoimmune processes. It is notably overexpressed by mononuclear cells and fibroblast-like synoviocytes in the joints of RA patients. The *AIF1* gene is located in the *MHC class III* region. One study looked for an association between a non-synonymous (Arg15Trp) SNP (rs2269475), located in intron 3 of isoform 2 of AIF-1 and RA in Polish patients. The T allele of this polymorphism proved to be associated with susceptibility to ACPA+ RA (62). The same group suggested recently that the SNP rs2259571 was associated with an active form of RA but not with ACPA positivity (63).

#### **PR domain containing 1 (*PRDM1*) (6q21)**

The protein acts as a repressor of beta-interferon gene expression. It binds specifically to a regulatory element of the IFN beta gene promoter. A positive association was observed between rs548234 near *PRDM1* and ACPA+ RA (49).

#### **TNFAIP3 (6q23)**

Genome-wide studies have identified genetic markers associated with susceptibility to RA in region 6q23 (64). Two SNPs (rs6920220 and rs10499194) were correlated to the status of the ACPAs (65). The markers are close to the gene encoding tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3). TNFAIP3 is a negative regulator of NF- $\kappa$ B and is involved in inhibiting TNF-receptor-mediated signaling effects.

#### **T-cell activation RhoGTPase activating protein (*TAGAP*) (6q25)**

The protein activates Rho-GTPase during T-cell activation. A significant association has been found between

a SNP located in *TAGAP* gene (rs394581) and ACPA+ RA (48, 49).

#### **Chemokine (C-C motif) receptor 6 (*CCR6*) (6q27)**

CCR6 is a member of the beta chemokine receptor family expressed by immature dendritic cells and memory T cells. It is important for B-lineage maturation and antigen-driven B-cell differentiation, and it may regulate the migration and recruitment of dendritic cells and T cells during inflammatory and immunological responses. GWAS identified a significant association between a SNP (rs3093023) located in *CCR6* gene and RA susceptibility (37, 48).

#### **Interferon regulatory factor 5 (*IRF5*) (7q32)**

IRF5 belongs to a family of transcriptional factors that regulate, in particular, the system of type I interferons. As a ligand of several toll-like receptors (TLRs 4, 5, 7/8 and 9), IRF5 plays a central role in both innate and adaptive immunity, by activating, through NF- $\kappa$ B, transcription of the genes of numerous pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-12p40. After an initial negative study published in 2006 (66), a second case-control study looked for an association between various SNPs located in gene *IRF5* and susceptibility to RA, in patients from Swedish (1530 cases and 861 controls) and Dutch (387 cases and 181 controls) cohorts. This study revealed the promoting effect of a haplotype called H1 (frequent alleles of four SNPs) and the protector effect of a haplotype called H2 (rare alleles of four SNPs) with regard to the risk of RA in the Swedish cohort (67). The effect was more marked in ACPA- than in ACPA+ patients. Another case-control study, supplemented by a meta-analysis of case-control studies published in 2007, confirmed the existence of an association between various SNPs of the *IRF5* gene and protection with regard to the risk of RA, notably for one SNP (rs2004640). There too, this association was more marked in ACPA- patients than in ACPA+ patients (68). A more recent GWAS found an association between the T allele of a SNP located in *IRF5* (rs10488631) and ACPA+ RA, but not with ACPA- RA in a European population sample (48).

#### **B lymphoid tyrosine kinase (*BLK*) (8p23)**

This gene encodes a non-receptor tyrosine-kinase of the src family of proto-oncogenes that are typically involved in cell proliferation and differentiation. The protein has a role in B-cell receptor signaling and B-cell development. A significant association between a SNP located in *BLK* gene (rs13277113) and ACPA+ RA has been shown (48). This association was also confirmed in a GWAS performed in a Korean population sample of 801 cases of RA with either ACPA or RF antibodies versus 757 controls (46).

**Chemokine (C-C motif) ligand 21 (CCL21) (9p13)**

CCL21 is a cytokine that inhibits hematopoiesis and stimulates chemotaxis. It is chemotactic *in vitro* for thymocytes and activated T cells, and may also play a role in mediating homing of lymphocytes to secondary lymphoid organs. The SNP rs2812378 is weakly associated with the presence of ACPA in RA patients (37, 69).

**Locus TRAF1-C5 (9q33-34.1)**

The TNF receptor associated factor 1 (TRAF1) is a protein that associates with and mediates the signal transduction from various members of the TNF Receptor superfamily. C5 (fifth component of complement) gene is located close to the TRAF1 gene. Two SNPs close to these genes, (rs3761847 and rs2900180), have been shown to be positively associated with ACPA+ RA (65). Another SNP located in TRAF1-C5 gene, rs10118357, was associated with ACPA+ RA (48).

**IL2RA (10p15)**

The IL-2 receptor alpha and beta chains, together with the common gamma chain, constitute the high-affinity IL-2 receptor. A weak association with ACPA/RF positive RA has been reported (37).

**PRKCQ (10p15)**

Protein kinase C theta is one of the PKC family members. It is a calcium-independent and phospholipid-dependent protein kinase. This kinase is important for T-cell activation. It is required for the activation of the transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1 (70).

**Recombination activating gene 1/TNF receptor-associated factor 6, E3 ubiquitin protein ligase RAG1/TRAF6 gene (11p12)**

RAG1 is involved in activation of immunoglobulin V-D-J recombination. TRAF6 is member of the TNF receptor associated factor (TRAF) protein family; it mediates signaling from members of the TNF receptor superfamily as well as the Toll/IL-1 family. A positive association was observed between the SNP rs540386 within a TRAF6 intron and RA (49).

**IKZF3 (17q12)**

IKZF3 (IKAROS family zinc finger 3) participates in regulation and proliferation of B cells. Mice lacking the gene develop an SLE-like syndrome. The SNP rs2872507 is associated with ACPA+ RA (39)

**CD40 (20q13)**

As a member of the TNF-receptor superfamily of costimulatory molecules, CD40 is essential in mediating a broad

variety of immune and inflammatory responses including T-cell-dependent immunoglobulin class switching, memory B-cell development, and germinal center formation. A significant association between a SNP located in CD40 gene (rs4810485) and ACPA+ RA has been found (48, 69).

**Genetic factors associated with ACPA– RA**

The number of genes that have been found to be significantly associated with ACPA– RA is much lower than for ACPA+ RA. This is probably due to the fact that only about 30% of RA are ACPA– and only one GWAS analysis on a rather small material (774 patients and 1079 controls) has addressed specifically associations with ACPA– RA (71). Twin studies have shown that the heritability of the two forms of RA is similar, about 66% (72). Many genes associated with ACPA– RA thus remain to be defined. It is characteristic for the polymorphism of these genes that they often are associated also with other autoimmune diseases.

**HLA genes**

The heritability contributed by HLA is relatively weak. A recent study in UK showed a weak association with HLA-DR-SE alleles in RF positive, ACPA negative RA, but no association with double negative RA (73). In Japanese, one study suggests several HLA-DR associations in ACPA– RA (74) another study found no HLA association in ACPA– RA (44). Below we will describe some of the non-HLA genes that have been identified in ACPA– RA.

**Non-HLA genes****Neuropeptide S receptor 1 (NPSRI) (7p14.3)**

The protein is expressed on various epithelial cells and is a member of the G protein-coupled receptor 1 family. Increased expression in ciliated cells of the respiratory epithelium and in bronchial smooth muscle cells is associated with asthma. Polymorphisms of the gene are associated with inflammatory bowel disease. The SNP rs324987 is associated with ACPA– RA and another SNP (rs10263447) seems to be associated with disease activity (75).

**Interferon regulatory factor 5 (IRF5) (7q32)**

IRF5 has already been described above, as it is also associated with ACPA+ RA at least for some SNPs (68). Several SNPs were associated preferentially with ACPA– RA, and IRF5 polymorphisms are also known to be associated with SLE.

**CLEC16A (16p13.1)**

This gene is expressed in immune cells and codes for a C-type lectin with unknown function. Polymorphisms of the gene are associated with other autoimmune diseases such

as type-1 diabetes, multiple sclerosis, juvenile arthritis and Addison's disease. The SNP rs6498196 is associated with ACPA- RA and not with ACPA+ RA in a Norwegian population (76).

### Combined impact of susceptibility genes, homozygosity effect and gene interactions

Although more than 35 genetic loci for RA susceptibility have now been defined, the combined heritability of the loci amounts to less than 20% (39). Apart from the HLA system, the odds ratios for association with other loci are small and only become significant in large materials. Some of the missing heritability may be explained by homozygosity of recessive susceptibility alleles (77). Another factor to take into account is possible interactions between genes. Some examples of this phenomenon are given below. A more systematic analysis of multiple gene-gene interactions for RA candidate genes have been presented as part of genetic analysis workshop 16 (78).

#### Interaction *PTPN22* (1p13)/*HLA-DRB1*

The *PTPN22* gene has already been described. A significant interaction with *HLA-DRB1*-SE+ was found in three large case-control studies (79).

#### Interaction glutathione S-transferase Mu1 deletion (*GSTM1*-null, 1p13.1)/*HLA-DRB1*

The glutathione S-transferase participates in the elimination of reactive oxygen species and other toxins. About 50% of Europeans have a homozygous deletion of the *GSTM1* gene. A significant additive interaction of *GSTM1*-null and *HLA-DRB1*-SE+ alleles for ACPA positivity has been shown in two cohorts (80).

#### Interaction 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A (*HTR2A*) (13q14-q21)/*HLA-DRB1*

Serotonin is a neurotransmitter, which however also is important for regulation of immune responses. Activation of serotonin receptors on antigen presenting cells reduces the production of TNF- $\alpha$ . A significant additive interaction between *HTR2A* TC haplotype and *HLA-DRB1*-SE+ alleles for ACPA+ RA was observed in three independent cohorts and the results were confirmed by a meta-analysis (81).

### Genes and environment

A multitude of environmental factors influence RA development. Smoking is strongly associated with ACPA+ RA, as shown in many studies and summed up in a meta-analysis (82). This may be explained by an increased citrullination of proteins in the upper airways provoked by the smoke. Another

factor is periodontitis because the pathogen *Porphyromonas gingivalis* has the capacity to citrullinate host peptides by secretion of peptidylarginine deiminase (83). Other indications on possible environmental factors may be found in a recent review on RA pathogenesis (22).

### A word of caution in interpretation of genetic associations\*

Genetic analyses generally assume that a multifactorial disease such as RA is due to numerous genetic factors with minor, independent and cumulative effects (the disease appears above a certain threshold), and to environmental influences. Calculations involving a whole range of SNPs are done under this hypothesis. This model, the so-called polygenic model, along with the concept of heritability was introduced by Fisher in 1918. In such a model, heritability of a trait measures the contribution of genetic variability to total variability of the trait, within a population. It is based on the hypothesis that genetic factors do not interact either with each other or with the environmental factors. However, for human diseases such as RA, this hypothesis is false or at least unrealistic as there obviously exist complex processes that underlie the pathophysiology, and environmental factors are still poorly described. Many GWAS interpretations neglect to recall such important aspects of the model applied. We have shown that, in addition, there is a huge gap between the detection of a significant OR and the identification of the genetic variations actually involved in the RA pathological process. Given the limited advances into understanding the mechanisms underlying the HLA associations observed over 35 years, testing hypotheses like the role of specific amino-acid positions for peptide binding as described above is important. In RA as in other multifactorial diseases, GWAS have revealed low-intensity signals (low odds ratio for the associated SNPs) thanks to impressive size of patient samples used. Such numbers imply also that little selection was carried out during sampling in terms of clinical and environmental homogeneity. As a consequence, it is very likely that the etiological heterogeneity is very high in these samples.

Attempting to measure 'missing heritability' is actually misleading as there is no way of measuring either the importance or the nature of the missing information. A risk may be completely changed by just one new piece of environmental information. A strong heritability does not imply that environment only plays a minor role in the physiopathology of a disease. To illustrate this, an example can be taken in a different domain: on the basis of a genome analysis, someone

\*The section is partly based on the English version of a text adopted by the French Society of Human Genetics regarding genetic risks for multifactorial diseases. The full text is available on the website of the European Society for Human Genetics (<https://www.eshg.org/fileadmin/www.eshg.org/documents/received/2010MultifactorialDiseases.pdf>).

could be declared to be at risk of developing leprosy although there is absolutely no risk if he or she is not exposed to the mycobacterium. According to those who promote the concept of missing heritability, it would reveal the 'ground remaining to be covered' for the identification of all the genetic risk factors. However this might be a wrong approach and the exploration of gene–gene and gene–environment interactions using well-characterized cohorts of patients in terms of clinical and environmental factors might be the route to go rather than multiplying large-scale GWAS.

This discussion recalls that, although GWAS and other studies are key elements in identifying new genes involved and in suggesting new relevant pathways to explore in order to understand RA, the estimated risks themselves are of poor diagnostic or prognostic value at individual level. This is especially important to underline, as a number of companies propose genetic tests directly to consumers via internet, many of the tests being based on GWAS results and using risks calculations for establishing individual susceptibilities; several of them offer tests for susceptibility to RA (84). In the light of the above discussion of the interpretation and significance of risks derived from SNP testing, caution is necessary regarding such tests as their clinical utility is not established.

## Conclusions

A large number of genes influence the development of RA. Most of the defined genes are associated with ACPA+ RA, which seems to be a disease entity different from ACPA–RA. The association with HLA-DR is strong for ACPA+ RA, where specific residues characterize HLA-DR antigens that are associated with RA, probably because citrullinated peptides fit well into the antigen-binding groove. In disposed individuals, T- and B-cell autoimmunity to citrullinated peptides and proteins develops and this is probably an important pathogenic factor. As shown in Figure 3, most of the genes associated with ACPA+ RA are involved in T-cell activation or in pathways in immune cells. Fewer genes have been identified for ACPA–RA susceptibility, and the genes are often at the same time involved in other autoimmune diseases. Further studies of the genetics of RA and the functional importance of susceptibility genes are important because they may give clues to how this invalidating autoimmune disease can be treated optimally.

## Acknowledgments

AC is supported by an interface contract between INSERM and the CHU Toulouse, and ARW is supported by the Association Midi-Pyrénées Santé, project APOGEE.

## Conflict of interest

The authors have declared no conflicting interests.

## References

1. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987; **30**: 1205–13.
2. Raychaudhuri S, Sandor C, Stahl EA *et al.* Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2012; **44**: 291–6.
3. Consortium WTCC. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007; **447**: 661–78.
4. Szodoray P, Szabo Z, Kapitany A *et al.* Anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies in association with genetic and environmental factors as indicators of disease outcome in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2010; **9**: 140–3.
5. Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002; **4** (Suppl 3): S265–72.
6. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010; **376**: 1094–108.
7. Sebbag M, Chapuy-Regaud S, Auger I *et al.* Clinical and pathophysiological significance of the autoimmune response to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2004; **71**: 493–502.
8. van der Helm-van Mil AH, Huizinga TW, de Vries RR, Toes RE. Emerging patterns of risk factor make-up enable subclassification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; **56**: 1728–35.
9. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010; **62**: 2569–81.
10. Constantin A. Régulation génétique de la production des auto-anticorps au cours de la polyarthrite rhumatoïde. *Rev Rhum Mono* 2010; **77**: 293–9.
11. van de Stadt LA, de Koning MH, van de Stadt RJ *et al.* Development of the anti-citrullinated protein antibody repertoire prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2011; **63**: 3226–33.
12. van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; **7**: R949–58.
13. Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E *et al.* Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; **48**: 2741–9.
14. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y *et al.* Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 2007; **146**: 797–808.
15. Farragher TM, Lunt M, Plant D, Bunn DK, Barton A, Symmons DP. Benefit of early treatment in inflammatory polyarthritis patients with anti-cyclic citrullinated peptide antibodies versus those without antibodies. *Arthritis Care Res* 2010; **62**: 664–75.
16. Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *BioEssays* 2003; **25**: 1106–18.

17. Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren AK *et al.* Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann Rheum Dis* 2008; **67**: 1488–92.
18. van Beers JJ, Willemze A, Stammen-Vogelzangs J, Drijfhout JW, Toes RE, Puijn GJ. Anti-citrullinated fibronectin antibodies in rheumatoid arthritis are associated with HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Arthritis Res Ther* 2012; **14**: R35.
19. Ireland JM, Unanue ER. Autophagy in antigen-presenting cells results in presentation of citrullinated peptides to CD4 T cells. *J Exp Med* 2011; **208**: 2625–32.
20. Feitsma AL, van der Voort EI, Franken KL *et al.* Identification of citrullinated vimentin peptides as T cell epitopes in HLA-DR4-positive patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010; **62**: 117–25.
21. Bellatin MF, Han M, Fallena M *et al.* Production of autoantibodies against citrullinated antigens/peptides by human B cells. *J Immunol* 2012; **188**: 3542–50.
22. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011; **365**: 2205–19.
23. Cantaert T, Brouard S, Thurlings RM *et al.* Alterations of the synovial T cell repertoire in anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; **60**: 1944–56.
24. Steinman L. Mixed results with modulation of TH-17 cells in human autoimmune diseases. *Nat Immunol* 2010; **11**: 41–4.
25. Genovese MC, Van den Bosch F, Roberson SA *et al.* LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. *Arthritis Rheum* 2010; **62**: 929–39.
26. Marston B, Palanichamy A, Anolik JH. B cells in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2010; **22**: 307–15.
27. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J *et al.* Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004; **350**: 2572–81.
28. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; **423**: 356–61.
29. Lu MC, Lai NS, Yu HC, Huang HB, Hsieh SC, Yu CL. Anti-citrullinated protein antibodies bind surface-expressed citrullinated Grp78 on monocyte/macrophages and stimulate tumor necrosis factor alpha production. *Arthritis Rheum* 2010; **62**: 1213–23.
30. Cascao R, Rosario HS, Souto-Carneiro MM, Fonseca JE. Neutrophils in rheumatoid arthritis: more than simple final effectors. *Autoimmun Rev* 2010; **9**: 531–5.
31. Hueber AJ, Asquith DL, Miller AM *et al.* Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* 2010; **184**: 3336–40.
32. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2007; **7**: 429–42.
33. Pesu M, Laurence A, Kishore N, Zwillich SH, Chan G, O'Shea JJ. Therapeutic targeting of Janus kinases. *Immunol Rev* 2008; **223**: 132–42.
34. Kremer JM, Bloom BJ, Breedveld FC *et al.* 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* 2009; **60**: 1895–905.
35. Bradfield PF, Amft N, Vernon-Wilson E *et al.* Rheumatoid fibroblast-like synoviocytes overexpress the chemokine stromal cell-derived factor 1 (CXCL12), which supports distinct patterns and rates of CD4+ and CD8+ T cell migration within synovial tissue. *Arthritis Rheum* 2003; **48**: 2472–82.
36. Filer A, Parsonage G, Smith E *et al.* Differential survival of leukocyte subsets mediated by synovial, bone marrow, and skin fibroblasts: site-specific versus activation-dependent survival of T cells and neutrophils. *Arthritis Rheum* 2006; **54**: 2096–108.
37. Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF *et al.* Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet* 2010; **42**: 508–14.
38. Raychaudhuri S, Plenge RM, Rossin EJ *et al.* Identifying relationships among genomic disease regions: predicting genes at pathogenic SNP associations and rare deletions. *PLoS Genet* 2009; **5**: e1000534.
39. Kurreeman FA, Stahl EA, Okada Y *et al.* Use of a multiethnic approach to identify rheumatoid arthritis-susceptibility Loci, 1p36 and 17q12. *Am J Hum Genet* 2012; **90**: 524–32.
40. Stastny P, Fink CW. HLA-Dw4 in adult and juvenile rheumatoid arthritis. *Transplant Proc* 1977; **9**: 1863–6.
41. Thomsen M, Morling N, Snorrason E, Svejgaard A, Sorensen SF. HLA-Dw4 and rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 1979; **13**: 56–60.
42. Freed BM, Schuyler RP, Aubrey MT. Association of the HLA-DRB1 epitope LA(67, 74) with rheumatoid arthritis and citrullinated vimentin binding. *Arthritis Rheum* 2011; **63**: 3733–9.
43. Mitsunaga S, Suzuki Y, Kuwana M, *et al.* Associations between six classical HLA loci and rheumatoid arthritis: a comprehensive analysis. *Tissue Antigens* 2012; **80**: 16–25.
44. Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA *et al.* A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2004; **75**: 330–7.
45. Rantapaa-Dahlqvist S. What happens before the onset of rheumatoid arthritis? *Curr Opin Rheumatol* 2009; **21**: 272–8.
46. Freudenberg J, Lee HS, Han BG *et al.* Genome-wide association study of rheumatoid arthritis in Koreans: population-specific loci as well as overlap with European susceptibility loci. *Arthritis Rheum* 2011; **63**: 884–93.
47. Huang JJ, Qiu YR, Li HX, Sun DH, Yang J, Yang CL. A PTPN22 promoter polymorphism -1123G > C is associated with RA pathogenesis in Chinese. *Rheumatol Int* 2012; **32**: 767–71.
48. Kurreeman F, Liao K, Chibnik L *et al.* Genetic basis of autoantibody positive and negative rheumatoid arthritis risk in a multi-ethnic cohort derived from electronic health records. *Am J Hum Genet* 2011; **88**: 57–69.
49. Raychaudhuri S, Thomson BP, Remmers EF *et al.* Genetic variants at CD28, PRDM1 and CD2/CD58 are associated with rheumatoid arthritis risk. *Nat Genet* 2009; **41**: 1313–8.
50. Suzuki A, Yamada R, Chang X *et al.* Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2003; **34**: 395–402.

51. Burr ML, Naseem H, Hinks A *et al.* PADI4 genotype is not associated with rheumatoid arthritis in a large UK Caucasian population. *Ann Rheum Dis* 2010; **69**: 666–70.
52. Chen JY, Wang CM, Ma CC *et al.* A transmembrane polymorphism in FcγRIIb (FCGR2B) is associated with the production of anti-cyclic citrullinated peptide autoantibodies in Taiwanese RA. *Genes Immun* 2008; **9**: 680–8.
53. Thabet MM, Huizinga TW, Marques RB *et al.* Contribution of FcγRIIIA gene 158V/F polymorphism and copy number variation to the risk of ACPA-positive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009; **68**: 1775–80.
54. Robinson JI, Barrett JH, Taylor JC *et al.* Dissection of the FCGR3A association with RA: increased association in men and with autoantibody positive disease. *Ann Rheum Dis* 2010; **69**: 1054–7.
55. Docampo E, Rabionet R, Riveira-Munoz E *et al.* Deletion of the late cornified envelope genes, LCE3C and LCE3B, is associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010; **62**: 1246–51.
56. Gregersen PK, Amos CI, Lee AT *et al.* REL, encoding a member of the NF-κB family of transcription factors, is a newly defined risk locus for rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2009; **41**: 820–3.
57. Barton A, Eyre S, Ke X *et al.* Identification of AF4/FMR2 family, member 3 (AFF3) as a novel rheumatoid arthritis susceptibility locus and confirmation of two further pan-autoimmune susceptibility genes. *Hum Mol Genet* 2009; **18**: 2518–22.
58. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT *et al.* STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2007; **357**: 977–86.
59. Daha NA, Kurreeman FA, Marques RB *et al.* Confirmation of STAT4, IL2/IL21, and CTLA4 polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; **60**: 1255–60.
60. Zhernakova A, Alizadeh BZ, Bevova M *et al.* Novel association in chromosome 4q27 region with rheumatoid arthritis and confirmation of type 1 diabetes point to a general risk locus for autoimmune diseases. *Am J Hum Genet* 2007; **81**: 1284–8.
61. Malysheva O, Pierer M, Wagner U, Wahle M, Baerwald CG. Association between beta2 adrenergic receptor polymorphisms and rheumatoid arthritis in conjunction with human leukocyte antigen (HLA)-DRB1 shared epitope. *Ann Rheum Dis* 2008; **67**: 1759–64.
62. Pawlik A, Kurzawski M, Szczepanik T *et al.* Association of allograft inflammatory factor-1 gene polymorphism with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 2008; **72**: 171–5.
63. Pawlik A, Kurzawski M, Dziedziczko V, *et al.* Allograft inflammatory factor-1 gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012; **16**: 341–5.
64. Scherer HU, van der Linden MP, Kurreeman FA *et al.* Association of the 6q23 region with the rate of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010; **69**: 567–70.
65. Patsopoulos NA, Ioannidis JP. Susceptibility variants for rheumatoid arthritis in the TRAF1-C5 and 6q23 loci: a meta-analysis. *Ann Rheum Dis* 2010; **69**: 561–6.
66. Rueda B, Reddy MV, Gonzalez-Gay MA *et al.* Analysis of IRF5 gene functional polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; **54**: 3815–9.
67. Sigurdsson S, Padyukov L, Kurreeman FA *et al.* Association of a haplotype in the promoter region of the interferon regulatory factor 5 gene with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; **56**: 2202–10.
68. Dieguez-Gonzalez R, Calaza M, Perez-Pampin E *et al.* Association of interferon regulatory factor 5 haplotypes, similar to that found in systemic lupus erythematosus, in a large subgroup of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008; **58**: 1264–74.
69. Orozco G, Eyre S, Hinks A *et al.* Association of CD40 with rheumatoid arthritis confirmed in a large UK case–control study. *Ann Rheum Dis* 2010; **69**: 813–6.
70. Raychaudhuri S, Remmers EF, Lee AT *et al.* Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2008; **40**: 1216–23.
71. Padyukov L, Seielstad M, Ong RT *et al.* A genome-wide association study suggests contrasting associations in ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2011; **70**: 259–65.
72. van der Woude D, Houwing-Duistermaat JJ, Toes RE *et al.* Quantitative heritability of anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; **60**: 916–23.
73. Mackie SL, Taylor JC, Martin SG *et al.* A spectrum of susceptibility to rheumatoid arthritis within HLA-DRB1: stratification by autoantibody status in a large UK population. *Genes Immun* 2012; **13**: 120–8.
74. Terao C, Ohmura K, Kochi Y *et al.* A large-scale association study identified multiple HLA-DRB1 alleles associated with ACPA-negative rheumatoid arthritis in Japanese subjects. *Ann Rheum Dis* 2011; **70**: 2134–9.
75. D'Amato M, Zucchelli M, Seddighzadeh M *et al.* Analysis of neuropeptide S receptor gene (NPSR1) polymorphism in rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2010; **5**: e9315.
76. Skinningsrud B, Lie BA, Husebye ES *et al.* A CLEC16A variant confers risk for juvenile idiopathic arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide antibody negative rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010; **69**: 1471–4.
77. Yang HC, Chang LC, Liang YJ, Lin CH, Wang PL. A genome-wide homozygosity association study identifies runs of homozygosity associated with rheumatoid arthritis in the human major histocompatibility complex. *PLoS One* 2012; **7**: e34840.
78. Huang CH, Cong L, Xie J, Qiao B, Lo SH, Zheng T. Rheumatoid arthritis-associated gene-gene interaction network for rheumatoid arthritis candidate genes. *BMC Proc* 2009; **3** (Suppl 7): S75.
79. Kallberg H, Padyukov L, Plenge RM *et al.* Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2007; **80**: 867–75.
80. Mikuls TR, Gould KA, Bynote KK *et al.* Anticitrullinated protein antibody (ACPA) in rheumatoid arthritis: influence of an interaction between HLA-DRB1 shared epitope and a deletion polymorphism in glutathione S-transferase in a cross-sectional study. *Arthritis Res Ther* 2010; **12**: R213.
81. Seddighzadeh M, Korotkova M, Kallberg H *et al.* Evidence for interaction between 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A and MHC type II molecules in the development of rheumatoid arthritis. *Eur J Hum Genet* 2010; **18**: 821–6.

82. Sugiyama D, Nishimura K, Tamaki K *et al.* Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis* 2010; **69**: 70–81.
83. Wegner N, Wait R, Sroka A *et al.* Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and alpha-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010; **62**: 2662–72.
84. Ducournau P, Gourraud PA, Rial-Sebbag E, Bulle A, Cambon-Thomsen A. Direct-to-consumer genetic testing through Internet: marketing, ethical and social issues. *Med Sci* 2011; **27**: 95–102.
85. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC *et al.* UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 2004; **25**: 1605–12.

## **2. Annexe 2 : Interactions gènes-environnements**



## Mise au point sur... Polyarthrite rhumatoïde : maladie unique ou polyarthrites ?

### Interactions gènes-environnement

Dr. Adeline Ruysen-Witrand<sup>\*,1,2,3</sup>, Pr. Alain Cantagrel<sup>3,4</sup>, Pr. Arnaud Constantin<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>UMR 1027 Inserm, Toulouse

<sup>2</sup>UMR 1027 Université Paul Sabatier, Toulouse III, France

<sup>3</sup>Centre de rhumatologie, Hôpital Purpan, Toulouse, France

<sup>4</sup>JE2510, Université Paul Sabatier Toulouse III, France

#### Résumé

La polyarthrite rhumatoïde (PR) résulte de l'interaction entre des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux contribuant aux désordres immunologiques et à la réaction inflammatoire synoviale et systémique qui caractérisent la maladie. Les principaux facteurs génétiques et environnementaux connus à ce jour pour favoriser la survenue d'une PR avec anticorps anti-protéines citrullinées sont les allèles *HLA-DRB1* encodant l'épitope partagé et le tabac. Dans cet article, nous présentons les résultats des principales études ayant évalué les interactions entre les facteurs génétiques et les facteurs environnementaux associés à la susceptibilité de la PR.

#### Introduction

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est l'exemple type d'une maladie multifactorielle complexe qui résulte de l'interaction entre des facteurs génétiques, environnementaux et immunologiques.

De nombreux facteurs épidémiologiques ont été associés au risque de survenue et au phénotype de la PR : le genre, les facteurs hormonaux [1], le tabac [2], la consommation d'alcool [3], la parodontite [4] ...

À côté de ces facteurs hormonaux et environnementaux, on estime que le terrain génétique explique près de 60 % du risque de développer une PR [5].

Le principal facteur génétique connu est situé dans la région du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (HLA pour Human Leukocyte Antigen), sur le bras court du chromosome 6 et sa contribution à la susceptibilité à la PR serait de l'ordre de 30 % à 50 % [5]. Les allèles *HLA-DRB1* à risque pour la PR encodent une séquence conservée d'acides aminés en position 70-74 de la chaîne bêta 1 des molécules HLA-DR : les motifs QKRAA, QRRRA ou RRRRA qui ont été regroupés sous l'appellation d'« Epitope Partagé » (*HLA-DRB1\*SE*). L'association entre le locus *HLA-DRB1* et la susceptibilité à la PR est essentiellement observée chez les PR positives pour la recherche d'anticorps anti-protéines / anti-peptides citrullinés (ACPA +) [6].

Le locus *HLA-DRB1* n'explique qu'un tiers de l'héritabilité de la maladie et les immenses progrès des techniques moléculaires des 15 dernières années ont permis d'identifier de nombreux autres loci à risque situés sur différents chromosomes, en région codante ou non codante de gènes connus ou non pour jouer un rôle dans la réponse immunitaire et/ou inflammatoire [7]. Ainsi plus d'une trentaine de loci, validés par des études de répliation, contribuent au risque de PR et leur contribution globale à la variabilité génétique serait de l'ordre de 5 à 10 % [8]. Bien que plus de 35 loci aient été identifiés comme étant associés à la susceptibilité de la PR, l'héritabilité résultant de la combinaison de ces gènes avec le gène *HLA-DRB1* n'explique qu'environ 50 % de la susceptibilité à la PR.

\*Auteur correspondant :

Adresse e-mail : adruysen@hotmail.com

© 2013 Société Française de Rhumatologie. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés

À l'échelon individuel, si le portage d'un allèle *HLA-DRB1\*SE* confère une augmentation du risque de PR compris entre 4 et 6, le portage de 2 allèles *HLA-DRB1* confère une augmentation du risque de PR compris entre 20 et 30, alors que le portage d'un allèle à risque d'un des autres gènes associés à la susceptibilité de la PR ne confère qu'une augmentation de risque comprise entre 1 et 2, ne devenant significative que sur étude de vastes échantillons d'individus. Un des facteurs expliquant la faible héritabilité conférée par l'ensemble des gènes connus à ce jour pour être associés à la susceptibilité de la PR est la probable interaction entre les gènes (interaction gène-gène) et entre les gènes et l'environnement (interaction gène-environnement) [9].

En épidémiologie, on parle d'interaction entre un facteur A et B lorsque les risques relatifs (RR) ou Odds Ratios (OR) ne sont pas égaux selon la présence ou l'absence d'un des facteurs, c'est-à-dire si la relation entre A et la maladie n'est pas la même selon le niveau de B. Par exemple dans le cas du risque du cancer du poumon chez les mineurs exposés à l'amiante, l'OR lié à l'amiante est de 1,66 en cas de tabagisme et de 3,78 en l'absence de tabagisme. L'OR est 2 fois plus élevé chez les non-fumeurs, il y a donc interaction entre tabac et amiante.

Dans cet article nous allons nous focaliser sur les études consacrées aux interactions de type gène-environnement dans la survenue de PR et notamment de PR facteur rhumatoïde (FR) ou ACPA positives.

### Interactions gènes-tabac

Le tabac est certainement le facteur environnemental dont l'association avec la pathogénie de la PR a été la plus clairement démontrée. En effet, Silman a démontré dès 1996 sur une population de jumeaux monozygotes partageant le même patrimoine génétique que la consommation de tabac augmentait le risque de développer une PR d'un facteur 12 [2]. Le poids de ce facteur environnemental et de la génétique et notamment du portage de *HLA-DRB1\*SE* dans la susceptibilité de la PR ont conduit à tester les interactions entre ces 2 facteurs.

### Interactions *HLA-DRB1*-tabac

#### Interaction dans le risque de PR FR +

La première étude d'interaction *HLA-DRB1*-tabac dans la PR a été publiée en 2004 par une équipe

suédoise [10]. Cette étude sur 612 cas et 736 contrôles appariés sur l'âge, le sexe et le lieu de résidence, population à grande majorité caucasienne, montre une association entre la consommation de tabac et le risque de PR positive pour les facteurs rhumatoïdes (FR +) avec un OR de l'ordre de 2,2 [Intervalle de Confiance à 95 % (IC95 %) = 1,7-3,0]. L'association avec la PR FR + est renforcée en cas de portage d'un allèle *HLA-DRB1\*SE* : chez un fumeur, en cas d'absence de *HLA-DRB1\*SE*, le risque de développer une PR est multiplié par 2,4, en présence d'un allèle de *HLA-DRB1\*SE*, il est multiplié par 5,5, en présence de 2 allèles de *HLA-DRB1\*SE*, il est multiplié par 15,7 comparé à un patient non fumeur. L'interaction entre le portage d'un allèle *HLA-DRB1\*SE* et le tabac est statistiquement significative et avec un effet dose dépendant du portage des allèles *HLA-DRB1\*SE*. Cette interaction n'est en revanche pas retrouvée avec les PR FR-. L'interaction entre *HLA-DRB1\*SE* et tabac a par la suite été répliquée dans une étude portant sur des populations caucasiennes d'Amérique du Nord [11].

#### Interaction dans le risque de PR ACPA +

En 2006, Klareskog [12] a montré dans une étude cas-témoins portant sur 930 PR de la cohorte suédoise EIRA et 1126 témoins une relation entre l'exposition au tabac et le risque de développer des ACPA avec une corrélation significative entre le nombre de cigarettes consommées par jour et le titre d'ACPA. Dans son étude il existait une interaction entre le portage de *HLA-DRB1\*SE* et la consommation de tabac avec une relation dose-dépendante du nombre d'allèles *HLA-DRB1\*SE* (figure 1). Il n'existait en revanche pas d'association avec la PR ACPA- dans cette étude.

Ces travaux ont été repris par une équipe hollandaise [13] et appliqués à une population de 1305 polyarthrites indifférenciées récentes (cohorte EAC) ; les auteurs ont montré après stratification sur la présence d'ACPA ou de FR que l'interaction *HLA-DRB1\*SE*-tabac était essentiellement associée aux PR ACPA + et non aux PR FR +. De plus cette interaction était significative chez les patients ayant un diagnostic établi de PR à l'inclusion ou qui devenaient des PR après un an de suivi. En revanche, l'interaction gène-tabac n'était pas significative chez les patients ne répondant pas aux critères de PR et diagnostiqués polyarthrite indifférenciée.

Une étude danoise cas-témoin portant sur 515 PR et 769 témoins [14] a confirmé une nouvelle fois

l'association entre *HLA-DRB1\*SE*-tabac et le risque de développer une PR ACPA + et les auteurs estimaient qu'il serait possible d'éviter 1/3 des nouveaux cas de PR ACPA + par an si tous les sujets porteurs d'allèles de *HLA-DRB1\*SE* s'abstenaient de fumer. Dans leur étude, l'interaction n'était cependant pas significative statistiquement probablement du fait d'un manque de puissance.

Interaction dans le risque d'anti-CEP-1, anti-cVim, anti-cFib, anti-MBP citrullinée

En 2009 Mahdi et al a repris les données de 3 cohortes d'Europe du Nord soit 1000 PR (cohorte suédoise EIRA et 2 cohortes britanniques NR et NOAR) et a montré qu'il existait une interaction significative entre *HLA-DRB1\*SE* et le tabac dans le risque de développer des anticorps dirigés contre l'énolase citrullinée de type 1 (CEP-1), un auto-antigène très spécifique de la PR. En effet les patients fumeurs porteurs d'allèles *HLA-DRB1\*SE* avaient un risque de produire des anti-CEP1 multiplié par 53 comparé aux non fumeurs ne portant pas d'allèle *HLA-DRB1\*SE* alors qu'en l'absence de tabac et en présence de 2 allèles *HLA-DRB1\*SE* le risque est multiplié par 14 [15]. Dans cette étude, l'interaction était statistiquement significative.

De la même façon, une étude [16] portant sur une cohorte hollandaise EAC de 700 PR a étudié l'interaction *HLA-DRB1\*SE*-tabac sur la production d'anticorps dirigés contre la vimentine citrullinée (cVim) et le fibrinogène citrulliné (cFib). Les auteurs ont montré que l'interaction gène-tabac était statistiquement significative et particulièrement forte sur la production d'anticorps anti-cVim avec un risque de PR produisant des anticorps anti-cVim multiplié par 58 en cas de portage de 2 allèles *HLA-DRB1\*SE* chez les fumeurs. L'interaction gène-tabac n'était cependant pas significative sur la production d'anticorps anti-cFib.

Ces travaux ont ensuite été repris par Willemze [17] qui a étudié l'interaction *HLA-DRB1\*SE*-tabac sur l'auto-immunité dirigée contre un grand nombre de peptides citrullinés de patients ACPA + et ACPA-. Des interactions significatives ont été identifiées dans la reconnaissance de l' $\alpha$ -énolase citrullinée, du fibrinogène  $\alpha$  citrulliné, de la vimentine citrullinée et de la MBP (protéine basique myélinique) citrullinée. Les auteurs ont ensuite répétés les analyses en stratifiant sur le statut ACPA +. Après stratification,

l'interaction gène-tabac n'était plus significative et les auteurs concluaient que l'interaction conditionnait surtout la présence d'ACPA en général et ne contribuait pas à la reconnaissance de peptides citrullinés spécifiques.

#### Interactions *PTPN22*-tabac

Le gène *PTPN22* encode une protéine tyrosine phosphatase intervenant notamment dans la régulation négative de l'activation des lymphocytes T et des lymphocytes B, via les voies de signalisation de leurs récepteurs (TCR et BCR). Un polymorphisme du gène *PTPN22* (Chs 1p13) a été un des premiers polymorphismes localisés hors du cmH rapporté comme étant associé à la susceptibilité à la PR [18]. La première étude d'interaction entre *PTPN22* et le tabac a été réalisée à partir de la cohorte suédoise EIRA comprenant 1 183 PR et 793 sujets sains [19]. Dans cette étude il existait une interaction gène-gène significative entre *PTPN22* et *HLA-DRB1\*SE* avec un risque de développer une PR ACPA + multiplié par 5 en cas de présence de *HLA-DRB1\*SE* en l'absence de l'allèle à risque de *PTPN22* et multiplié par 9 en cas de présence de *HLA-DRB1\*SE* et de présence de l'allèle à risque de *PTPN22*. Dans cette étude, aucune interaction significative entre *PTPN22* et tabac n'a pu être mise en évidence.

Une étude Nord Américaine portant sur 437 PR et 437 témoins a étudié l'interaction *PTPN22*-tabac dans le risque de développer une PR [20]. Chez les patients non porteurs de l'allèle à risque de *PTPN22*, les fumeurs n'avaient pas d'avantage de risque de développer une PR que les non fumeurs. En revanche, en cas portage d'au moins un allèle à risque de *PTPN22* et de tabagisme, le risque de développer une PR était multiplié par 2,5 comparé aux non fumeurs porteurs de l'allèle à risque avec une interaction gène-tabac statistiquement significative.

Une autre étude Nord Américaine portant sur 1330 PR et témoins n'a pas pu mettre en évidence d'interaction claire *PTPN22*-tabac dans le risque de survenue de PR [21].

Une autre étude britannique portant sur 5020 PR et 3759 contrôles a analysé l'interaction *PTPN22*-tabac sur le risque de développer une PR ACPA + ou FR + [22]. Dans cette étude, il existait une interaction gène-gène entre les allèles *HLA-DRB1\*SE* et l'allèle à risque de *PTPN22* mais aucune interaction gène-tabac n'a pu être mise en évidence (Figure 2).

Enfin, un travail récent portant sur la cohorte ESPOIR [23] montrait que le risque de développer des ACPA augmentait chez les fumeurs que s'ils étaient porteurs de l'allèle à risque de *PTPN22*. Cependant l'interaction gène-tabac n'était pas significative dans cette étude.

En résumé, seule une étude Nord Américaine portant sur un plus faible effectif a montré une interaction significative entre *PTPN22* et le tabac sur le risque de développer une PR. D'autres études Européennes portant sur de grands effectifs, n'ont pas mis en évidence d'interaction significative. En revanche, l'interaction gène-gène entre *PTPN22* et *HLA-DRB1\*SE* a été démontrée à plusieurs reprises.

#### Interactions entre le gène de la Glutathione S-transferase et le tabac

La Glutathione S-transferase joue un rôle important dans la détoxification des carcinogènes contenus dans la fumée de cigarette. Elle est encodée par le gène *GSTM1* qui compte 2 allèles fonctionnels (*GSTM1\*A* et *GSTM1\*B*) et un allèle non fonctionnel du fait d'une délétion de la séquence *GSTM1* (*GSTM1-null*). Ainsi, il a été démontré que l'allèle *GSTM1-null* était associé au risque de cancer du poumon et de maladie coronarienne.

C'est en partant de ces hypothèses que Matthey [24] a réalisé la première étude d'interaction gène-tabac dans la PR, à partir d'une cohorte de 164 femmes britanniques souffrant de PR. Dans cette étude, une interaction significative entre *GSTM1-null* et tabac a été mise en évidence sur le risque de développer des FR (84 % de FR + en cas de tabac et de *GSTM1-null* contre 51 % en l'absence de tabac comparé à 65 % en cas de tabac et de *GSTM1\*A* ou *\*B* contre 51 % en cas d'absence de tabac) et d'avoir une PR plus sévère avec des scores radiographique (Larsen) et fonctionnel (HAQ) plus élevés.

Une étude publiée en 2006 portant sur des populations Nord Américaines (123 PR) (11) et Européennes (158 PR et 466 témoins), a repris ces travaux et les auteurs ont montré cette fois une interaction entre les allèles fonctionnels de *GSTM1* et le tabac ce qui va à l'encontre de l'étude de Matthey.

Enfin, une étude récente Nord Américaine portant sur 549 femmes souffrant de PR et 549 témoins [25] a étudié les interactions entre le tabac et plusieurs polymorphismes de gènes impliqués dans le métabolisme des carcinogènes de la fumée de cigarette à savoir les gènes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, encodant plusieurs formes de GST et le gène *HMOX1* encodant l'Hème Oxygenase-1

aux propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et cytoprotectrices, et dont l'expression augmente en présence de nicotine. Dans cette étude, la seule interaction gène-tabac significative concernait l'interaction entre *GSTT1-null* et la consommation élevée de tabac (> 10 paquets-années), avec un risque de développer une PR FR + ou ACPA + multiplié par 2,70 en cas de présence de *GSTT1-null* et d'un tabagisme >10 paquets-années alors que ce risque n'était pas augmenté significativement chez les patients fumeurs non porteurs de *GSTT1-null*. Cette interaction était également significative dans l'étude de répllication sur la cohorte suédoise EIRA. Aucune autre interaction gène-tabac significative n'a été mise en évidence avec les autres polymorphismes testés dans cette étude.

#### Interactions entre d'autres gènes de susceptibilité (*PADI4*, *CTLA4*, *MIF*) et le tabac

Une étude Nord Américaine portant sur 437 PR et 437 témoins a étudié l'interaction *PADI4* (Peptidyl arginine deiminase, type 4) -tabac et *CTLA4*-tabac sur le risque de développer une PR [20]. Aucune association significative entre *PADI4* ou *CTLA4* et le risque de PR n'a pu être mise en évidence dans cette étude et il n'y avait pas non plus d'interaction gène-tabac, même après stratification sur la présence de FR. Il faut souligner que l'effectif de cette étude était inférieur à celui d'autres études Européennes, ce qui entraîne peut être un défaut de puissance pour observer un résultat significatif.

Une autre étude cas-témoins Nord Américaine [21] portant sur 1330 sujets a étudié les interactions entre plusieurs polymorphismes localisés sur les gènes *CTLA4*, *PADI4*, *MIF* et sur le chromosome 5 et le tabac. Aucune interaction gène-tabac n'a pu être mise en évidence dans cette étude.

#### Interactions entre *HLA-DRB1\*SE* et d'autres facteurs environnementaux

Une étude danoise cas-témoin portant sur 515 PR et 769 témoins [14], a étudié l'interaction entre d'autres facteurs environnementaux que le tabac et le portage de *HLA-DRB1\*SE* sur le risque de développer une PR ACPA +. Les facteurs environnementaux étudiés étaient entre autres la consommation d'alcool dans les 10 années précédentes, la consommation de café, la prise de contraceptif. Dans cette étude les facteurs génétiques et environnementaux restaient indépendamment associés au risque de développer une PR ACPA + sans preuve d'interaction entre ces facteurs.

L'interaction *HLA-DRB1\*SE*-alcool a été étudiée par Kallberg en 2009 [3] à partir de 2 cohortes suédoises (EIRA) de 1419 PR et 1674 contrôles et danoises (CACORA) de 515 PR et 769 contrôles. Dans cette étude, la réduction du risque de PR ACPA + entraînée par la consommation d'alcool de plus de 5 verres pas semaine était majorée chez les patients porteurs de *HLA-DRB1\*SE* dans les 2 cohortes et cette diminution liée à la consommation d'alcool était encore renforcée chez les fumeurs (Risque de développer une PR ACPA + multiplié par 18 en cas de portage de *HLA-DRB1\*SE*, de tabagisme en l'absence de consommation d'alcool contre un risque multiplié par 4 en cas de portage de *HLA-DRB1\*SE*, de tabagisme et de consommation d'alcool > 5 verres par semaine).

Le travail de Salliot et al [26] portant sur 568 femmes suivies dans la cohorte ESPOIR a montré qu'il existait une interaction significative entre le portage de *HLA-DRB1\*04* ou *HLA-DRB1\*01* et la prise de traitement hormonal de la ménopause (THM) sur le risque de production d'ACPA : le risque d'avoir des ACPA en cas de portage d'allèles *HLA-DRB1\*04* ou *HLA-DRB1\*01* était multiplié par 4,21 alors qu'il était réduit à un OR de 1,92 en cas de portage de ces allèles et prise de THM.

## Conclusion

Bien que les innovations technologiques aient permis un immense progrès dans la compréhension des mécanismes qui sous-tendent la survenue d'une PR, de nombreux facteurs génétiques restent encore à découvrir et les études concernant leurs interactions entre eux et avec les facteurs environnementaux n'en sont encore qu'à leur début. De nombreux facteurs génétiques et environnementaux favorisant le développement de PR ACPA + ont notamment été découverts mais de nombreuses inconnues demeurent quant aux mécanismes de survenue de PR ACPA-. Ainsi aucune étude n'a à ce jour pu mettre en évidence une interaction gène-environnement significative dans la survenue de PR ACPA- ce qui renforce l'hypothèse que les PR ACPA + et ACPA- sont des maladies distinctes dans leur physiopathologie, leur expression phénotypique, leur sévérité et leur réponse au traitement. D'autres facteurs environnementaux ont été découverts récemment et semblent impliqués dans la survenue de PR. C'est le cas notamment de certains agents infectieux tels le *P. gingivalis*. Il est très probable que ces facteurs environnementaux agissent différemment en fonction du terrain génétique et des études d'interaction gène-environnement vont probablement voir le jour prochainement (Tableau 1).

Tableau 1. Résumé des interactions gènes-environnement

Gène	Facteur Environnemental	Résultats des études d'interaction	Références
<i>HLA-DRB1*SE</i>	Tabac	Interaction <i>HLA-DRB1*SE</i> -tabac dans le risque de PR, de développer des FR et des ACPA	(10-15, 17, 19, 22, 27-29)
	Alcool	Interaction <i>HLA-DRB1*SE</i> -alcool sur le risque de PR ACPA + : diminution plus importante du risque en cas de consommation d'alcool si portage de <i>HLA-DRB1*SE</i> et tabac	(3, 14)
	THM	Effet protecteur du THM en cas de portage du <i>HLA-DRB1*SE</i>	(26)
	Autres facteurs*	Pas d'interaction significative	(14)
<i>PTPN22</i>	Tabac	Interaction <i>PTPN22</i> -tabac dans une seule étude, non confirmée dans 4	(19-23)
<i>PADI4</i>	Tabac	Absence d'interaction significative	(20, 21)
<i>CTLA4</i>	Tabac	Absence d'interaction significative	(20, 21)
<i>MIF</i>	Tabac	Absence d'interaction significative	(21)
Chromosome 5	Tabac	Absence d'interaction significative	(21)
Polymorphismes de la <i>GST</i>	Tabac	Interaction significative entre <i>GSTM1-null</i> et tabac dans le risque de PR FR + Interaction significative entre <i>GSTT1-null</i> et tabac dans le risque de PR FR + ou ACPA +	(11, 24) (25)

ACPA : anticorps anti-peptides citrullinés ; FR : facteurs rhumatoïdes ; GST : Glutathione S-transferase ; *HLA-DRB1\*SE* : allèles encodant l'Épitope Partage de *HLA-DRB1* ; PR : polyarthrite rhumatoïde ; THM : traitement hormonal de la ménopause

\*Autres facteurs : café, prise de contraceptif, lieu de résidence, travail, niveau d'éducation, statut marital, activité physique

## Liens d'intérêts

A. Ruysen-Witrand. : Aucun  
 A. Cantagrel : à venir  
 A. Constantin : à venir

## Références

- [1] Merlino LA, Cerhan JR, Criswell LA, et al. Estrogen and other female reproductive risk factors are not strongly associated with the development of rheumatoid arthritis in elderly women. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2003;33(2):72-82.
- [2] Silman AJ, Newman J, MacGregor AJ. Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from a nationwide study of disease-discordant twins. *Arthritis Rheum* 1996;39(5):732-5.
- [3] Kallberg H, Jacobsen S, Bengtsson C, et al. Alcohol consumption is associated with decreased risk of rheumatoid arthritis: results from two Scandinavian case-control studies. *Ann Rheum Dis* 2009;68(2):222-7.
- [4] Chen HH, Huang N, Chen YM, et al. Association between a history of periodontitis and the risk of rheumatoid arthritis: a nationwide, population-based, case-control study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012 Aug 31. [Epub ahead of print]
- [5] MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 2000;43(1):30-7.
- [6] Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van Mil AH, et al. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum* 2005;52(11):3433-8.
- [7] Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, et al. Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. *Am J Hum Genet* 2005;77(6):1044-60.
- [8] Bax M, van Heemst J, Huizinga TW, et al. Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Immunogenetics* 2011;63(8):459-66.
- [9] de Vries RR, van der Woude D, Houwing JJ, et al. Genetics of ACPA-positive rheumatoid arthritis: the beginning of the end? *Annals of the rheumatic diseases*. 2011; 70 Suppl 1: i51-4.
- [10] Padyukov L, Silva C, Stolt P, et al. A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2004;50(10):3085-92.
- [11] Criswell LA, Saag KG, Mikuls TR, et al. Smoking interacts with genetic risk factors in the development of rheumatoid arthritis among older Caucasian women. *Ann Rheum Dis* 2006;65(9):1163-7.
- [12] Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, et al. 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 Rheum* 2006;54(1):38-46.
- [13] Linn-Rasker SP, van der Helm-van Mil AH, van Gaalen FA, et al. Smoking is a risk factor for anti-CCP antibodies only in rheumatoid arthritis patients who carry HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Ann Rheum Dis* 2006;65(3):366-71.
- [14] Pedersen M, Jacobsen S, Garred P, et al. Strong combined gene-environment effects in anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis: a nationwide case-control study in Denmark. *Arthritis Rheum* 2007;56(5):1446-53.
- [15] Mahdi H, Fisher BA, Kallberg H, et al. Specific interaction between genotype, smoking and autoimmunity to citrullinated alpha-enolase in the etiology of rheumatoid arthritis. *Nature genetics* 2009;41(12):1319-24.
- [16] Van der Woude D, Alemayehu WG, Verduijn W, et al. Gene-environment interaction influences the reactivity of autoantibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Nature genetics* 2010;42(10):814-6
- [17] Willemze A, van der Woude D, Ghiddey W, et al. The interaction between HLA shared epitope alleles and smoking and its contribution to autoimmunity against several citrullinated antigens. *Arthritis Rheum* 2011;63(7):1823-32.
- [18] Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2004;75(2):330-7.
- [19] Kallberg H, Padyukov L, Plenge RM, et al. Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2007;80(5):867-75.
- [20] Costenbader KH, Chang SC, De Vivo I, et al. Genetic polymorphisms in PTPN22, PADI-4, and CTLA-4 and risk for rheumatoid arthritis in two longitudinal cohort studies: evidence of gene-environment interactions with heavy cigarette smoking. *Arthritis Res Ther* 2008;10(3):R52.
- [21] Mei L, Li X, Yang K, et al. Evaluating gene x gene and gene x smoking interaction in rheumatoid arthritis using candidate genes in GAW15. *BMC proceeding*. 2007;1 Suppl 1:S17.
- [22] Morgan AW, Thomson W, Martin SG, et al. Reevaluation of the interaction between HLA-DRB1 shared epitope alleles, PTPN22, and smoking in determining susceptibility to autoantibody-positive and autoantibody-negative rheumatoid arthritis in a large UK Caucasian population. *Arthritis Rheum* 2009;60(9):2565-76.
- [23] Salliot C, Dawidowicz K, Lukas C, et al. PTPN22 R620W genotype-phenotype correlation analysis and gene-environment interaction study in early rheumatoid arthritis: results from the ESPOIR cohort. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2011;50(10):1802-8.
- [24] Matvey DL, Hutchinson D, Dawes PT, Nixon NB, Clarke S, Fisher J, et al. Smoking and disease severity in rheumatoid arthritis: association with polymorphism at the glutathione S-transferase M1 locus. *Arthritis Rheum* 2002;46(3):640-6.
- [25] Keenan BT, Chibnik LB, Cui J, et al. Effect of interactions of glutathione S-transferase T1, M1, and P1 and HMOX1 gene promoter polymorphisms with heavy smoking on the risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62(11):3196-210.

- [26] Salliot C, Bombardier C, Saraux A, et al. Hormonal replacement therapy may reduce the risk for RA in women with early arthritis who carry HLA-DRB1 \*01 and/or \*04 alleles by protecting against the production of anti-CCP: results from the ESPOIR cohort. *Ann Rheum Dis* 2010;69(9):1683-6.
- [27] Lee HS, Irigoyen P, Kern M, et al. Interaction between smoking, the shared epitope, and anti-cyclic citrullinated peptide: a mixed picture in three large North American rheumatoid arthritis cohorts. *Arthritis Rheum* 2007;56(6):1745-53.
- [28] Lundstrom E, Kallberg H, Alfredsson L, et al. Gene-environment interaction between the DRB1 shared epitope and smoking in the risk of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis: all alleles are important. *Arthritis Rheum* 2009;60(6):1597-603.
- [29] Karlson EW, Chang SC, Cui J, et al. Gene-environment interaction between HLA-DRB1 shared epitope and heavy cigarette smoking in predicting incident rheumatoid arthritis. *Ann rheum dis* 2010;69(1):54-60.

Figure 1 interaction HLA-DRB1\*SE-tabac, d'après l'article de Klareskog et al (12)

Figure 1a : Chez les PR ACPA+

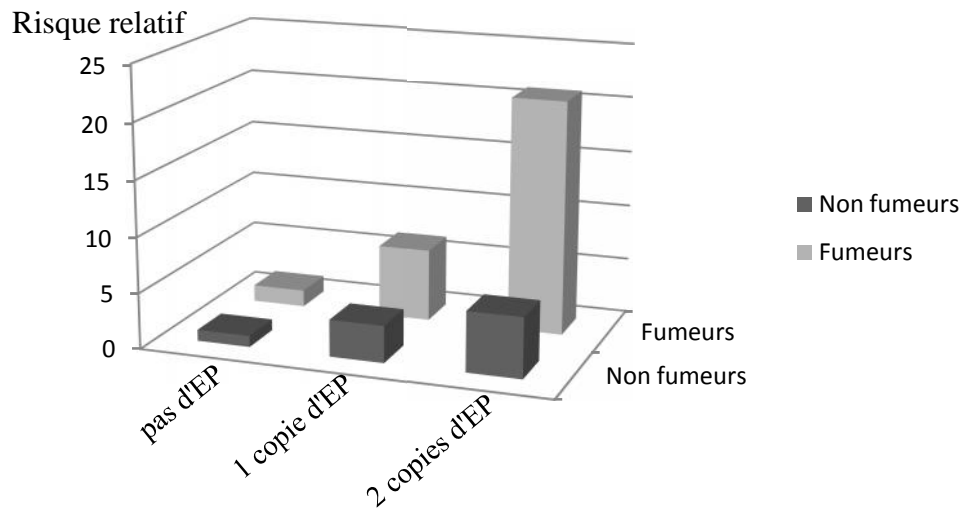
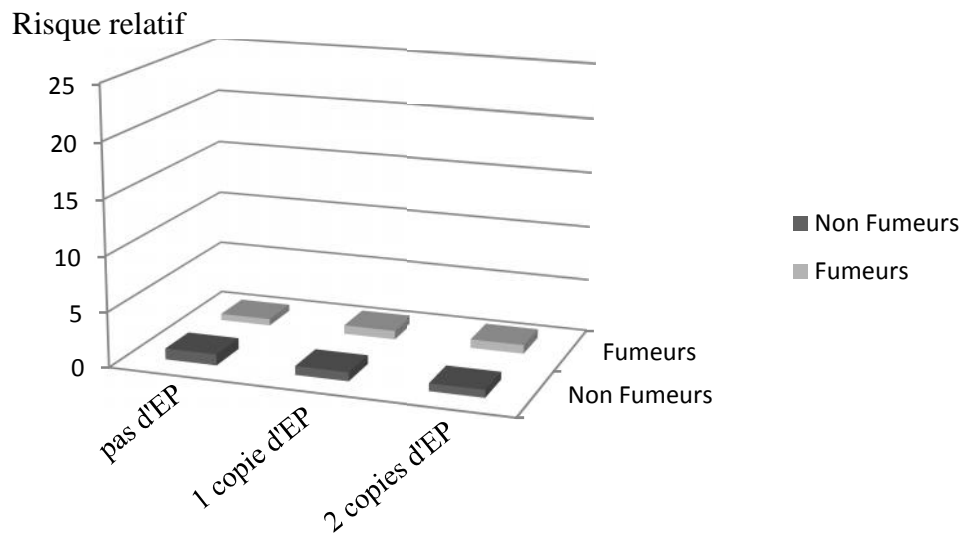


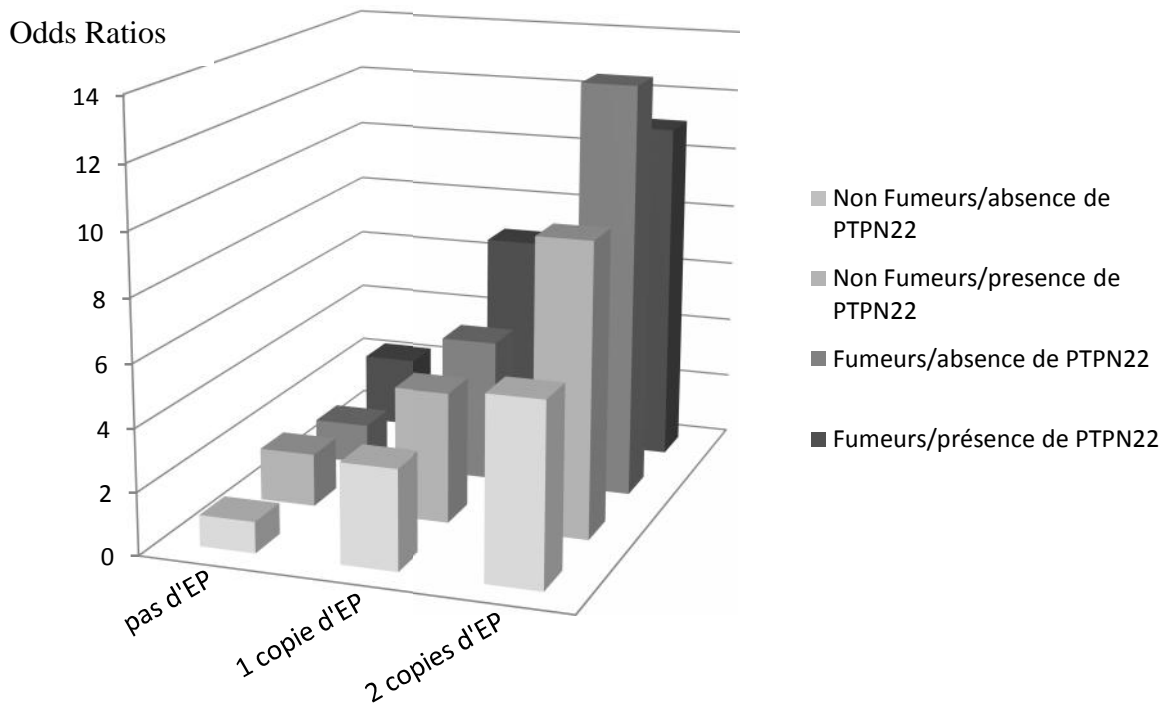
Figure 1b : chez les PR ACPA- :



EP : Epitope Partage de *HLA-DRB1*



Figure 2 : Interactions *HLA-DRB1\*SE/PTPN22*/tabac, d'après l'étude de Morgan et al (22)  
sur le risque de développer des ACPA



EP : Epitope Partagé encodé par *HLA-DRB1\*SE*

**3. Annexe 3 : Association of IL2-RA and IL2-RB genes with erosive status  
in early rheumatoid arthritis patients (ESPOIR and RMP cohorts)**



Available online at  
**SciVerse ScienceDirect**  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
**EM|consulte**  
www.em-consulte.com/en



Original article

## Association of *IL-2RA* and *IL-2RB* genes with erosive status in early rheumatoid arthritis patients (ESPOIR and RMP cohorts)

Adeline Ruyssen-Witrand<sup>a,\*,b,c,1</sup>, Cedric Lukas<sup>d</sup>, Delphine Nigon<sup>c</sup>, Karen Dawidowicz<sup>e</sup>, Jacques Morel<sup>d</sup>, Jean Sibilia<sup>f</sup>, Bénédicte Jamard<sup>c</sup>, Anne Cambon-Thomsen<sup>a,b</sup>, Alain Cantagrel<sup>b,c,g</sup>, Philippe Dieudé<sup>e,h,i</sup>, Arnaud Constantin<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> INSERM, UMR1027, 31062 Toulouse cedex 9, France

<sup>b</sup> Université de Toulouse III, UMR1027, 31062 Toulouse cedex 9, France

<sup>c</sup> Rheumatology Center, Purpan Teaching Hospital, CHU Toulouse, 1 place du Dr-Baylac, 31059 Toulouse cedex 9, France

<sup>d</sup> Rheumatology Department, Lapeyronie Teaching Hospital, 34295 Montpellier cedex 5, France

<sup>e</sup> Rheumatology Department, Claude Bernard-Bichat Teaching Hospital, Paris VII University, 75890 Paris cedex 18, France

<sup>f</sup> Rheumatology Department, Hautepierre Teaching Hospital, 67098 Strasbourg cedex, France

<sup>g</sup> Inserm UMR 1043, CPTP Toulouse Purpan, BP 3028, 31024 Toulouse cedex 3, France

<sup>h</sup> Paris VII University, 75890 Paris cedex 18, France

<sup>i</sup> INSERM U699, 75890 Paris cedex 18, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Accepted 2 October 2013

Available online xxx

#### Keywords:

Rheumatoid arthritis

*IL-2RA*

*IL-2RB*

Single nucleotide polymorphism

Autoantibodies

Disease progression

### ABSTRACT

**Objectives:** To assess the impact of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *IL-2RA* (rs2104286) and *IL-2RB* (rs743777 and rs3218253) genes on the risk of erosions in rheumatoid arthritis (RA) patients.

**Methods:** This work is derived from 2 prospective cohorts of early RA: ESPOIR ( $n = 439$ ) and RMP ( $n = 180$ ). The proportions of patients with erosions at baseline and 1 year according to the genotypes of *IL2RA* (rs2104286) or the haplotypes constructed with the 2 SNPs of *IL2RB* were compared in the whole population and in ACPA positive patients. A meta-analysis assessing the risk of erosion depending on the haplotypes of the 2 SNPs of *IL-2RB* was performed using the Mantel-Haenszel method. A multivariate model was used to assess the independent effect of the haplotypes of *IL-2RB* on the risk of erosions.

**Results:** The AC haplotype of *IL-2RB* carriage was significantly associated with the rate of erosions in ACPA positive patients in ESPOIR cohort (rate of erosions: AC/AC: 78% versus GC or GT/GC or GT: 44%,  $p = 0.001$ ). A meta-analysis of ESPOIR and RMP cohorts confirmed that the carriage of AC haplotype was significantly associated with the rate of erosions at 1 year in the whole sample (OR[95%CI] = 1.92[1.14–3.22],  $p = 0.01$ ) and in ACPA positive patients (OR[95%CI] = 3.34[1.68–6.67],  $p = 0.0006$ ). A multivariate model in ESPOIR cohort demonstrated the independent effect of the carriage of the AC haplotype (6.03[1.94–18.69],  $p = 0.002$ ) on the risk of erosions in ACPA+ patients.

**Conclusion:** A haplotype constructed with 2 SNPs located on *IL-2RB* gene was associated with erosive status in early RA.

© 2013 Société française de rhumatologie. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Rheumatoid arthritis (RA) is one of the most common systemic autoimmune disorders, characterized by peripheral synovial joint inflammation, which ultimately leads to joint destruction and increases mortality [1]. The etiology of RA is complex and multifactorial, but family aggregation and twin concordance studies indicate a significant causal role for genetic factors, with

heritability being estimated at 60% [2,3]. The association between the human leukocyte antigen (HLA) region and RA susceptibility and severity has been established for many years and, more recently, specific interactions of *HLA-DRB1 shared epitope (HLA-DRB1\*SE)* alleles with environmental factors, such as cigarette smoking, have been described [4]. Over the last few years, several new susceptibility factors have been identified, and their associations with RA have been independently replicated: *PTPN22*, *TRAF1/C5*, *OLIG3/TNFAIP3*, and *STAT4* [5,6]. In almost all cases, such susceptibility genes were found to be associated with anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) positive RA but not ACPA negative RA. The presence of ACPA has become an important diagnostic and prognostic criterion for RA, and it has been suggested that ACPA positivity or negativity may define different disease enti-

\* Corresponding author. Rheumatology Center, Purpan Teaching Hospital, CHU Toulouse, 1 place du Dr-Baylac, 31059 Toulouse cedex 9, France. Tel.: +33 5 61 77 69 77; fax: +33 5 61 77 73 75.

E-mail address: [adruyssen@hotmail.com](mailto:adruyssen@hotmail.com) (A. Ruyssen-Witrand).

<sup>1</sup> The corresponding author certifies that all authors approved the entirety of the submitted material and contributed actively to the study.

ties. Indeed, clinical studies show that RA patients with ACPA differ from the so-called autoantibody negative patients in terms of disease activity, structural severity and response to disease-modifying anti-rheumatic drugs [7,8]. Thus, the association between genetic polymorphisms and disease severity often depends on ACPA presence [9,10].

Many signaling pathways and molecules are involved in the development, homeostasis and function of this T-cell subset. Interleukin 2 (IL-2), a cytokine previously considered to be primarily involved in the activation and proliferation of T-cells, is one of these molecules.

The high affinity IL-2 receptor (IL-2R) is a heterotrimer consisting of the  $\alpha$  chain (IL-2RA, CD25), the  $\beta$  chain (IL-2RB, CD122) and the common cytokine receptor  $\gamma$  chain ( $\gamma$ c, CD132) [11,12]. As a result, targeted disruption of the *IL2*, *IL2RA* or *IL2RB* genes in mice causes systemic, multi-organ inflammation [13–15], as does spontaneous mutation of the IL-2 receptor in humans [16]. This phenotype is not due to impaired activation-induced cell death of activated T-cells, a process in which IL-2 also plays an important role, but rather to severe depletion of the peripheral CD4+CD25+ Treg pool [17]. Numerous works have reported the importance of T-cells CD4+CD25+ (expressing IL2R $\alpha$ ) in the rupture of the tolerance implicated in the RA pathogenesis [18].

In 2007, the first genome-wide association study in RA carried out by the Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC) identified a number of loci reaching genome-wide significance, including one single nucleotide polymorphism (SNP) in the *IL-2RA* gene (rs2104286) and one SNP in the *IL-2RB* gene (rs743777) [19]. These results have been replicated in two independent populations [20,21]. A validation study of the initial WTCCC study identified another SNP in the *IL-2RB* gene (rs3218253) associated with RA susceptibility [22] and a recent study performed in Asian population identified an association between rs2104286 and rs3218253 polymorphisms and RA susceptibility [23].

In the present study, we investigated the association between these 3 *IL-2RA* and *IL-2RB* SNPs and the erosive status in 2 cohorts of early RA patients (ESPOIR and RMP cohorts), taking into account ACPA status.

## 1. Methods

### 1.1. Study population

#### 1.1.1. ESPOIR cohort

This work is derived from a large national, multicenter, longitudinal, prospective cohort of 813 early arthritis patients, the ESPOIR cohort, aiming to investigate diagnosis, prognostic markers, epidemiology, pathogenesis and medico-economic factors in RA. The characteristics of the cohort have previously been described elsewhere [24]. Briefly, 813 early arthritis patients with arthritis duration < 6 months and no prior treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) or glucocorticoids were included between 2002 and 2005 and prospectively followed every 6 months for the 2 first years, then annually. Patients had clinical, biological and radiological assessments at baseline and at each visit.

For the present study, we selected the patients who fulfilled at baseline the 1987 American College of Rheumatology (ACR) criteria [25] for RA, with available baseline and 1-year follow-up hand and foot radiographs, and with available genotyping data for the 3 *IL-2RA* and *IL-2RB* SNPs of interest.

Local institutional review boards approved the study, and written informed consent was obtained from all subjects in the study [24].

#### 1.1.2. RMP cohort

An independent sample of 250 early arthritis patients, fulfilling the 1987 ACR Criteria for RA, included in a regional, longitudinal prospective cohort of early arthritis French patients, recruited from 1992 to 2001, the RMP (Rangueil Midi-Pyrénées) cohort, was used to validate the results of the association study conducted on the ESPOIR cohort [26–28]. All the patients had disease duration of < 1 year.

### 1.2. Clinical data

#### 1.2.1. ESPOIR cohort

All patients had a clinical examination at baseline and at 1 year. Demographic characteristics including age, gender, symptom duration, current DMARD therapy and mean dose of glucocorticoids were collected, as well as disease activity established on the Disease Activity Score on 28 joints (DAS 28) [29]. Patients were classified as “smokers” or “never smokers” according to their reported smoking habits at baseline.

#### 1.2.2. RMP cohort

All patients included in the study had a yearly clinical examination. Demographic characteristics, disease duration, DAS 28 were collected.

### 1.3. Immunologic variables

#### 1.3.1. ESPOIR cohort

Anti-CCP2 antibodies (ACPA, ELISA, DiaSorin, France, Positive > 50 U/mL) were analyzed at baseline in a central lab using the same technique.

#### 1.3.2. RMP cohort

Anti-CCP2 antibodies were detected by ELISA according to the instructions of the manufacturer (IMMUNOSCAN RA; Euro-Diagnostica, Arnhem, The Netherlands)

### 1.4. SNP genotyping

The 3 SNPs of interest located in *IL-2RA* (rs2104286) and *IL-2RB* (rs743777 and rs3218253) genes [19–22] were genotyped using allele-specific kinetic polymerase chain reaction analysis, by K Biosciences (Herts, UK) using the KASPar method both in ESPOIR and RMP cohorts.

The success rate was 97.9% for rs2104286, 98.03% for rs743777 and 96.9% for rs3218253 in ESPOIR cohort and 99.2% for rs2104286, 98.4% for rs743777 and 98.8% for rs3218253 in RMP cohort.

Rs743777 and rs3218253 of *IL-2RB* were in high linkage disequilibrium ( $D=0.18$ , correlation coefficient  $R^2=0.78$ ), explained by the proximity of the locus (6800pb). Thus haplotypes of both SNPs of *IL2RB* were built with Plink software, using the expectation-maximization (EM) algorithm.

### 1.5. Radiographs

#### 1.5.1. ESPOIR cohort

RA patients included in the ESPOIR cohort had hand and foot radiographs at baseline and at the 1-year visit. The radiographs were centralized and scored by a single experienced rheumatologist (CL) with blinding as to clinical and genetic data, according to the modified van der Heijde Sharp score [30]. The results were expressed in total Sharp score (mTSS), and erosive status (patients with a score > the smallest detectable change, with at least an Erosion Sharp Score  $\geq 1$ ). Intraclass correlation coefficient was calculated from a random sample of 30 radiographs scored twice and

was about 0.99 [31]. The smallest detectable change was calculated at 1.0 mTSS unit.

### 1.5.2. RMP cohort

Radiographs of the hands and feet of RA patients were obtained at the start of the study and at 1 year. All radiographs were scored by the same investigator (AC), according to the Sharp/van der Heijde method. To determine intraobserver reliability, 30 randomly chosen pairs of radiographs of the hands and feet were scored twice. The intraclass correlation coefficient was 0.98 for mTSS.

### 1.6. Statistical analysis

Tests for deviation from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) were performed using a standard  $\chi^2$  test (1 d.f.).

To take advantage of the prospective character of the data from the ESPOIR and RMP cohorts, which consisted of repeated measurements, and to avoid multiple testing by performing statistical tests at each time point, a generalized linear mixed model for the longitudinal data was used to compare the erosive status according to the genotype distribution for *IL-2RA* rs2104286 and *IL-2RB* haplotypes of rs743777 and rs3218253 SNPs at baseline and at 1 year, in ESPOIR and RMP cohorts.

Because of the non-normal distribution of the mTSS, the logarithms of mTSS were used and compared between each genotype using a linear model for longitudinal data, at baseline and at 1 year in ESPOIR and RMP cohorts.

The same analyses were repeated on the ACPA positive population of RA patients (ESPOIR:  $n = 210$ , RMP:  $n = 133$ ).

Since 1 SNP and 1 haplotype of 2 SNPs were evaluated in 2 different populations (whole sample size and ACPA positive patients) with 2 different outcomes (log(mTSS) and erosive status) a Bonferroni correction was applied; the  $p$  value for significance was set at 0.004.

The ESPOIR and RMP cohorts were pooled and a meta-analysis was performed to assess the association between the carriage of the risk allele of rs21042286 or the risk haplotype of *IL-2RB* and the risk of erosion using a fixed effects model with the Mantel-Haenszel method. Statistical heterogeneity among studies was assessed with the  $I^2$ -statistics.  $I^2$ -values of 25, 50 and 75% were assigned as low, moderate and high estimates, respectively. Heterogeneity was considered significant for  $p < 0.10$ .

Finally a multivariate analysis was performed to assess the risk of erosion depending on the locus of risk carriage of *IL-2RB* haplotype through a generalized linear mixed model for longitudinal data in patients with ACPA presence in ESPOIR cohort. The following factors were firstly tested for the association with erosive status at one year: age, gender, smoking habits, disease duration, DAS28, presence of *HLA-DR Shared Epitope* (including the following alleles of *HLA-DRB1*: \*01:01, \*01:02, \*04:01, \*04:04, \*04:05, \*04:08, \*14:02, \*1001) at the inclusion, DMARDs use that proved a structural benefit (methotrexate, leflunomide and biologic agents) and glucocorticoids use at one year. The factors associated with erosive status at one year with a  $p$  value  $< 0.1$  were then included in the model. A backward procedure was used to exclude variables with no significant association.

All the analyses were performed using the SAS 9.2 software package.

## 2. Results

### 2.1. Patients

Among the 813 early arthritis patients included in the ESPOIR cohort, 579 fulfilled the 1987 ACR criteria for RA at baseline; 456 had available sets of hand and foot radiographs at baseline

**Table 1**

Demographic and disease characteristics at baseline and at 1 year in ESPOIR and RMP cohorts.

	ESPOIR cohort ( $n = 439$ )	RMP cohort ( $n = 180$ )
Baseline characteristics		
Age, years, med [IQR]	51.8 [41.0–57.9]	49.5 [39.3–58.3]
Gender, female, $n$ (%)	335 (76)	137 (76)
Smoking status, $n$ (%)	216 (49)	NA
Symptom duration, months, median [IQR]	4.9 [3.1–7.4]	6.8 [4.0–10.8]
DAS 28, med [IQR]	5.3 [4.6–6.1]	5.0 [4.0–6.2]
Rheumatoid factor positive, $n$ (%)	233 (53)	130 (72)
ACPA positive, $n$ (%)	210 (48)	133 (74)
Total Sharp Score, med [IQR]	3 [1–8]	0 [0–4]
Erosive patients, $n$ (%)	268 (61)	74 (41)
One-year characteristics		
DAS 28, med [IQR]	3.1 [2.2–4.1]	3.6 [2.3–5.0]
Total Sharp Score, med [IQR]	4 [1–9]	5 [0–14]
Erosive patients, number (%)	287 (65)	123 (68)
Steroids, $n$ (%)	177 (40)	99 (58)
DMARDs <sup>a</sup> , $n$ (%)	284 (65)	73 (49)
Biologics, $n$ (%)	45 (10)	0

RA: Rheumatoid arthritis, med: median, IQR: interquartile range,  $n$ : number of patients, DMARDs: Disease-Modifying anti-Rheumatic Drugs.

<sup>a</sup> DMARDs that proved a structural benefit (Methotrexate, Leflunomide, Biologic agents).

and at 1 year follow-up. Finally, genotyping data for both *IL-2RA* (rs2104286) and *IL-2RB* (rs743777 and rs3218253) were available in 439 RA patients who constituted the final sample of the study. Among the 250 patients included in the RMP cohort, 185 had radiographs at baseline and 1 year and 180 patients had all the 3 SNPs genotyped. The main baseline and one-year demographic and disease characteristics of the 439 early RA patients of ESPOIR cohort and the 180 RA patients of RMP cohort, are presented in Table 1.

In RMP cohort, baseline disease duration was slightly higher; the proportion of ACPA positive patients was higher, while baseline radiographic score was lower than in ESPOIR cohort. Furthermore the rate of progression of the radiographic score in RMP cohort within 1 year was higher.

### 2.2. Association between *IL-2RA* genotypes or *IL-2RB* haplotypes and mTSS

The genotype frequencies fit the HWE expectations for both *IL-2RA* (rs 2104286) and *IL-2RB* (rs743777 and rs3218253) SNPs in ESPOIR and RMP cohorts (Table 2). The haplotype frequencies of *IL-2RB* were: AC = 605 (69%), GC: 44 (5%), GT: 229 (26%).

Neither *IL-2RA* genotypes nor *IL-2RB* haplotypes were significantly associated with mTSS in ESPOIR cohort in the whole sample size or in the subgroup of ACPA positive RA.

Neither *IL-2RA* genotypes nor the *IL-2RB* haplotypes were significantly associated with ACPA production (data not shown).

Neither *IL-2RA* genotypes nor *IL-2RB* haplotypes were significantly associated with mTSS in RMP cohort (data not shown).

### 2.3. Association between *IL-2RA* genotypes or *IL-2RB* haplotypes and the risk of erosion

#### 2.3.1. ESPOIR cohort

Neither *IL-2RA* genotypes nor *IL-2RB* haplotypes were significantly associated with the presence of erosion after a Bonferroni correction in the whole sample size of the ESPOIR cohort (Table 3). A post-hoc power calculation was performed and the power to detect an association between *IL-2RA* genotypes and presence of erosions in the whole sample size was about 8.3% whereas the power to

**Table 2**  
Association between *IL2RA* genotypes or *IL2RB* haplotypes and Total Sharp Score modified by van der Heijde in 439 RA patients in ESPOIR cohort.

Genotypes	Baseline mTSS, med [IQR]	1 year mTSS, med [IQR]	p value
<i>IL2RA</i> (rs 2104286)			
ESPOIR			
Whole sample size			
AA (n = 252/57%)	3 [5-8]	4 [1-8]	0.8
AG (n = 158/36%)	4 [1-9]	4 [1-10]	
GG (n = 29/7%)	4 [1-8]	4 [1-8]	
ACPA+ patients			
AA (n = 113/54%)	3 [1-11]	5 [2-13]	0.8
AG (n = 84/40%)	5 [1-10]	6 [1-14]	
GG (n = 13/6%)	5 [1-8]	8 [2-8]	
RMP			
Whole sample size			
AA (n = 109/61%)	1 [0-4]	8 [3-22]	0.6
AG (n = 63/35%)	0 [0-3]	7 [1-23]	
GG (n = 8/4%)	0 [0-1]	5 [0-17]	
ACPA+ patients			
AA (n = 82/62%)	2 [0-5]	12 [4-24]	0.6
AG (n = 46/35%)	0 [0-3]	11 [2-28]	
GG (n = 5/4%)	0 [0-0]	9 [1-9]	
Haplotypes of <i>IL2RB</i> (rs743777 and rs3218253)			
ESPOIR			
Whole sample size			
AC/AC (n = 213/49%)	4 [1-7]	4 [1-9]	0.2
AC/GC or GT (n = 179/41%)	4 [0-9]	5 [1-10]	
GC or GT/GC or GT (n = 47/11%)	2 [0-6]	2 [0-7]	
ACPA+ patients			
AC/AC (n = 96/46%)	5 [2-10]	7 [2-14]	0.6
AC/GC or GT (n = 89/42%)	5 [1-11]	6 [2-14]	
GC or GT/GC or GT (n = 25/12%)	3 [0-5]	4 [0-6]	
RMP			
Whole sample size			
AC/AC (n = 78/43%)	1 [0-4]	9 [3-23]	0.9
AC/GC or GT (n = 84/47%)	0 [0-4]	7 [1-21]	
GC or GT/GC or GT (n = 18/10%)	0 [0-3]	5 [0-27]	
ACPA+ patients			
AC/AC (n = 60/45%)	1 [0-5]	10 [4-26]	0.9
AC/GC or GT (n = 60/45%)	1 [0-5]	11 [4-24]	
GC or GT/GC or GT (n = 13/10%)	0 [0-3]	12 [0-27]	

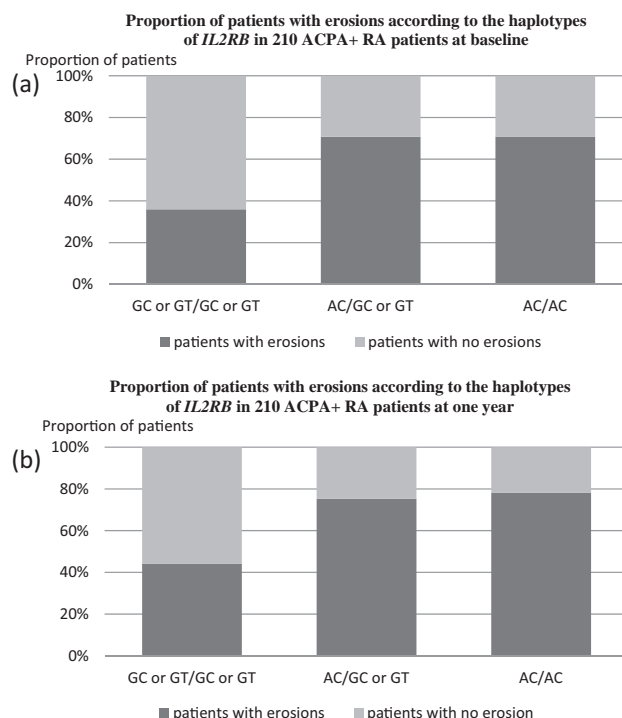
ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies mTSS: total Sharp Score modified by Van der Heijde, IQR: interquartile range, p value: obtained with a linear model for longitudinal data.

detect an association between *IL2RB* haplotype and the presence of erosions was about 22%.

In the subgroup of ACPA positive RA patients, the haplotype AC of *IL2RB* was associated with a higher rate of erosions at baseline and at 1 year follow-up in comparison to other haplotypes (by genotype analysis: proportion of patients with erosions at baseline: AC/AC: 71%, AC/GC or GT: 71%, GC or GT/GC or GT: 36%, at 1 year: AC/AC: 78%, AC/GC or GT: 75%, GC or GT/GC or GT: 44%,  $p=0.001$  for comparison of AC/AC to GC or GT/GC or GT and  $p=0.002$  for comparison of AC/GC or GT to GC or GT/GC or GT).

The proportion of ACPA positive RA patients with erosions at baseline or at one year according to *IL2RB* haplotypes is presented in Fig. 1.

No association was found between the genotypes of *IL2RA* and the risk of erosion in the subgroup of ACPA positive RA patients. The power to detect an association between *IL2RA* genotypes and presence of erosions in the ACPA+ sample was about 2.8% whereas the power to detect an association between *IL2RB* haplotype and the presence of erosions was about 55%.



**Fig. 1.** Proportion of patients with erosions at baseline or at one year according to the *IL2RB* haplotypes in the ACPA+ population (n = 210) of ESPOIR cohort at baseline and one year. ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies, RA: rheumatoid arthritis.

### 2.3.2. RMP cohort

In RMP cohort, the rate of erosion was higher in AC haplotype carriers at baseline and 1 year (by genotype analysis: proportion of patients with erosions at baseline: AC/AC: 46%, AC/GC or GT: 39%, GC or GT/GC or GT: 28%, at one year: AC/AC: 71%, AC/GC or GT: 70%, GC or GT/GC or GT: 50%) but we failed to show a statistical significance probably because a lack of power in this sample (AC haplotype carriage:  $p=0.1$ ). However, there was a significant trend towards higher rates of progression among AC haplotype carriers (Cochran-Armitage trend test:  $p=0.04$ ).

No additional statistical significant association was found in RMP cohort after stratification on ACPA presence. The power to detect an association between *IL2RA* genotypes and presence of erosions in the whole sample was about 15% whereas the power to detect an association between *IL2RB* haplotype and the presence of erosions was about 25%. In the ACPA+ sample, the power to detect an association between *IL2RA* genotypes and presence of erosions in the whole sample was about 14% whereas the power to detect an association between *IL2RB* haplotype and the presence of erosions was about 17%.

### 2.4. Meta-analysis assessing the risk of erosions at 1 year in ESPOIR and RMP cohorts according to the carriage of AC haplotype of *IL2RB*

A fixed effects model with the Mantel-Haenszel method meta-analysis of ESPOIR and RMP data was then performed to assess the risk of erosion at 1 year according to the carriage of AC haplotype of *IL2RB* (Figs. 2-3). No significant heterogeneity was found ( $I^2=0\%$ ,  $p>0.1$ ). The analyses showed that AC haplotype carriage increased the risk of erosion at one year in the whole sample (AC haplotype carriage: OR[95%CI] = 1.92[1.14-3.22],  $p=0.01$ ) and the strength of this association was increased in ACPA positive patients (AC haplotype carriage: OR[95%CI] = 3.34[1.68-6.67],  $p=0.0006$ ).

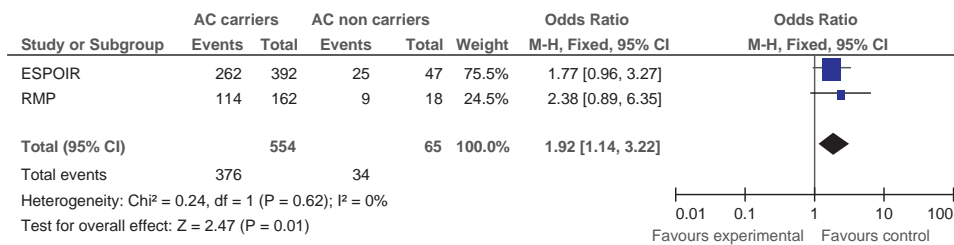


Fig. 2. Meta-analysis assessing the risk of erosion depending on carriage of AC haplotype of *IL-2RB* in all RA patients.

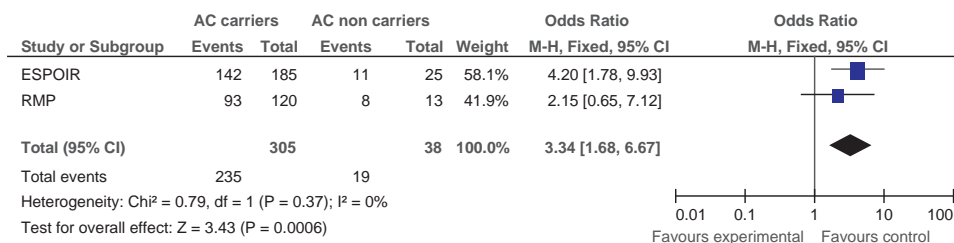


Fig. 3. Meta-analysis assessing the risk of erosion depending on carriage of AC haplotype of *IL-2RB* in ACPA+ RA patients. MH: Mantel-Haenszel; CI: 95% confidence interval.

2.5. Identification of independent risk factors of erosions in early RA in ESPOIR cohort

The multivariate analysis was only performed in ESPOIR cohort because some important data such as smoking habits were missing in RMP cohort and in the subgroup of ACPA positive patients since the association between the carriage of AC haplotype of *IL-2RB* and erosions was statistically significant only in this stratum in ESPOIR cohort.

Firstly, univariate analyses were performed to identify the variables associated with erosions in 210 ACPA positive RA patients of ESPOIR cohort. Age, gender, disease duration at the inclusion, smoking habits and DMARDs use that proved a structural benefit (including methotrexate, leflunomide and biologic agents) use were significantly associated with erosion with a p value >0.1 and included in the generalized linear mixed model. A backward procedure was used to exclude the variables not significantly associated with erosion with a p value >0.05.

AC haplotype carriage was independently associated with the risk of erosion in this model (OR [95%CI]=6.15 [2.03–18.56], p=0.001). The other variables significantly associated with the risk of erosions in both models were age and smoking habits (Table 4).

3. Discussion

The present study investigated the contribution of *IL-2RA* (locus 10p15) and *IL-2RB* (locus 22q12) on RA severity, assessed on the risk of erosions in early RA patients. Our results revealed an association between a haplotype of 2 SNPs of *IL-2RB* (rs743777 and rs3218253) and the risk of erosions in ACPA positive but not in ACPA negative RA patients while there was no association between the *IL-2RA* SNP (rs2104286) and structural damage. This association remained significant after multivariate analysis, suggesting that *IL-2RB* is an independent risk factor for erosions in ACPA positive early RA patients. The restriction of the association between the haplotype of *IL2RB* and erosions to the subgroup of ACPA positive patients illustrates that ACPA positive and negative RA are 2 different entities with different genetic background and determinants.

A GWAS undertaken in the British population comparing 2,000 RA patients and 3,000 controls, first reported a moderate

evidence of association between SNP mapping close to both the alpha (rs2104286) and beta (rs743777) chains of *IL-2R* and RA susceptibility.[19] A validation study undertaken in subjects of European ancestry, which compared 4,106 RA patients and 11,238 controls, confirmed the previously reported association between the A allele of the SNP mapping 6 kb upstream (rs743777) of the transcription start site of *IL-2RB* and revealed an association between C allele of another SNP mapping within intron 1 of *IL-2RB* (rs3218253) and RA susceptibility [22]. The contribution of these 2 SNPs to the risk of RA was then assessed in an independent Dutch case-control study, which compared 616 RA patients and 545 healthy ethnically and geographically matched controls, and provided additional evidence for the association between *IL-2RA* and *IL-2RB* polymorphisms and RA susceptibility [20]. Recently, a GWAS meta-analysis of 5,539 autoantibody-positive individuals with RA and 20,169 controls of European descent, followed by replication in an independent set of 6,768 RA cases and 8,806 controls, established the association between G allele of *IL-2RA* (rs2104286) and C allele of *IL-2RB* (rs3218253) and RA susceptibility.[32] Finally, another validation study on 983 RA patients and 1007 healthy controls in North-India found a significant association between both rs2104286 and rs3218253 and RA susceptibility [23]. To our knowledge, an association between these polymorphisms and the severity of RA has never been demonstrated.

In the validation study on RMP cohort, the statistical analyses failed to demonstrate a significant association between the haplotype located on *IL-2RB* and the risk of erosions. However, the power of the test was only about 25% in the whole sample size and 17% in the ACPA+ population and we assume that the poor sample explain the failure of the test to detect a significant difference. We assume that this negative result may be due to a lack of power. Furthermore, after meta-analysis, the association remained significant with no heterogeneity suggesting that the association had the same direction in both cohorts. There was a difference between both cohorts in terms of rate of progression within one year. Indeed, RMP patients had a higher rate of progression than ESPOIR patients. These differences might be explained by the different inclusion criteria and the different dates of inclusion in both cohorts (between 2002 and 2005 for ESPOIR and between 1992 and 2001 for RMP) implicating differences in the treatment strategies and a worse prognosis in RMP patients. As these polymorphisms are newly identified and

**Table 3**  
Association between *IL-2RA* genotypes or *IL-2RB* haplotypes and erosive status in 439 RA patients in ESPOIR cohort.

Genotypes	Baseline	1 year	OR [95%CI]	p value
<b>IL2RA (rs2104286) ESPOIR</b>				
Whole sample size				
AA (n = 13252/57%)	156 (62)	166 (66)	1.46 [0.54–3.96]	0.5
AG (n = 13158/36%)	96 (61)	104 (66)	1.41 [0.50–3.94]	0.5
GG (n = 1329/7%)	16 (55)	17 (59)	1	–
ACPA+ patients				
AA (n = 1396/46%)	77 (68)	83 (73)	0.88 [0.19–4.06]	0.9
AG (n = 1389/42%)	54 (64)	60 (71)	0.74 [0.15–3.49]	0.7
GG (n = 1325/12%)	9 (69)	10 (77)	1	–
RMP				
Whole sample size				
AA (n = 13109/61%)	50 (46)	76 (70)	2.82 [0.57–13.77]	0.2
AG (n = 1363/35%)	22 (35)	43 (68)	1.37 [0.69–2.70]	0.4
GG (n = 138/4%)	2 (25)	4 (50)	1	–
ACPA+ patient				
AA (n = 1382/62%)	41 (50)	64 (78)	3.43 [0.48–24.20]	0.2
AG (n = 1346/35%)	20 (43)	34 (74)	1.33 [0.60–2.91]	0.3
GG (n = 135/4%)	1 (20)	3 (60)	1	–
<b>Haplotypes of IL2RB (rs743777 and rs3218253) ESPOIR</b>				
Whole sample size				
AC/AC (n = 13213/49%)	131 (62)	140 (66)	1.96 [0.86–4.42]	0.1
AC/GC or GT (n = 13179/41%)	114 (64)	122 (68)	2.23 [0.97–5.11]	0.06
GC or GT/GC or GT (n = 1347/11%)	23 (49)	25 (53)	1	–
ACPA+ patients				
AC/AC (n = 1396/46%)	68 (71)	75 (78)	6.45 [2.09–19.82]	0.001
AC/GC or GT (n = 1389/42%)	63 (71)	67 (75)	5.94 [1.92–18.42]	0.002
GC or GT/GC or GT (n = 1325/12%)	9 (36)	11 (44)	1	–
RMP				
Whole sample size				
AC/AC (n = 1378/43%)	36 (46)	55 (71)	2.70 [0.87–8.34]	0.08
AC/GC or GT (n = 1384/47%)	33 (39)	59 (70)	2.24 [0.73–6.85]	0.2
GC or GT/GC or GT (n = 1318/10%)	5 (28)	9 (50)	1	–
ACPA+ patients				
AC/AC (n = 1360/45%)	31 (52)	46 (77)	2.54 [0.69–9.26]	0.2
AC/GC or GT (n = 1360/45%)	27 (45)	47 (78)	2.16 [0.60–8.07]	0.2
GC or GT/GC or GT (n = 1313/10%)	4 (31)	8 (62)	1	–

OR[95%CI]: Odds ratios with 95% confidence interval obtained with a generalized linear mixed model for longitudinal data. ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies

the sample size of the cohorts small compared to other studies, the association with severity might be overestimated in ESPOIR because of the bias of the winner’s curse. This might also explain the lack of association in RMP cohort. Further studies should be necessary to confirm the association.

While SNP rs743777 maps 6 kb upstream of the transcription start site of *IL-2RB* and SNP rs3218253 maps within intron 1 of *IL-2RB*, the molecular mechanisms through which these SNPs affect RA susceptibility and severity remain speculative. Furthermore, a linkage disequilibrium was observed between both SNPs and thus we may assume that both SNPs could be markers of another polymorphism that could play a role in the expression or the

**Table 4**  
Multivariate analysis assessing erosive status at baseline and one year including carriage of AC haplotype of *IL-2RB*, age, sex, clinical center, symptoms duration, DAS 28, smoking habits as covariates in 210 ACPA positive RA patients from ESPOIR cohort.

	OR [95%CI]	p value
Age	1.08 [1.04–1.12]	<0.0001
Female gender	0.49 [0.18–1.29]	0.1
Disease duration	1.05 [0.99–1.11]	0.09
Smoking habits	0.34 [0.14–0.76]	0.009
DMARDs <sup>a</sup> use	1.22 [0.50–2.96]	0.7
Time of visit	1.68 [0.95–2.93]	0.07
Carriage of AC haplotype of <i>IL2RB</i>	6.03 [1.94–18.69]	0.002

OR[95%CI]: Odds ratios with 95% confidence interval obtained with a generalized linear mixed model for longitudinal data; DMARDs: Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs.

<sup>a</sup> DMARDs that proved a structural benefits (methotrexate, leflunomide and biologic agents).

conformation of *IL2RB*. *IL-2* is a cytokine that exerts its pleiotropic biological activities by binding to its receptor on T-cells or other cell types. *IL-2R $\alpha$*  (CD25) affords high-affinity to *IL-2R*, which is comprised of  $\beta$  (CD122) and  $\gamma$  (CD132) chains.[17] The signaling function of the high-affinity *IL-2R* is mediated through its *IL-2R $\beta$*  and *IL-2R $\gamma$*  chains. Thus, SNPs affecting either *IL-2RB* transcriptional level or *IL-2R $\beta$*  structural and/or functional properties could affect both immune and inflammatory responses, via *IL-2/IL-2R*.

In this study, the association between *IL2RB* haplotype and the presence of erosions was significant in the meta-analysis in the whole sample but was stronger in the ACPA+ subgroup. Most of studies assessing the association between SNPs and severity had identified such association in ACPA+ RA patients [9,10]. Such differences increase the hypothesis that ACPA+ and ACPA–RA are 2 distinct diseases supported by different genetic backgrounds.

This study provides additional evidence for the association of *IL-2RB* with RA by revealing an association between a haplotype of 2 *IL2-RB* SNPs and the risk of erosions in early French RA patients. The challenge will now be to identify and characterize the causal variants of the *IL2RB* gene and their functional consequences to better understand the role played by *IL2RB* in the structural damages which characterize the severity of RA.

**Disclosure of interest**

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.



### Funding statement

An unrestricted grant from Merck Sharp and Dohme (MSD) was allocated for the first 5 years for the ESPOIR cohort study. Two additional grants from INSERM were obtained to support part of the biological database. The French Society of Rheumatology, Abbott and Wyeth also supported the ESPOIR cohort study.

### Acknowledgments

The authors thank Nathalie Rincheval for expert monitoring and data management; S Martin who did all the central dosages of CRP, IgA and IgM rheumatoid factor and anti-CCP antibodies; the Biological Resources Centre (Paris-Bichat, J Benessiano) which was in charge of centralising and managing biological data collection; and all the investigators who recruited and followed the patients (F. Berenbaum, Paris-Saint Antoine; M.C. Boissier, Paris-Bobigny; A Cantagrel, Toulouse; B. Combe, Montpellier; M. Dougados, Paris-Cochin; P. Fardelonne and P. Boumier, Amiens; B. Fautrel and P. Bourgeois, Paris-La Pitié; R.M. Flipo, Lille; P. Goupille, Tours; F. Liote, Paris-Lariboisière; X. Le Loet and O. Vittecoq, Rouen; X. Mariette, Paris Bicêtre; O. Meyer, Paris Bichat; A. Saraux, Brest; T. Schaefferbeke, Bordeaux; J. Sibilia, Strasbourg).

### References

- [1] Dadoun S, Zeboulon-Ktorza N, Combescure C, et al. Mortality in rheumatoid arthritis over the last fifty years: systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine* 2013;80:29–33.
- [2] MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 2000;43:30–7.
- [3] van der Helm-van Mil AH, Kern M, Gregersen PK, et al. Variation in radiologic joint destruction in rheumatoid arthritis differs between monozygotic and dizygotic twins and pairs of unrelated patients. *Arthritis Rheum* 2006;54:2028–30.
- [4] Karlson EW, Chang SC, Cui J, et al. Gene-environment interaction between HLA-DRB1 shared epitope and heavy cigarette smoking in predicting incident rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010;69:54–60.
- [5] Fakhfakh Karray E, Chalbi H, Ben Dhifallah I, et al. Association study of TRAF1-C5 polymorphism with susceptibility to rheumatoid arthritis in Tunisian population. *Joint Bone Spine* 2012;79:331–2.
- [6] Plant D, Flynn E, Mbarek H, et al. Investigation of potential non-HLA rheumatoid arthritis susceptibility loci in a European cohort increases the evidence for nine markers. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1548–53.
- [7] Farragher TM, Lunt M, Plant D, et al. Benefit of early treatment in inflammatory polyarthritis patients with anti-cyclic citrullinated peptide antibodies versus those without antibodies. *Arthritis Care Res* 2010;62:664–75.
- [8] van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, et al. Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R949–58.
- [9] Ceccarelli F, Perricone C, Fabris M, et al. Transforming growth factor beta 869C/T and interleukin 6-174G/C polymorphisms relate to the severity and progression of bone-erosive damage detected by ultrasound in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R111.
- [10] Ohmura K, Terao C, Maruya E, et al. Anti-citrullinated peptide antibody-negative RA is a genetically distinct subset: a definitive study using only bone-erosive ACPA-negative rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:2298–304.
- [11] Gesbert F, Sauvonnnet N, Dautry-Varsat A. Clathrin-Independent endocytosis and signalling of interleukin 2 receptors IL-2R endocytosis and signalling. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004;286:119–48.
- [12] Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2006;24:657–79.
- [13] Sadlack B, Merz H, Schorle H, et al. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 1993;75:253–61.
- [14] Suzuki H, Kundig TM, Furlonger C, et al. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* 1995;268:1472–6.
- [15] Willerford DM, Chen J, Ferry JA, et al. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 1995;3:521–30.
- [16] Sharfe N, Dadi HK, Shahar M, et al. Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3168–71.
- [17] Wang J, Wicker LS, Santamaria P. IL-2 and its high-affinity receptor: genetic control of immunoregulation and autoimmunity. *Semin Immunol* 2009;21:363–71.
- [18] Oh S, Rankin AL, Caton AJ. CD4+CD25+ regulatory T-cells in autoimmune arthritis. *Immunol Rev* 2010;233:97–111.
- [19] Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007;447:661–78.
- [20] Kurreeman FA, Daha NA, Chang M, et al. Association of IL2RA and IL2RB with rheumatoid arthritis: a replication study in a Dutch population. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1789–90.
- [21] Yang HC, Liang YJ, Chung CM, et al. Genome-wide gene-based association study. *BMC Proc* 2009;3:S135.
- [22] Barton A, Thomson W, Ke X, et al. Rheumatoid arthritis susceptibility loci at chromosomes 10p15, 12q13 and 22q13. *Nat Genet* 2008;40:1156–9.
- [23] Prasad P, Kumar A, Gupta R, et al. Caucasian and Asian specific rheumatoid arthritis risk loci reveal limited replication and apparent allelic heterogeneity in north Indians. *PloS One* 2012;7:e31584.
- [24] Combe B, Benessiano J, Berenbaum F, et al. The ESPOIR cohort: a ten-year follow-up of early arthritis in France: methodology and baseline characteristics of the 813 included patients. *Joint Bone Spine* 2007;74:440–5.
- [25] Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315–24.
- [26] Cantagrel A, Navaux F, Loubet-Lescoulié P, et al. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:1093–100.
- [27] Constantin A, Dieude P, Lauwers-Cances V, et al. Tumor necrosis factor receptor II gene polymorphism and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:742–7.
- [28] Constantin A, Navaux F, Lauwers-Cances V, et al. Interferon gamma gene polymorphism and susceptibility to, and severity of, rheumatoid arthritis. *Lancet* 2001;358:2051–2.
- [29] Prevo ML, van't Hof MA, Kuper HH, et al. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:44–8.
- [30] van der Heijde D. How to read radiographs according to the Sharp/van der Heijde method. *J Rheumatol* 1999;26:743–5.
- [31] Lukas C, Combe B, Ravaud P, et al. Favorable effect of very early disease-modifying anti-rheumatic drug treatment on radiographic progression in early inflammatory arthritis: Data from the Etude et Suivi des polyarthrites indifférenciées récentes (study and followup of early undifferentiated polyarthritis). *Arthritis Rheum* 2011;63:1804–11.
- [32] Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet* 2010;42:508–14.

**4. Annexe 4 : New classification of *HLA-DRB1* alleles based on acid-base properties of the amino acids located at position 70 and 71: impact on ACPA status or structural progression in a cohort of early RA (ESPOIR cohort).**

# **New classification of *HLA-DRB1* alleles based on acid-base properties of the amino acids located at position 70 and 71.**

## **Impact on ACPA status or structural progression in a cohort of early RA (ESPOIR cohort).**

Ruysen-Witrand Adeline<sup>1,2,3</sup>, Gourraud Pierre-Antoine<sup>4</sup>, Nigon Delphine<sup>3</sup>, Lukas Cédric<sup>5</sup>, Miceli-Richard Corinne<sup>6</sup>, Jamard Bénédicte<sup>3</sup>, Cambon-Thomsen Anne<sup>1,2</sup>, Cantagrel Alain<sup>3,7</sup>, Dieudé Philippe<sup>8</sup>, Constantin Arnaud<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>: UMR 1027, INSERM, UMR 1027, University Paul Sabatier Toulouse III, Rheumatology Center, Purpan Hospital, Toulouse, France, adruysen@hotmail.com

<sup>2</sup>: Department of Neurology, University of California San Francisco School of Medicine; pierreantoine.gourraud@ucsf.edu

<sup>3</sup>:Rheumatology Center, Purpan Hospital, Toulouse, France; nigon.d@chu-toulouse.fr

<sup>4</sup>: Rheumatology Department, Lapeyronie Teaching Hospital, Montpellier, France; cedriclukas@voila.fr

<sup>5</sup>: Rheumatology Department, Kremlin Bicetre Hospital, Kremlin Bicetre, France; corinne.miceli@bct.aphp.fr

<sup>6</sup>:Rheumatology Center, Purpan Hospital, Toulouse, France; jamard\_b@yahoo.fr

<sup>7</sup>: UMR 1027, INSERM, UMR 1027, University Paul Sabatier Toulouse III, Toulouse, France; [anne.cambon-thomsen@univ-tlse3.fr](mailto:anne.cambon-thomsen@univ-tlse3.fr)

<sup>8</sup>: JE2510, University Paul Sabatier Toulouse III, Rheumatology Center, Purpan Hospital, Toulouse, France; [cantagrel.a@chu-toulouse.fr](mailto:cantagrel.a@chu-toulouse.fr)

<sup>9</sup>: Rheumatology Department, Claude Bernard-Bichat Teaching Hospital, Paris VII University, Paris, France, INSERM U699 ; [philippe.dieude@bch.aphp.fr](mailto:philippe.dieude@bch.aphp.fr)

<sup>10</sup>: UMR 1027, INSERM, UMR 1027, University Paul Sabatier Toulouse III, Rheumatology Center, Purpan Hospital, Toulouse, France; [constant@cict.fr](mailto:constant@cict.fr)

**Corresponding author:**

Adeline Ruysen-Witrand, Rheumatology Center, Purpan Teaching Hospital, 1 place du Dr Baylac, 31059 Toulouse Cedex 9, France. Tel: (+33)561 776 977. Fax: (+33)561 777 375. E-mail: [adruysen@hotmail.com](mailto:adruysen@hotmail.com)

## **Abstract**

**Objective:** To group *HLA-DRB1* alleles based on acid-base properties of amino acids (AA) at position 70 and 71 and analyze their association with the presence of anti-citrullinated peptide antibodies (ACPA) and structural progression in a cohort of early rheumatoid arthritis (RA).

**Methods:** RA patients (N=612) from ESPOIR cohort were genotyped for *HLA-DRB1* alleles. The alleles containing the RAA sequence at position 72-74 were classified into 3 groups according to the AA at position 70 and 71: SB coding basic AA, SA coding acidic AA and SN coding neutral AA. The associations between the different alleles and 1) the ACPA presence and 2) the structural progression were assessed. A logistic regression was performed to evaluate the independent risk of ACPA presence and structural progression of different allele carriage.

**Results:** SB alleles were significantly associated with ACPA presence (OR[95%CI]=2.59[1.60-4.19], p=0.0001) and structural progression, independently of ACPA presence after multivariate analysis (OR[95%CI]=2.20[1.34-3.59], p=0.002). SA alleles were significantly associated with ACPA absence (OR[95%CI]=0.41[0.24-0.68], p=0.0005) and protected against structural progression (OR[95%CI]=0.51[0.28-0.92], p=0.02).

**Conclusion:** This new classification permitted to make a hierarchy of *HLA-DRB1* alleles in terms of association with ACPA presence or structural progression in early RA.

Numerous reports have indicated that rheumatoid arthritis (RA) is associated with *HLA-DRB1* alleles, but their exact role in the pathogenesis is unknown. In 1987, Gregersen et al [1] observed that *HLA-DRB1* alleles reported to be associated with RA share the RAA (arginine, alanine and alanine) amino acid (AA) motif at positions 72–74 of their third hypervariable region, which they hypothesized to act as a functional unit. However, this hypothesis does not fully explain the influence of *HLA-DRB1* alleles on disease susceptibility [2, 3] because the AA at positions 67, 70 and 71 also influence RA susceptibility. In terms of RA susceptibility, the alleles that greatly increase the risk encode the following sequences from position 70 to 74 of the molecule: Q-K-RAA (*HLA-DRB1*\*04:01), Q-R-RAA (*HLA-DRB1*\*01:01, \*04:04, \*04:05, \*04:08) and R-R-RAA (*HLA-DRB1*\*10:01) which are commonly called the *Shared Epitope (SE)* in most of the *HLA-DRB1* classifications; Q and K stand for glutamine and lysine, respectively. The *SE* also increases the risk of presence of anti-citrullinated peptide antibodies (ACPA) and structural progression independently of ACPA presence [4, 5]. Furthermore, several studies identified some *HLA-DRB1* alleles as protecting against RA susceptibility or ACPA production. Thus, the protective effects of specific *HLA-DRB1* alleles [6, 7] or the presence of an isoleucine (I) at position 67 or an aspartic acid (D) at position 70 or the D-E-RAA motif at positions 70-74 have been suggested [8-10]. Several classifications have been proposed to classify the non *SE* alleles into protective or neutral alleles for the risk of RA susceptibility or ACPA production [11].

Considering that *HLA-DRB1*\**SE* alleles are characterized by basic (and consequently positively charged) AA at position 70 and 71 and that the D-E-RAA motif is characterized by acidic (and hence negatively charged AA) at positions 70 and 71, we hypothesized that the acid-base properties and the charges of the AA at position 70 and 71 may have an impact on the interactions between *HLA-DRB1* molecules and citrullinated peptides. This may explain the differences observed between the different *HLA-DRB1* alleles in terms of ACPA

production. Thus, we have proposed an alternative classification of *HLA-DRB1* alleles based on the acid-base properties of the AA at position 70 and 71 combining the different classifications previously developed. We investigated the association between this alternative classification of *HLA-DRB1* alleles and the ACPA status or the structural progression and compared it with the previous *HLA-DRB1* allele classifications in a cohort of early RA.

## **Patients and Methods**

### **Patients**

This work is derived from a large national, multicenter, longitudinal, prospective cohort of 813 French early arthritis patients, the ESPOIR cohort. The characteristics of the cohort have been described previously elsewhere [12]. Briefly, 813 early arthritis patients recruited in 14 centers in France with arthritis duration <6 months and no prior treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) were included between 2002 and 2005. Patients underwent clinical, biological and radiological assessments at baseline and at each subsequent visit.

For the present study, we selected individuals who fulfilled the 2010 ACR/EULAR criteria [13] for RA at baseline with available genotyping data for the *HLA-DRB1*.

Local institutional review boards approved the study, and written informed consent was obtained from all subjects in the study [12].

### **Clinical data**

All patients had a clinical examination at baseline and at 1 year. Demographic characteristics including age, gender, duration of symptoms, disease activity established on the Disease Activity Score on 28 joints (DAS 28) [14] were collected at baseline, as well as current treatment with disease modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) and mean dose of glucocorticoids after one year of follow-up.

### **Immunological variables**



Anti-CCP2 antibodies (ACPA, ELISA, DiaSorin, France, Positive>50U/mL) were quantified at baseline in a central lab.

## **Radiographs**

Baseline and 1-year radiographs of the hands, wrists, and feet were read and assessed using the Sharp/van der Heijde score [15]. The reader was blinded with regard to patient identity, characteristics and treatment. The results were expressed in a total Sharp score (mTSS). In order to evaluate the reproducibility of the radiographic scoring, radiographs from 30 patients representing the entire range of status and change were scored blindly once more by the same reader [16]. Intraclass correlation coefficients were 0.99 for both radiographic status and radiographic change scores. The smallest detectable change was calculated at 1.0 mTSS unit.

## ***HLA-DRB1* genotyping, allele classification and allele pooling**

Genomic DNA was extracted from EDTA anti-coagulated peripheral blood, using a standard proteinase K digestion and phenol–chloroform extraction method. *HLA-DRB1* 4 digit typing and subtyping were performed in a single laboratory (Immunology laboratory, CHU Montpellier, France) by a polymerase chain reaction–based method, using a panel of sequence-specific oligonucleotide probes.

The *HLA-DRB1* alleles were first divided into two groups according to the presence or absence of the RAA sequence at positions 72–74 and were denoted S and X alleles respectively, according to a previous classification proposed by Tezenas du Montcel and colleagues [17]. The S alleles were subsequently divided into 3 groups according to the acid-base properties of the AA at positions 70 and 71: the basic group (SB) included either 2 basic

AA with 2 positive charges at position 70 and 71 (R-R-RAA motif) or 1 basic AA at position 71 and 1 neutral AA at position 70 (Q-R-RAA and Q-K-RAA motifs); the acidic group (SA) included 2 AA with a negative charge (D-E-RAA motif); the neutral group (SN) included either one acidic AA at position 70 and one basic AA at position 71 (D-K-RAA or D-R-RAA motifs) or 2 neutral AA at position 70 and 71 (Q-A-RAA).

Previous reports identified an association between the AA at position 67 and the risk of RA [8]. However, the AA at position 67 can be a leucine, an isoleucine or a phenylalanine, 3 AA without charge and with a very similar structure. We thus assumed that the polymorphism at this region could not influence the acid-base properties of HLA-DRB1 molecules and decided to not include this polymorphic region in this alternative classification.

This new classification and its relationships with previous ones are summarized in table 1.

## **Statistical analysis**

### *Association of HLA-DRB1 alleles with ACPA status*

The associations between *HLA-DRB1* allele carriage and the presence of ACPA were tested by comparing the distribution of ACPA positive patients among carriers and non carriers of each *HLA-DRB1* allele pooled in the acid-base classification using a chi-squared test or a Fisher exact test when appropriate. Odds ratios with 95% confidence intervals were also calculated. The same analyses were also performed with previous *HLA-DRB1* allele classifications of De Vries, Matthey and Tezenas du Montcel [8, 9, 17].

The independent effect of SB, SN and SA/X allele carriage was then investigated. To avoid any potential bias introduced by the presence of the second allele in an allele effect analysis, we performed a multivariate analysis through a logistic regression including the presence of SA, SN and SB allele assessed as independent predictors of ACPA positivity, using a dominant model and other clinical data associated with the risk of ACPA positivity with a p value <0.1 by univariate tests. These analyses were repeated with other *HLA-DRB1* allele classifications [8, 9, 17].

### *Association of HLA-DRB1 alleles with structural progression*

Due to the non-Gaussian distribution of the total radiographic damage score, and to the low structural progression of patients within one year, the median and the 10<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> percentile range (p10-p90) were used to describe its distribution. A Kruskal-Wallis global test was used to compare the global distribution between the different alleles and, if significant, a Wilcoxon's rank sum (Mann-Whitney) test was used for the statistical comparison of mTSS progression among the different alleles. Boxplots were used to describe the progression

within one year of the mTSS according to allele carriage. These analyses were repeated with the different *HLA-DRB1* allele classifications.

The independent effect of the alleles of each classification was investigated using a logistic regression as described before for the association with ACPA positivity. To adjust the risk of progression for the potential confounding factor, (presence of ACPA), a multivariate analysis was performed using a logistic regression, a backward procedure was followed where the outcome assessed was a progression of one point of the mTSS within a year. The progression of one point of mTSS within one year was chosen because it was the definition of the smallest detectable change (SDC) of the radiographic scoring. The independent predictors assessed were the *HLA-DRB1* status, age, sex, clinical center, smoking habits, symptom duration, ACPA presence, glucocorticoid use at one year, DMARD use at one year. The predictors associated with the annual progression rate in the univariate analysis at  $p < 0.10$  were then included in the multiple variable model.

All analyses were performed using the SAS 9.3 software.

## Results

### Characteristics of RA patients

Among the 813 early arthritis patients included in the ESPOIR cohort, 641 fulfilled the 2010 ACR/EULAR criteria for RA at baseline and genotyping data for *HLA-DRB1* were available in 612 RA patients who constituted the sample of patients used to assess the association between *HLA-DRB1* and ACPA presence. Among these patients, 516 had sets of hand and foot radiographs at baseline and at 1 year follow-up available. This sample of 516 patients was used to assess the association between *HLA-DRB1* and structural progression within one year. The characteristics of this sample of 516 patients were similar to the characteristics of the whole sample of 612 patients (Table 2).

### Relationship between *HLA-DRB1* allele classifications and ACPA status (Table 3).

The different classifications of *HLA-DRB1* alleles were first compared in terms of association with ACPA presence in univariate analysis.

To look for an independent association between *HLA-DRB1* alleles and ACPA presence, a multivariate model was constructed explaining the risk of ACPA presence through a logistic regression including the alleles of the different classifications.

When applying the acid-base classification, *HLA-DRB1*\*SB allele carriage was positively associated with ACPA positivity, while *HLA-DRB1*\*SA allele carriage was negatively associated with ACPA positivity and *HLA-DRB1*\*SN allele carriage was not associated with ACPA positivity, allowing a hierarchical classification of *HLA-DRB1* alleles carrying the RAA sequence at position 72-74.

According to de Vries classification or Matthey classification, HLA-DRB1\*SE+ alleles were positively associated with ACPA positivity, while other allele groups were negatively associated with ACPA positivity, allowing a binary classification of *HLA-DRB1* alleles, but no difference neither between P and N alleles nor D70+ D70- alleles.

Using du Montcel classification, only S1 and X groups were significantly and independently associated with ACPA absence whereas the S3D group was not significantly associated with ACPA presence.

### **Relationship between *HLA-DRB1* allele classifications and structural progression**

To investigate the relationship between the different *HLA-DRB1* allele classifications and structural progression we first compared the distribution of the mTSS progression among RA patients carrying the different *HLA-DRB1* alleles pooled according to the different classifications (Figure 1).

The structural progression scores were higher when patients carried *HLA-DRB1* SE or SB alleles or S2 and S3P alleles of du Montcel's classification compared to other alleles ( $p < 0.0001$  with Kruskal-Wallis test).

When applying the acid-base classification, the X allele group had statistically higher scores of progression compared to SN and SA groups ( $p = 0.02$  with Kruskal-Wallis test) while the SN allele group tended to have a higher rate of progression compared to the SA group ( $p = 0.06$  with a Wilcoxon test).

When studying the other classifications, no clear hierarchy of non *SE* alleles could be identified with Matthey's and De Vries' classification. There was no significant difference of the medians of progression between non *SE* alleles. Furthermore, the medians of progression of X, S1 and S3D of du Montcel's classification were not statistically different even if a trend was observed for higher scores of progression in X allele group ( $p=0.06$  with Kruskal-Wallis test).

To investigate the relationship between the different *HLA-DRB1* allele classifications and structural progression we secondly compared the risk of progression of at least one point of mTSS within the first year (the SDD of radiographic scoring) among RA patients carrying the different *HLA-DRB1* alleles pooled according to the different classifications (Figure 1).

To assess the independent association of *HLA-DRB1* alleles with the risk of progression, a multivariate model was conducted explaining the risk of progression of at least one point of mTSS within the first year (the SDD of radiographic scoring) through a logistic regression including the alleles of the different classification and the clinical data that could be associated with structural progression. The results of the association in univariate analyses and after logistic regression are presented in table 4.

In acid-base classification, SB alleles were significantly associated with the risk of progression while SA alleles were significantly associated with protection against progression, even after adjustment of SE presence and ACPA presence.

In Matthey's allele classification, SE alleles were significantly associated with progression, while D70+ alleles were significantly associated with a protection against progression. P and

N alleles of de Vries' classification were not independently associated with the risk of progression. In du Montcel's classification, only S1 and S3D alleles were associated with the protection against structural progression when adjusting for other variables such as ACPA presence.

The other variables significantly and independently associated with progression in the multivariate model were: age (OR [95%CI]=1.03 [1.01-1.06], p=0.001), gender (female gender: OR [95%CI]=0.42 [0.24-0.72], p=0.002), smoking (OR [95%CI]=0.48 [0.29-0.77], p=0.002) and ACPA presence (OR [95%CI]=4.07 [2.48-6.65], p<0.0001).



## Discussion

In a cohort of early RA patients we have investigated the association between an alternative classification of *HLA-DRB1* alleles, based on acid-basic properties of the AA at position 70 and 71, and the ACPA status or structural progression. This classification allowed a hierarchical classification of *HLA-DRB1* alleles carrying the RAA sequence at position 72-74. While *HLA-DRB1*\*SB alleles were positively associated with ACPA positivity and structural progression, *HLA-DRB1*\*SA alleles were negatively associated with these parameters and *HLA-DRB1*\*SN alleles were neither associated with ACPA positivity nor structural progression.

The classification of *HLA-DRB1* alleles carrying the RAA sequence at position 72-74, according to the acid-base properties and charges of the AA at positions 70 and 71, allowed a hierarchization of the association between *HLA-DRB1* alleles and the risk of ACPA positivity in early RA patients, ranging from a susceptibility effect for *HLA-DRB1*\*SB alleles, to a neutral effect for *HLA-DRB1*\*SN alleles and a protective effect for *HLA-DRB1*\*SA alleles.

We confirmed the association of *HLA-DRB1* alleles encoding D-E-RAA motif, classified in SA group for acidic AA at position 70 and 71, with protection against ACPA, independently of SE presence. The classifications of Matthey and de Vries could not reveal a hierarchy of *HLA-DRB1* non SE alleles since both D70+, D70- alleles of Matthey's classification and P and N alleles of de Vries's classification were significantly associated with ACPA absence. A hierarchy between SB, SN then SA alleles was observed with acid-base classification: while SB allele carriage was associated with ACPA presence, the association between ACPA presence and SN allele carriage was not significant and there was a significant protection against ACPA presence with SA allele carriage.

In this study, we found an independent effect of *HLA-DRB1 SE* towards an increased risk of structural progression, consistent with previous recent studies [4, 5]. But we also found an independent protective effect against structural progression of alleles coding for D-E-RAA sequence pooled in SA group and alleles encoding a D at position 70 according to Matthey's classification. To our knowledge, this is the first study reporting an independent association between protection against progression and these alleles.

ACPA positive and ACPA negative RA are 2 distinct diseases with different outcomes. The association between *HLA-DRB1 SE* alleles and ACPA positive RA is stronger than with ACPA negative RA. Previous studies indicated that *HLA-DRB1 SE* alleles are primarily involved in shaping the ACPA response, presumably by facilitating T cell help to ACPA-producing B cells. Furthermore, alleles encoding the D-E-RAA sequence at position 70-74 have been clearly shown to be associated with protection against ACPA positive RA.[10] Thus, the polymorphic region of AA at position 70 and 71 may play an important role in the interaction between HLA-DRB1 molecules and peptides presented to T cell receptors. As the mechanism of citrullination implies the transformation of an arginine (positive charge) into a citrulline (no charge), some positively charged AA in the HLA-DRB1 molecule might hinder the presentation of arginine containing peptides and facilitate the presentation of citrullinated peptides. Thus one explanation of the association between *SE* alleles and ACPA production might be the positive charges of the basic AA at position 70 and 71.

Freed and colleagues [18] showed that the carriage of the *HLA-DRB1* epitope LA<sup>67,74</sup> [-D<sup>70</sup>] was the main susceptibility factor for RA, whereas carriage of an aspartic acid at position 70 was the main protective factor against RA . Their model suggested that Q70 and K71 would form hydrogen bonds with the peptide playing a critical role in peptide binding. In contrast, the presence of D70 and E71 results in a more acidic pocket and would repeal the weakly negative citrulline dipoles and greatly reduce peptide binding. Thus, we assume that in HLA-

DRB1 molecules expressing a RAA sequence at position 72-74, a sequence of neutral-basic or basic-basic AA at position 70-71 (SB alleles) could increase the peptide binding and might contribute to ACPA production, whereas a combination of acid-basic AA at position 70-71 (SN alleles) neutralizes this effect.

A classification based on the charges was previously proposed by Reviron et al in 2001 [19]. Our classification differs from Reviron's classification which did not pool the alleles encoding another sequence than RAA at position 72-74 in a separate group and did not take into account the acid-base and charge properties of the AA at position 71.

## **Conclusion**

The alternative classification of *HLA-DRB1* alleles developed in our study and the pooling of *HLA-DRB1* alleles carrying the RAA sequence at position 72-74 into SB, SN, SA, according to acid-base properties of AA at positions 70 and 71, allows a hierarchical classification of *HLA-DRB1* alleles in terms of ACPA production and structural progression in early RA. Although other markers than *HLA-DR* are of importance in RA genetics [20] the fine understanding of the HLA-DR association remains an important challenge to solve and this work contributes to this aim.

## **Acknowledgments and Funding**

### *Acknowledgments*

The authors thank Nathalie Rincheval for expert monitoring and data management; S Martin who did all the central dosages of CRP, IgA and IgM rheumatoid factor and anti-CCP antibodies; the Biological Resources Centre (Paris-Bichat, J Benessiano) which was in charge of centralising and managing biological data collection; and all the investigators who recruited and followed the patients (F Berenbaum, Paris-Saint Antoine; M C Boissier, Paris-Bobigny; A Cantagrel, Toulouse; B Combe, Montpellier; M Dougados, Paris-Cochin; P Fardelonne and P Boumier, Amiens; B Fautrel and P Bourgeois, Paris-La Pitié; R M Flipo, Lille; Ph Goupille, Tours; F Liote, Paris-Lariboisière; X Le Loet and O Vittecoq, Rouen; X Mariette, Paris Bicêtre; O Meyer, Paris Bichat; A Saraux, Brest; Th Schaefferbeke, Bordeaux; J Sibia, Strasbourg).

The authors thank Jane Miller who helped them in the preparation of the manuscript.

### *Funding*

An unrestricted grant from Merck Sharp and Dohme (MSD) was allocated for the first 5 years of the ESPOIR cohort. Two additional grants from INSERM were obtained to support part of the biological database. The French Society of Rheumatology, Abbott and Wyeth also supported the ESPOIR cohort study.

### **Conflict of interests statement**

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.



## References

- 1 Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987;30(11):1205-13.
- 2 Genin E, Babron MC, McDermott MF, et al. Modelling the major histocompatibility complex susceptibility to RA using the MASC method. *Genet Epidemiol* 1998;15(4):419-30.
- 3 Meyer JM, Han J, Singh R, Moxley G. Sex influences on the penetrance of HLA shared-epitope genotypes for rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 1996;58(2):371-83.
- 4 de Rooy DP, van der Linden MP, Knevel R, Huizinga TW, van der Helm-van Mil AH. Predicting arthritis outcomes--what can be learned from the Leiden Early Arthritis Clinic? *Rheumatology (Oxford)* 2011;50(1):93-100.
- 5 Karlson EW, Chibnik LB, Cui J, et al. Associations between human leukocyte antigen, PTPN22, CTLA4 genotypes and rheumatoid arthritis phenotypes of autoantibody status, age at diagnosis and erosions in a large cohort study. *Ann Rheum Dis* 2008;67(3):358-63.
- 6 Gibert M, Balandraud N, Touinssi M, Mercier P, Roudier J, Reviron D. Functional categorization of HLA-DRB1 alleles in rheumatoid arthritis: the protective effect. *Hum Immunol* 2003;64(10):930-5.
- 7 Larsen BA, Alderdice CA, Hawkins D, Martin JR, Mitchell DM, Sheridan DP. Protective HLA-DR phenotypes in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1989;16(4):455-8.
- 8 de Vries N, Tijssen H, van Riel PL, van de Putte LB. Reshaping the shared epitope hypothesis: HLA-associated risk for rheumatoid arthritis is encoded by amino acid substitutions at positions 67-74 of the HLA-DRB1 molecule. *Arthritis Rheum* 2002;46(4):921-8.

- 9 Matthey DL, Dawes PT, Gonzalez-Gay MA, et al. HLA-DRB1 alleles encoding an aspartic acid at position 70 protect against development of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2001;28(2):232-9.
- 10 van der Woude D, Lie BA, Lundstrom E, et al. Protection against anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis is predominantly associated with HLA-DRB1\*1301: a meta-analysis of HLA-DRB1 associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in four European populations. *Arthritis Rheum* 2010;62(5):1236-45.
- 11 Mackie SL, Taylor JC, Martin SG, et al. A spectrum of susceptibility to rheumatoid arthritis within HLA-DRB1: stratification by autoantibody status in a large UK population. *Genes and immunity* 2012;13(2):120-8.
- 12 Combe B, Benessiano J, Berenbaum F, et al. The ESPOIR cohort: a ten-year follow-up of early arthritis in France: methodology and baseline characteristics of the 813 included patients. *Joint Bone Spine* 2007;74(5):440-5.
- 13 Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010;62(9):2569-81.
- 14 Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38(1):44-8.
- 15 van der Heijde D. How to read radiographs according to the Sharp/van der Heijde method. *J Rheumatol* 1999;26(3):743-5.
- 16 Lukas C, Combe B, Ravaud P, Sibilia J, Landew R, van der Heijde D. Favorable effect of very early disease-modifying antirheumatic drug treatment on radiographic progression in

early inflammatory arthritis: Data from the Etude et Suivi des polyarthrites indifferenciees recentes (study and followup of early undifferentiated polyarthritis). *Arthritis Rheum* 2011;63(7):1804-11.

17 du Montcel ST, Michou L, Petit-Teixeira E, et al. New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Rheum* 2005;52(4):1063-8.

18 Freed BM, Schuyler RP, Aubrey MT. Association of the HLA-DRB1 epitope LA(67, 74) with rheumatoid arthritis and citrullinated vimentin binding. *Arthritis Rheum* 2011;63(12):3733-9.

19 Reviron D, Perdriger A, Toussiroit E, et al. Influence of shared epitope-negative HLA-DRB1 alleles on genetic susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001;44(3):535-40.

20 Ruysen-Witrand A, Constantin A, Cambon-Thomsen A, Thomsen M. New insights into the genetics of immune responses in rheumatoid arthritis. *Tissue antigens* 2012;80(2):105-18.



Table 1: Acid-base classification of *HLA-DRB1* alleles

<i>HLA-DRB1</i> alleles	AA sequence at positions 67,70–74	Tezenas' classification	Mattey's classification	De Vries' classification	Acid-base classification
*01:03, *04:02, *11:02; *13:01, *13:02, *13:04	I-D-E-RAA	S1	D70+	P	SA
*11:03,	F-D-E-RAA	S1	D70+	N	SA
*13:23; *15	I-Q-A-RAA	S1	D70-	P	SN
*13:03	I-D-K-RAA	S2	D70+	P	SN
*04:01: *04:13	L-Q-K-RAA	S2	SE	SE	SB
*12:01, *13:06, *13:25, *14:22,	I-D-R-RAA	S3D	D70+	P	SN
*11:01, *11:04, *13:05; *16	F-D-R-RAA	S3D	D70+	N	SN
*01:01, *01:02, *04:04, *04:05, *04:08 *14:02	L-Q-R-RAA	S3P	SE	SE	SB
*10:01	L-R-R-RAA	S3P	SE	SE	SB
*03	L-Q-K-RGR	X	D70-	N	X
*04:03, *04:06; *04:07, *04:11; *04:59	L-Q-R-RAE	X	D70-	N	X
*07:01	I-D-R-RGQ	X	D70+	P	X
*08	F-D-R-RAL	X	D70+	N	X
*09:01	F-R-R-RAE	X	D70-	N	X
*14:01; *14:04	L-R-R-RAE	X	D70-	N	X

RA : rheumatoid arthritis; AA: amino acid; D for aspartic acid, Q for glutamine, R for arginine, A for alanine, E for glutamic acid, K for lysine, G for glycine, L for leucine, I for

isoleucine; F for phenylalanine; ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies; SB: allele group containing basic amino acids at positions 70 and 71; SN: allele group containing neutral or both acidic and basic AA at positions 70 and 71; SA: allele group containing acidic AA at position 70 and 71; X: allele group not containing RAA sequence at position 72-74; N: allele group not containing an isoleucine at position 67; P: allele group containing an isoleucine at position 67; SE: Shared Epitope; D70-: allele group not containing an aspartic acid at position 70; D70+: allele group containing an aspartic acid at position 70.

Table 2: Demographic and disease characteristics of RA patients at baseline and at one year

	All RA patients (n=612)	RA patients with available radiographs (n=516)
<b>Baseline characteristics</b>		
Age, years, med [IQR]	50.3 [40.0-57.1]	50.6 [40.6-57.1]
Gender, female, n (%)	476 (78)	403 (78)
Smoking status, n (%)	289 (47)	244 (47)
Symptom duration, months, med [IQR]	4.9 [3.0-7.1]	5 [3.1-7.4]
DAS 28, med [IQR]	5.37 [4.56-6.30]	5.35 [4.56-6.19]
RF +, n (%)	349 (57)	301 (58)
ACPA +, n (%)	297 (49)	260 (50)
Total Sharp Score, med [p10-p90]	-	3 [0-15]
<b>One-year characteristics</b>		
DAS 28, med [IQR]	3.09 [2.20-4.13]	3.10 [2.20-4.13]
Total Sharp Score, med [p10-p90]	-	4 [0-18]
Structural progression, n (%)	-	152 (29)
Steroids, n (%)	228 (37)	211 (41)
DMARD, n (%)	441 (72)	411 (85)

RA: Rheumatoid arthritis; med: median; IQR: interquartile range; n: number of patients,

DAS28: disease Activity Score on 28 joints; RF+: rheumatoid Factor presence; ACPA+: anti-citrullinated peptide antibody presence; DMARD: disease modifying anti-rheumatic drugs; p10-p90: 10<sup>th</sup> to 90<sup>th</sup> range; structural progression: variation of at least 1 point of the Total Sharp Score within 1 year according to the smallest detectable change of the radiographic scoring.

Table 3: Comparison of the association of the *HLA-DRB1* alleles and ACPA presence between the classifications of *HLA-DRB1* alleles

	Univariate analysis		Adjusted analysis	
	OR [95%CI]	p value	OR <sub>a</sub> [95%CI]	p value
<b>Acid-base</b>				
SB	4.42 [3.10-6.33]	<0.0001	2.59 [1.60-4.19]	0.0001
SN	0.88 [0.63-1.22]	0.4	0.79 [0.48-1.30]	0.4
SA	0.39 [0.26-0.59]	<0.0001	0.41 [0.24-0.68]	0.0005
X	0.37 [0.27-0.53]	<0.0001	0.38 [0.24-0.61]	<0.0001
<b>De Vries</b>				
SE	4.42 [3.10-6.33]	<0.0001	2.90 [1.87-4.48]	<0.0001
N	0.36 [0.26-0.51]	<0.0001	0.48 [0.30-0.75]	0.001
P	0.61 [0.44-0.85]	0.003	0.67 [0.43-1.03]	0.07
<b>Mattey</b>				
SE	4.42 [3.10-6.33]	<0.0001	2.96 [1.96-4.46]	<0.0001
D70-	0.46 [0.32-0.65]	<0.0001	0.52 [0.33-0.82]	0.004
D70+	0.51 [0.36-0.71]	<0.0001	0.50 [0.31-0.79]	0.003
<b>Du Montcel</b>				
S1	0.53 [0.38-0.75]	0.0001	0.92 [0.55-1.53]	0.7
S2	3.42 [2.29-5.14]	<0.0001	3.25 [1.93-5.46]	<0.0001
S3D	0.96 [0.66-1.40]	0.8	0.98 [0.58-1.65]	0.9
S3P	2.67 [1.89-3.80]	<0.0001	2.54 [1.52-4.23]	0.0003
X	0.37 [0.27-0.53]	<0.0001	0.53 [0.33-0.84]	0.007

OR=Odds ratios; 95%CI: 95% confidence interval, SB: allele group containing basic AA at position 70 and 71, SN: allele group containing neutral or acid and basic AA at position 70

and 71, SA: allele group containing acid AA at position 70 and 71; X: allele group not containing RAA sequence at position 72-74; N: allele group not containing an isoleucine at position 67; P: allele group containing an isoleucine at position 67; SE: Shared Epitope; D70-: allele group not containing an aspartic acid at position 70; D70+: allele group containing an aspartic acid at position 70

Table 4: Comparison of the association of *HLA-DRB1* alleles and structural progression according to the classification of *HLA-DRB1* alleles

	Univariate analysis		Adjusted analysis with clinical data	
	OR [95%CI]	p value	OR <sub>a</sub> [95%CI]	p value
<b>Acid-base</b>				
SB	3.73 [2.39-5.91]	<0.0001	2.20 [1.34-3.59]	0.002
SN	0.64 [0.42-0.95]	0.02	0.62 [0.33-1.14]	0.1
SA	0.36 [0.20-0.60]	<0.0001	0.51 [0.28-0.92]	0.02
X	0.78 [0.52-1.16]	0.2	0.93 [0.51-1.68]	0.8
<b>De Vries</b>				
SE	3.73 [2.39-5.91]	<0.0001	2.49 [1.54-4.04]	0.0002
N	0.60 [0.40-0.89]	0.008	0.93 [0.52-1.65]	0.8
P	0.55 [0.37-0.83]	0.002	0.53 [0.38-1.17]	0.2
<b>Mattey</b>				
SE	3.73 [2.39-5.91]	<0.0001	1.97 [1.18-3.30]	0.009
D70-	0.88 [0.59-1.32]	0.5	1.15 [0.65-2.03]	0.6
D70+	0.44 [0.29-0.66]	<0.0001	0.53 [0.32-0.85]	0.009
<b>Du Montcel</b>				
S1	0.43 [0.28-0.65]	<0.0001	0.56 [0.34-0.92]	0.02
S2	1.92 [1.24-2.95]	0.002	0.94 [0.49-1.78]	0.8
S3D	0.53 [0.32-0.87]	0.008	0.42 [0.24-0.74]	0.002
S3P	2.45 [1.63-3.67]	<0.0001	0.87 [0.44-1.67]	0.7
X	0.78 [0.52-1.16]	0.2	0.75 [0.41-1.38]	0.4

OR=Odds ratios; 95%CI: 95% confidence interval, SB: allele group containing basic AA at position 70 and 71, SN: allele group containing neutral or acidic and basic AA at position 70 and 71, SA: allele group containing acidic AA at position 70 and 71; X: allele group not containing RAA sequence at position 72-74; N: allele group not containing an isoleucine at position 67; P: allele group containing an isoleucine at position 67; SE: Shared Epitope; D70-: allele group not containing an aspartic acid at position 70; D70+: allele group containing an aspartic acid at position 70

Figure 1: Comparison of the distribution of the Total Sharp Score progression according to the different classifications of *HLA-DRB1* alleles

Figure 1a: Acid-base classification

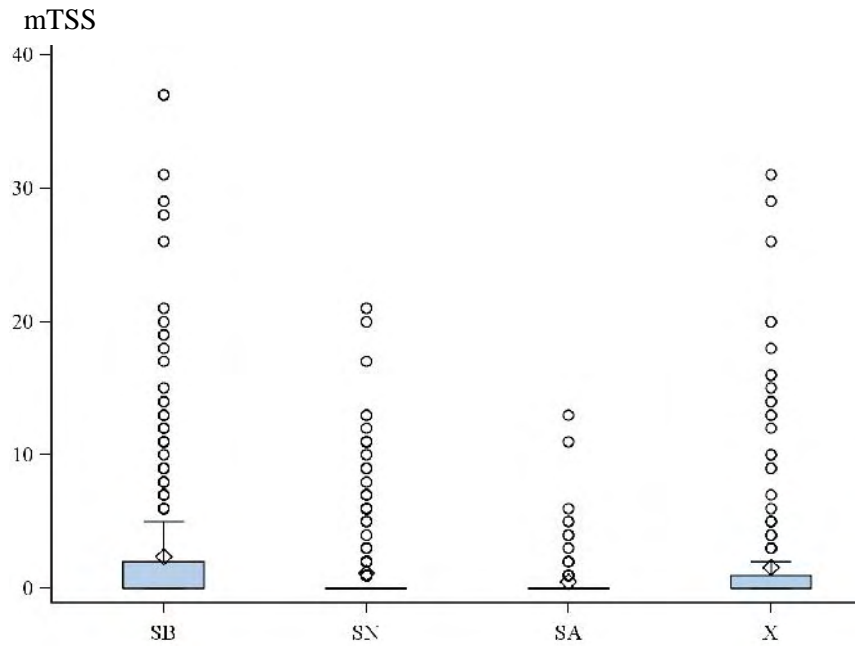


Figure 1b: Matthey's classification

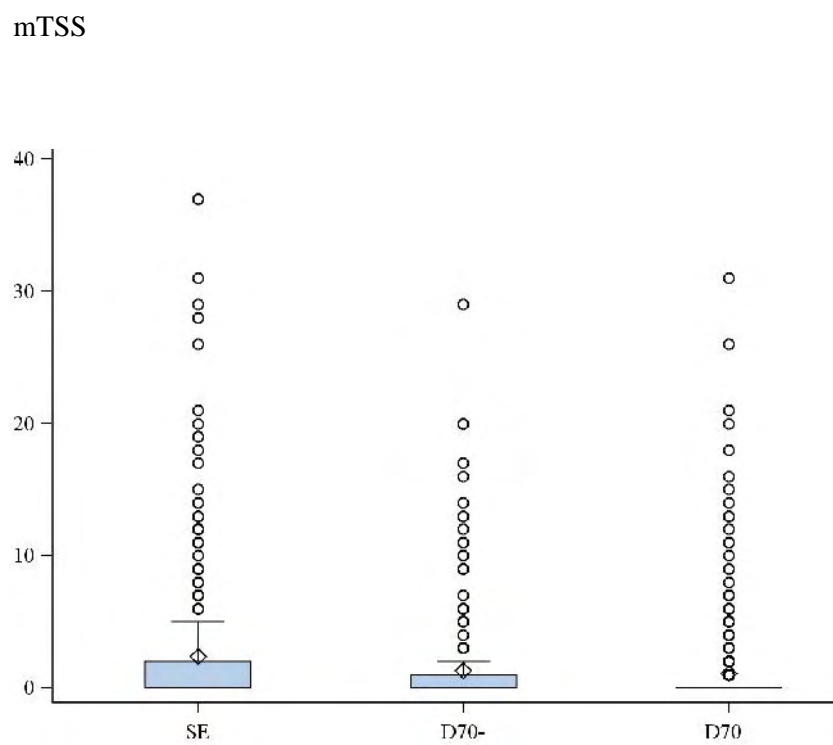




Figure 1c: De Vries' classification

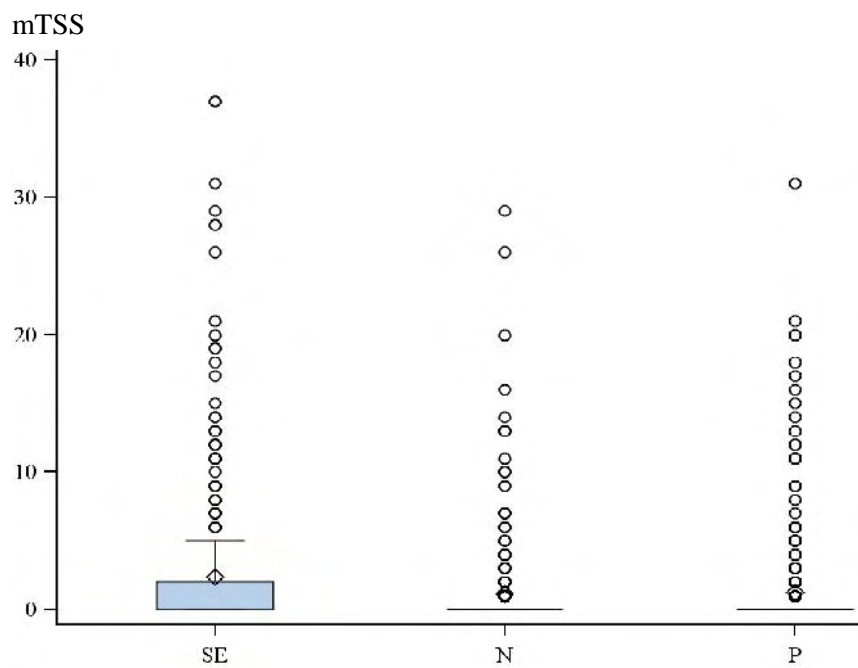
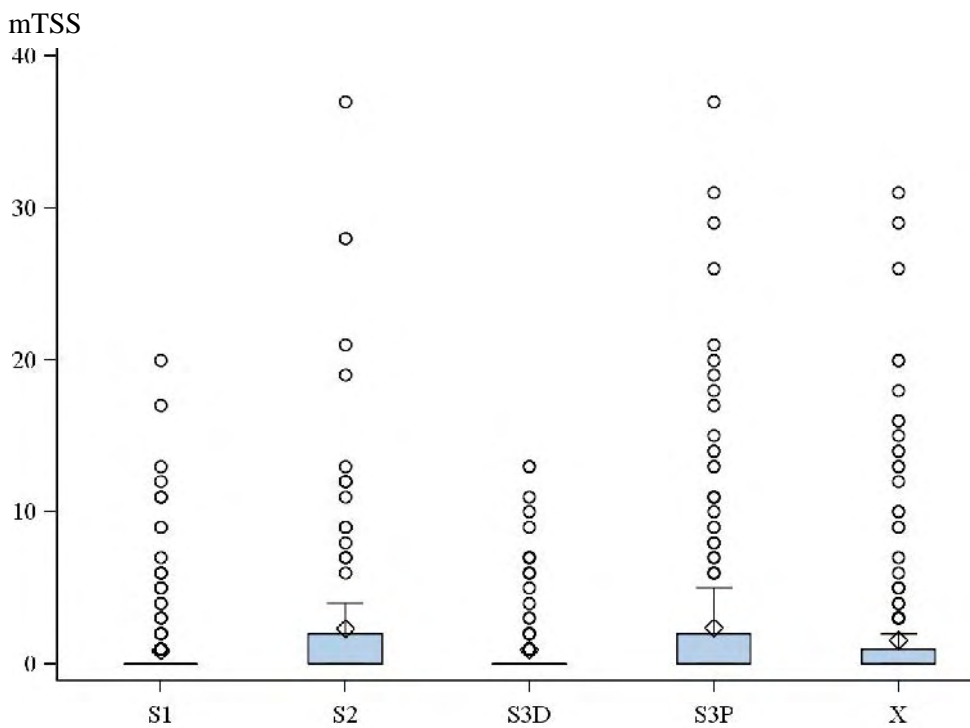


Figure 1d: du Montcel's classification



mTSS: variation of the modified Total Sharp Score within the first year; SB: allele group containing basic amino acids at position 70 and 71, SN: allele group containing neutral or acidic and basic amino acids at position 70 and 71, SA: allele group containing acidic amino

acids at position 70 and 71; X: allele group not containing RAA sequence at position 72-74;  
N: allele group not containing an isoleucine at position 67; P: allele group containing an  
isoleucine at position 67; SE: Shared Epitope; D70-: allele group not containing an aspartic  
acid at position 70; D70+: allele group containing an aspartic acid at position 70

**5. Annexe 5 : Fc $\gamma$  Receptor Type IIIA polymorphism influences treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab**

## EXTENDED REPORT

# Fc $\gamma$ receptor type IIIA polymorphism influences treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab

A Ruysen-Witrand,<sup>1</sup> S Rouanet,<sup>2</sup> B Combe,<sup>3</sup> M Dougados,<sup>4</sup> X Le Loët,<sup>5</sup> J Sibilia,<sup>6</sup> J Tebib,<sup>7</sup> X Mariette,<sup>8</sup> A Constantin<sup>1</sup>

► Additional tables are published online only. To view the files please visit the journal online (<http://ard.bmj.com/content/71/6.toc>).

<sup>1</sup>Department of Rheumatology, Purpan Teaching Hospital, Toulouse, UMR U1027 INSERM, UMR 1027, Université Paul Sabatier, Toulouse III, France

<sup>2</sup>Roche, Paris, France

<sup>3</sup>Immuno-Rheumatology, Lapeyronie University Hospital, Montpellier I University, Montpellier, France

<sup>4</sup>Paris-Descartes University, UPRES-EA 4058,

Rheumatology B, Cochin Hospital, France

<sup>5</sup>Department of Rheumatology, Rouen University Hospital & INSERM U905, Rouen, France

<sup>6</sup>Rheumatology, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>7</sup>Rheumatology, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite, France

<sup>8</sup>Rhumatologie, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, INSERM U1012, Université Paris-Sud 11, Le Kremlin Bicêtre, France

## Correspondence to

A Ruysen-Witrand, Centre de Rhumatologie, Hôpital Purpan, 1 place du Dr Baylac, 31059 Toulouse Cedex 09, France; [adruysen@hotmail.com](mailto:adruysen@hotmail.com)

Received 24 June 2011

Accepted 29 November 2011

Published Online First

25 February 2012

## ABSTRACT

**Objective** To assess the association between a single nucleotide polymorphism in the gene of *FCGR3A* and the response to treatment with rituximab (RTX) in rheumatoid arthritis (RA).

**Methods** SMART is a randomised open trial assessing two strategies of re-treatment in patients responding to 1 g infusion of RTX with methotrexate on days 1 and 15 after failure, intolerance or contraindication to tumour necrosis factor (TNF) blockers. Among the 224 patients included, 111 could be genotyped and were included in an ancillary study of SMART. Univariate and multivariate analyses adjusted on disease activity score on 28 joints were performed to assess whether *FCGR3A*-158V/F polymorphism was associated with European League Against Rheumatism response at week 24.

**Results** Among the 111 patients, 90 (81%) were responders of whom 30 (27%) were good responders. V allele carriage was significantly associated with a higher response rate (91% of responders vs 70%, OR 4.6 (95% CI 1.5 to 13.6),  $p=0.006$ ). These results were also confirmed in rheumatoid factor-positive patients (93% vs 74%,  $p=0.025$ ). In multivariate analysis, V allele carriage was independently associated with response to RTX (OR 3.8 (95% CI 1.2 to 11.7),  $p=0.023$ ).

**Conclusion** The 158V/F polymorphism of *FCGR3A* seems to influence the response to RTX in patients with RA after failure, intolerance or contraindication to TNF blockers.

The anti-CD20 monoclonal antibody that targets B cells, rituximab (RTX), is a chimeric immunoglobulin G1 (IgG1) monoclonal antibody and is an effective treatment of rheumatoid arthritis (RA) that is refractory to tumour necrosis factor (TNF) blockers.<sup>1</sup>

The non-synonymous 158 V/F polymorphism in *FCGR3A* (rs396991), which substitutes a valine (V) for a phenylalanine (F) at amino acid position 158, is known to affect both Fc $\gamma$ RIIIa (CD16) expression, binding of RTX to Fc $\gamma$ RIIIa and RTX-mediated cytotoxicity.

Some studies have reported that patients carrying the *FCGR3A*-VV genotype had a higher biological and clinical response to RTX in the treatment of B lymphoproliferative malignancies<sup>2,3</sup> and in cryoglobulinaemia associated with hepatitis C virus.<sup>4</sup>

The present study was carried out to evaluate the influence of the *FCGR3* -158V/F polymorphism on the therapeutic response to RTX in a cohort of

patients with RA who experienced an inadequate response, intolerance or with contraindication to TNF blockers.

## METHODS

### Patients

The design of the study has already been described in detail elsewhere.<sup>5</sup> Further details are given in the online supplement.

Briefly, a total of 224 patients with RA were included in the SMART study. This study is a 2-year national multicentre randomised open-label study evaluating the efficacy and tolerability of two doses of RTX for re-treatment after one course of RTX (1000 mg on days 1 and 15).

Each patient received a stable dose of methotrexate (MTX) ( $\geq 10$  mg/week for at least 4 weeks) and had experienced an inadequate response or intolerance to TNF blockers or TNF blockers were contraindicated.

### Study protocol

All patients received one course of RTX. Treatment efficacy was evaluated 24 weeks after the RTX first infusion according to the European League Against Rheumatism (EULAR) response.<sup>6</sup>

### Data collected

Serum B cells markers such as rheumatoid factor (RF) and anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) antibodies were collected before the first RTX infusion.

Genotyping of the *FCGR3A*-158V/F polymorphism was performed in patients who gave specific additional consent for this ancillary study of SMART.

### Statistical analysis

Response rates were compared across *FCGR3A* genotypes using the  $\chi^2$  test or the Fisher exact test, when appropriate. The relationship between the EULAR response at 24 weeks and explanatory variables was analysed by logistic regression. These variables were selected by univariate logistic regression among *FCGR3A*-158 V/F polymorphism carriage, patients and disease characteristics and B cell activation markers at baseline. Significant variables after univariate regression ( $p<0.15$ ) were entered into a stepwise multivariate model adjusted to the disease activity score on 28 joints with C reactive protein use (DAS28-CRP). Results are expressed as the OR with 95% CI.

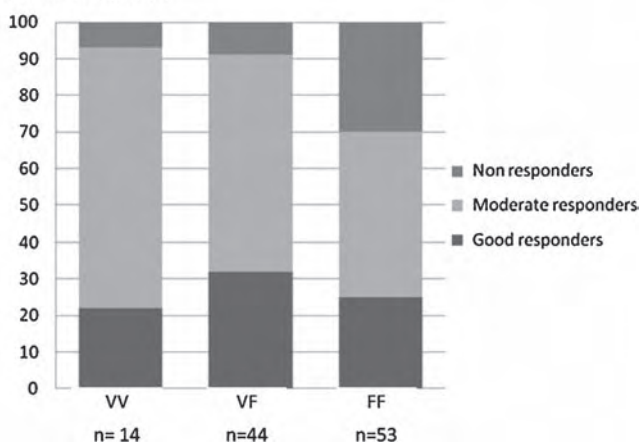
## Clinical and epidemiological research

**Table 1** Baseline characteristics of patients according to *FcγRIIIa* genotype distribution

Patient characteristics	VV, n=14 (13%)	VF, n=44 (39%)	FF, n=53 (48%)	Sample with <i>FCGR3A</i> genotype, n=111
Mean (SD) age (years)	57 (11)	57 (13)	55 (10)	56 (11)
Sex, females, n (%)	11 (79)	35 (80)	42 (80)	88 (79)
Median (IQR) disease duration (years)	16 (12–20)	11 (6–19)	11 (6–21)	12 (6–20)
Rheumatoid factor, n (%)	13 (93)	29 (67)	35 (66)	77 (70)
ACPA, n (%)	11 (79)	36 (84)	42 (79)	89 (81)
Presence of erosions, n (%)	14 (100)	38 (86)	51 (96)	103 (93)
Mean (SD) DAS28-CRP	6.0 (1.1)	5.8 (0.9)	5.5 (0.9)	5.7 (0.9)
Prednisone, n (%)	12 (86)	33 (75)	38 (72)	83 (75)
Median (IQR) methotrexate dosage (mg/week)	15 (12–15)	15 (10–15)	15 (10–15)	15 (10–15)
Median (IQR) time since last anti-TNF $\alpha$ use (months)	4 (3–17)	3 (2–7)	3 (2–8)	3 (2–8)
Median (IQR) anti-TNF $\alpha$ duration before inclusion in study (months)	20 (13–37)	9 (6–24)	13 (6–36)	13 (6–35)

ACPA, anti-citrullinated peptide antibodies; DAS28-CRP, disease activity score on 28 joints with C reactive protein use; F, phenylalanine; TNF  $\alpha$ , tumour necrosis factor  $\alpha$ ; V, valine.

Proportion of patients

**Figure 1** EULAR response rate according to *FCGR3A* genotype distribution. V, valine; F, phenylalanine.**RESULTS****Characteristics of the study population**

Of the 224 patients with RA (age  $56 \pm 11$  years, disease duration  $13 \pm 9$  months, 84% women) who received one course of RTX, 209 had an inadequate response to anti-TNF and 16 had a contraindication to TNF blockers. Among these, 109 did not give their consent for the genetic search and four patients could not be genotyped for the *FCGR3A* genotype. Thus, 111 patients were analysed in the present study. The baseline characteristics of these patients according to *FCGR3A* genotypes are shown in table 1.

The *FCGR3A* genotyping was in Hardy–Weinberg equilibrium ( $p=0.314$ ). The demographic characteristics did not differ among the different genotypes except for the subgroup of patients carrying VV genotype who were more often RF-positive in comparison with the FF genotype (93% vs 66%,  $p=0.05$ ).

The patients included in the study had longer disease duration, more active disease and more often erosions ( $p=0.02$ ,  $p=0.03$  and  $p=0.04$ , respectively) in comparison with the patients without available DNA (see table S1 in online supplement).

**EULAR response rates according to *FCGR3A* genotypes**

Twenty-four weeks after the first course of RTX, 90 patients (81%) were responders of whom 30 (27%) were good responders; 10 patients (9%) were in remission according to the EULAR criteria (DAS28 <2.6) and 21 patients (19%) were in low disease activity (DAS28 2.6–3.2). The EULAR response rate 24 weeks after a first course of RTX according to the *FCGR3A* genotype is shown in figure 1.

Ninety-three percent of patients with *FCGR3A*-158 VV genotype and 91% of patients with *FCGR3A*-158 VF experienced a response (good or moderate) to the first course of RTX in comparison with a response rate of 70% in those with FF genotype ( $p=0.096$  and  $p=0.011$ , respectively).

The proportion of good responders did not differ between the three genotypes (21% for VV, 32% for VF and 25% for FF genotypes,  $p>0.43$ ).

**EULAR response rates according to *FCGR3A* alleles**

When performing allele analysis, *FCGR3A*-158 V allele carriage was significantly associated with a higher response rate (91% vs 70%, OR 4.6 (95% CI 1.5 to 13.6),  $p=0.006$ ). These results were not significantly different in RF-positive and RF-negative patients (93% vs 74%, OR 4.5 (95% CI 1.1 to 18.2),  $p=0.025$  in RF-positive patients and 87% vs 61%, OR 4.1 (95% CI 0.7 to 24.2),  $p=0.13$  in RF-negative patients).

Multivariate analysis was performed to investigate whether V allele carriage was an independent factor of response to RTX by logistic regression where the response to RTX was the assessed outcome. Univariate analyses showed that baseline DAS28-CRP >5.1, oral corticosteroid therapy and high serum IgG level (>12.67 g/l) were associated with RTX response ( $p<0.15$ ) and was then included in the model as potential confounding factors beside *FCGR3A*-158 V allele carriage. The results of univariate analysis and the logistic regression are presented in table 2. The final model confirmed that *FCGR3A*-158 V allele carriage increased the chances of response to RTX (OR 3.8 (95% CI 1.2 to 11.7),  $p=0.023$ ).

**DISCUSSION**

Biological disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) have led to remarkable benefits for the treatment of RA in patients with an inadequate response to MTX or to a TNF inhibitor. After failure with a TNF inhibitor, there is evidence for the efficacy of switching to another TNF inhibitor or to another class of biological DMARD such as abatacept, RTX or tocilizumab.<sup>7</sup> Since there are several therapeutic options with no clear differences in efficacy or safety concerns, clinicians need predictive factors for the response to a biological DMARD in an individual patient to make a tailored decision.<sup>8</sup> In the present study we show that *FCGR3A*-158 V allele carriage is an independent factor associated with the response to a first course of RTX in patients who have had an inadequate response or a contraindication to a TNF inhibitor.

This non-synonymous 158 V/F polymorphism in *FCGR3A* gene was previously reported as being associated with response to RTX in patients with non-Hodgkin's lymphomas and in

**Table 2** Univariate and multivariate analysis assessing response to rituximab

	Univariate analysis (OR (95% CI), p value)	Multivariate analysis* (OR (95% CI), p value)
V allele carriage	4.6 (1.5 to 13.6), p=0.006	3.8 (1.2 to 11.7), p=0.023
High serum IgG rate	3.6 (1.1 to 11.5), p=0.030	4.1 (1.2 to 14.7), p=0.029
Positive rheumatoid factor	1.9 (0.7 to 4.9), p=0.210	
Positive ACPA	1.4 (0.4 to 4.3), p=0.563	
No oral cortisone	3.9 (0.8 to 17.9), p=0.081	
DAS28-CRP	3.2 (1.2 to 8.5), p=0.017	

\*Adjusted on baseline DAS28 level.  
ACPA, anti-citrullinated peptide antibodies; DAS28-CRP, disease activity score on 28 joints with C reactive protein use; V, valine.

cryoglobulinaemia associated with hepatitis C virus in whom the homozygous *FCGR3A-158V* genotype was independently associated with clinical and molecular responses to a first course of RTX.<sup>2,4</sup> The relationship between this functional single nucleotide polymorphism of the *FCGR3A* gene and the response to anti-TNF treatment was assessed in patients with RA, with discrepancies in the results.<sup>9–11</sup> Preliminary data from a cohort of 57 patients with RA managed with RTX suggested that patients carrying the *FCGR3A-158VV* genotype had a better response based on American College of Rheumatology criteria than those carrying the *FCGR3A-158VF* or the *FCGR3A-158FF* genotype.<sup>12</sup>

Little is known about the basic mechanisms for the contribution of the *FCGR3A-158V/F* polymorphism to the response to RTX in patients with non-Hodgkin's lymphomas or RA. In these two pathological conditions the response to RTX appears to be better in patients carrying one or two copies of the *FCGR3A-158V* allele. This amino acid residue directly interacts with the lower hinge region of IgG1. The variable response to RTX among *FCGR3A* polymorphic groups is likely to be the result of qualitative differences such as antibody affinity.<sup>2</sup> Furthermore, the variability of response to RTX among *FCGR3A* polymorphic groups may result from quantitative differences by increasing FcγRIIIa expression.<sup>13</sup> Recent work has suggested that low levels of FcγRIIIa/CD16 expression may predict non-response to RTX.<sup>14</sup> Such qualitative and quantitative differences may explain the relationship of the *FCGR3A* genotype to the degree of B cell depletion by RTX observed in the treatment of systemic lupus erythematosus.<sup>15</sup> Thus, quantitative and qualitative changes in FcγRIIIa/CD16 induced by *FCGR3A* genotype could influence B cell depletion and explain these differences in the response to RTX.

Although a previous study of the SMART trial found an association between RF positivity and the response to RTX,<sup>5</sup> RF positivity was not associated with the EULAR response in the present ancillary study. In this sample of 111 patients the difference between patients with and without RF antibodies in terms of the EULAR response was only 11% (84% vs 73% of EULAR response) whereas, in the sample of 208 patients, this difference was about 21% (79% vs 58%). The small difference in this sample can explain the absence of a statistically significant difference. Another explanation could be a selection bias of patients who gave their consent for the genetic study, with a better response rate in the subgroup of RF-negative patients. However, we assume that this selection bias could not influence the *FCGR3A* genotype distribution and its association with the EULAR response.

If the association between *FCGR3A-158V* allele carriage and the response to RTX could be replicated in independent

studies, this pharmacogenetic marker, as well as B cell activation biomarkers,<sup>5</sup> could help clinicians to make a tailored decision in the choice of a biological DMARD in individual patients with RA in respect of personalised medicine.<sup>8</sup>

**Acknowledgments** The authors thank all the SMART investigators: Dr I Azais, Poitiers; Dr J C Balblanc, Belfort; Dr F Berenbaum, Paris; Dr P Bertin, Limoges; Dr M C Boissier, Bobigny; Dr P Bourgeois, Paris; Dr A Cantagrel, Toulouse; Dr P Carli, Toulon; Dr P Y Chouc, Marseille; Dr M Couret, Valence; Dr L Euler-Ziegler, Nice; Dr P Fardellone, Amiens; Dr P Fauquet, Berck/Mer; Dr R M Flipo, Lille; Dr P Gaudin, Echirrolles; Dr J L Grauer, Aix en Provinces; Dr A Heraud, Libourne; Dr P Hilliquin, Corbeil; Dr S Hoang, Vannes; Dr E Houvenagel, Lomme; Dr D Keita, Paris; Dr K Lassoued, Cahors; Dr L Le Dantec, Lievin; Dr J M Le Parc, Boulogne; Dr L Lequen, Pau; Dr F Lioté, Paris; Dr C Marcelli, Caen; Dr O Meyer, Paris; Dr J L Pellegrin, Pessac; Dr A Perdriger, Rennes; Dr G Rajzbaum, Paris; Dr S Redeker, Abbeville; Dr J M Ristori, Clermont-Ferrand; Dr A Sarau, Brest; Dr G Tanguy, La Roche sur Yon; Dr T Thomas, Saint-Priest-en-Jarez; Dr L Zabraniecki, Toulouse, Dr C Zarnitski, Montvilliers, France. The authors also thank Dr Rosemary Jourdan, Dr Nadine Mackenzie (Roche, France) and Dr Jamila Filipecki (previously at Roche).

**Funding** Roche France sponsored the study but was not involved in the interpretation of the data or in the preparation of the manuscript.

**Competing interests** The authors belonging to the scientific committee of the SMART study (ARW, BC, XLL, JT, JSi, MD, XM, AC) received honoraria from Roche (less than \$10 000 each) for this study.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

## REFERENCES

- Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, *et al*. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum* 2006;**54**:2793–806.
- Cartron G, Dacheux L, Salles G, *et al*. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 2002;**99**:754–8.
- Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, *et al*. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of *FCGR3A* polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res* 2004;**64**:4664–9.
- Gragani L, Piluso A, Giannini C, *et al*. Genetic determinants in hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia: role of polymorphic variants of BAFF promoter and Fcγ receptors. *Arthritis Rheum* 2011;**63**:1446–51.
- Sellam J, Hendel-Chavez H, Rouanet S, *et al*. B cell activation biomarkers as predictive factors for the response to rituximab in rheumatoid arthritis: a six-month, national, multicenter, open-label study. *Arthritis Rheum* 2011;**63**:933–8.
- Wells G, Becker JC, Teng J, *et al*. Validation of the 28-joint Disease Activity Score (DAS28) and European League Against Rheumatism response criteria based on C-reactive protein against disease progression in patients with rheumatoid arthritis, and comparison with the DAS28 based on erythrocyte sedimentation rate. *Ann Rheum Dis* 2009;**68**:954–60.
- Nam JL, Winthrop KL, van Vollenhoven RF, *et al*. Current evidence for the management of rheumatoid arthritis with biological disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of RA. *Ann Rheum Dis* 2010;**69**:976–86.
- Isaacs JD, Ferraccioli G. The need for personalised medicine for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2011;**70**:4–7.
- Cañete JD, Suárez B, Hernández MV, *et al*. Influence of variants of Fc gamma receptors IIA and IIIA on the American College of Rheumatology and European League Against Rheumatism responses to anti-tumour necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;**68**:1547–52.
- Kastbom A, Bratt J, Ernestam S, *et al*. Fcγ receptor type IIIA genotype and response to tumor necrosis factor alpha-blocking agents in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;**56**:448–52.
- Tutuncu Z, Kavanaugh A, Zvaifler N, *et al*. Fcγ receptor type IIIA polymorphisms influence treatment outcomes in patients with inflammatory arthritis treated with tumor necrosis factor alpha-blocking agents. *Arthritis Rheum* 2005;**52**:2693–6.
- Quartuccio L, Lombardi S, Fabris M, *et al*. Long-term effects of rituximab in rheumatoid arthritis: clinical, biologic, and pharmacogenetic aspects. *Ann N Y Acad Sci* 2009;**1173**:692–700.
- Hatjiharissi E, Xu L, Santos DD, *et al*. Increased natural killer cell expression of CD16, augmented binding and ADCC activity to rituximab among individuals expressing the Fc{gamma}RIIIa-158 V/V and V/F polymorphism. *Blood* 2007;**110**:2561–4.
- Cooper DL, Martin S, Kozera L, *et al*. Fcγ receptors as determinants of response to B cell depleting therapies in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2011;**70**:70.
- Anolik JH, Campbell D, Felgar RE, *et al*. The relationship of FcγRIIIa genotype to degree of B cell depletion by rituximab in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2003;**48**:455–9.



## **Fc $\gamma$ receptor type IIIA polymorphism influences treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab**

A Ruysen-Witrand, S Rouanet, B Combe, et al.

*Ann Rheum Dis* 2012 71: 875-877 originally published online February 25, 2012

doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200337

---

Updated information and services can be found at:

<http://ard.bmj.com/content/71/6/875.full.html>

---

### **Data Supplement**

*These include:*

*"Web Only Data"*

<http://ard.bmj.com/content/suppl/2012/02/24/annrheumdis-2011-200337.DC1.html>

### **References**

This article cites 15 articles, 7 of which can be accessed free at:

<http://ard.bmj.com/content/71/6/875.full.html#ref-list-1>

### **Email alerting service**

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

---

### **Notes**

---

To request permissions go to:

<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:

<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:

<http://group.bmj.com/subscribe/>

**6. Annexe 6 : Association between -871C>T promoter polymorphism in the B-cell-activating factor gene and the response to rituximab in rheumatoid arthritis patients**



## Original article

doi:10.1093/rheumatology/kes344

# Association between -871C>T promoter polymorphism in the B-cell activating factor gene and the response to rituximab in rheumatoid arthritis patients

Adeline Ruyssen-Witrand<sup>1</sup>, Stéphanie Rouanet<sup>2</sup>, Bernard Combe<sup>3</sup>,  
Maxime Dougados<sup>4</sup>, Xavier Le Loët<sup>5</sup>, Jean Sibia<sup>6</sup>, Jacques Tebib<sup>7</sup>,  
Xavier Mariette<sup>8</sup> and Arnaud Constantin<sup>1</sup>

## Abstract

**Objective.** To determine whether a functional single-nucleotide polymorphism in the B-cell activating factor (*BAFF*) gene correlates with the response to treatment with rituximab (RTX) in RA.

**Methods.** SMART is a randomized open trial (NCT01126541) assessing two strategies of re-treatment in patients responding to 1-g infusion of RTX with MTX on days 1 and 15 after failure, intolerance or contraindication to TNF blockers. Among the 224 patients included, 115 provided informed consent, could be genotyped and were included in an ancillary study of SMART assessing European League Against Rheumatism (EULAR) response rate after the first course of RTX according to *BAFF-871C>T* polymorphism. Baseline clinical factors (patients and disease characteristics) and biologic factors (ESR, CRP, RF, anti-citrullinated peptide antibodies, serum immunoglobulins) were collected. Univariate analyses were performed to assess whether *BAFF-871C>T* polymorphism was associated with EULAR response at week 24. Results with  $P < 0.15$  obtained in univariate analyses were then included in multivariate analysis adjusted on DAS28 level.

**Results.** Ninety-three patients (81%) were responders, of whom 31 (27%) were good responders. CC genotype was significantly associated with a higher response rate [92% of responders vs 64% for TT genotype, odds ratio (OR) = 6.9; 95% CI 1.6, 29.6;  $P = 0.03$ ]. These results were also confirmed in RF-positive patients (96% vs 58%,  $P = 0.006$ ). In multivariate analysis, C allele carriage was independently associated with response to RTX (OR = 4.1; 95% CI 1.3, 12.7;  $P = 0.017$ ).

**Conclusion.** The *BAFF-871C>T* polymorphism seems to influence the response to RTX in RA patients after failure or intolerance to TNF blockers.

**Key words:** rheumatoid arthritis, BAFF, genetic polymorphism, rituximab, clinical response.

<sup>1</sup>UMR1027, INSERM, UMR1027, University Paul Sabatier Toulouse III, Rheumatology Center, Purpan Teaching Hospital, Toulouse, <sup>2</sup>Clinical Operations France, Roche France, Boulogne Billancourt, <sup>3</sup>Immuno-Rheumatology, Lapeyronie University Hospital, Montpellier I University, UMR5535, Montpellier, <sup>4</sup>Paris-Descartes University, UPRES-EA 4058, Rheumatology B, Cochin Hospital, Paris, <sup>5</sup>Department of Rheumatology, Rouen University Hospital and INSERM U905, Rouen, <sup>6</sup>Rheumatology, EA 3432, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Université de Strasbourg, Strasbourg, <sup>7</sup>Rheumatology, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite and <sup>8</sup>Rhumatologie, Hôpital Bicêtre, AP-HP, INSERM U1012, Université Paris-Sud 11, Le Kremlin Bicêtre, France.

Submitted 9 July 2012; revised version accepted 16 October 2012.

Correspondence to: Adeline Ruyssen-Witrand, Centre de Rhumatologie, Hôpital Purpan, 1 place du Dr Baylac, 31059 Toulouse Cedex 09, France. E-mail: adruyssen@hotmail.com

## Introduction

In RA, B cells play critical roles in inducing or maintaining autoimmune inflammation. The anti-CD20 monoclonal antibody that targets B cells, rituximab (RTX), is an effective treatment of RA that is refractory to TNF blockers [1].

B-cell activating factor (BAFF), also known as B lymphocyte stimulator, is a cytokine member of the TNF family secreted predominantly by myeloid cells and plays an important role in B-cell maturation, homeostasis and survival in RA [2].

Since the survival of some autoreactive B-cell clones may be dependent on levels of BAFF that are higher than those required by non-autoreactive cells [3], the up-regulation of BAFF at the mRNA and protein level following B-cell depletion therapy may profoundly affect the re-expansion of autoreactive B cells and the recrudescence of autoimmunity.

The *BAFF-871C>T* polymorphism (rs9514828) is reported to be correlated with serum BAFF level in haematological disorders [4], mixed cryoglobulinaemia associated with HCV [5] or primary SS [6, 7], but not in RA [8, 9].

Based on the hypothesis that leading changes in components of the BAFF/BAFF-R system could be associated with the clinical outcome after RTX treatment, and that *BAFF-871C>T* polymorphism could be implicated in the expression of BAFF, we hypothesized that the *BAFF-871C>T* polymorphism could be implicated in clinical outcome after RTX treatment. With this in mind, we assessed clinical response after a first course of RTX depending on the genotype carriage of the *BAFF-871C>T* polymorphism.

## Patients and methods

### Patients

The design of the study has already been described in detail elsewhere [10]. Briefly, a total of 224 patients who had had RA for at least 6 months and fulfilling the ACR 1987 criteria were included in the SMART study (eSsaï MAbthera sur la dose de Re-Traitement, NCT01126541). This study is a 2-year national multicentric randomized open label study evaluating the efficacy and tolerability of two doses of RTX for re-treatment after one course of RTX (1000 mg on days 1 and 15). Each patient received a stable dose of MTX ( $\geq 10$  mg/week for at least 4 weeks) and had experienced an inadequate response or intolerance to TNF blockers or for whom TNF blockers were contraindicated. The present ancillary study of SMART focused on the first stage of the study where all patients received their first course of RTX, before the randomization into two groups assessing two different doses of re-treatment by RTX.

### Study protocol

All patients received their first course of RTX (1000 mg infusions on days 1 and 15). Treatment efficacy was evaluated 24 weeks after the first RTX infusion according to the European League Against Rheumatism (EULAR) response [11]. This response was used to classify patients as responders (good or moderate) or non-responders and is based on the individual amount of change in DAS28 and the level (low, moderate or high) reached. Briefly, the DAS28 is a composite criterion used to assess disease activity and includes the number of tender joints of 28 joints, the number of swollen joints of 28 joints, global assessment by the patient on a visual analogue scale (0–100 mm) and the CRP level (mg/l). A patient is considered in remission if DAS28 is  $< 2.6$ , as low disease activity if DAS28 is between 2.6 and 3.2, as moderate

activity if DAS28 is between 3.2 and 5.1 and as high activity if DAS28 is  $> 5.1$ . The change in DAS28 and the score reached after treatment is used to classify the patients as good, moderate or non-responders.

This study was approved by the local ethics committee (Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris) and all patients gave their informed consent according to the Declaration of Helsinki.

In this ancillary study we investigated the influence of the *BAFF-871C>T* polymorphism on the therapeutic response to the first course of RTX at 24 weeks, before re-treatment, in patients who gave specific additional consent for this pharmacogenetic study.

### Serum B-cell markers

Serum samples taken before the first RTX infusion were used to measure RF by nephelometry (BN Prospec, Dade Behring, Paris, France) and anti-citrullinated peptide antibodies (ACPAs) by ELISA (DiaSorin, Saluggia, Vercelli, Italy). The cut-off was 15 IU/l for RF and 25 IU/l for anti-CCP antibodies. The serum concentrations of IgG, IgA and IgM were assessed by nephelometry (BN Prospec, Dade Behring). The upper limits of normal were 12.66 g/l for IgG, 2.69 g/l for IgA and 2.09 g/l for IgM. The cut-offs for immunoglobulin levels are based on testing performed previously in 3500 healthy French donors. BAFF was measured at baseline, before the RTX course, by Quantikine ELISA (R&D systems, Lille, France).

### *BAFF-871C>T* genotyping

Whole blood was collected before the first RTX infusion in EDTA, and DNA was extracted by the salting-out method according to standard protocol. Genotyping of rs9514828 was performed using allele-specific kinetic PCR (KBiosciences, Herts, UK) using the KASPar method (accuracy generally  $> 99\%$ , error rate  $< 0.3\%$ ).

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SAS 9.1 software (SAS Institute, Cary, NC, USA). Tests were two-sided and type I error was set at 0.05. Missing data were not replaced. Continuous data are described as mean (s.d.) or median [interquartile range (IQR)]. Baseline characteristics were compared across *BAFF-871C>T* genotypes using parametric (Student's *t*-test or analysis of variance) or non-parametric test (Wilcoxon or Kruskal–Wallis test) for continuous data and  $\chi^2$  test or Fisher's exact test for qualitative variables. Response rates were compared across *BAFF-871C>T* genotypes using the Cochran–Armitage trend test and then the  $\chi^2$  test or Fisher's exact test when appropriate. The relationship between EULAR response at 24 weeks and explanatory variables was analysed by logistic regressions. These variables were selected by univariate logistic regressions among *BAFF-871C>T* polymorphism carriage, patients and disease characteristics and B-cell activation markers at baseline. Significant variables after univariate regressions ( $P < 0.15$ ) were then entered in a step-wise multivariate

model adjusted to the DAS28-CRP. Results are expressed as the odds ratio (OR) with 95% CI.

The association between *BAFF-871C>T* genotypes and serum BAFF level was assessed with variance analysis. The association between *BAFF-871C>T* polymorphism and the risk of serious adverse events was investigated with Fisher's exact test. All the analyses were performed on patients who received one course of RTX and who gave their informed consent to the genetic testing.

## Results

### Characteristics of the study population

Of the 224 RA patients [age 56 (s.d. 11) years, disease duration 13 (s.d. 9) months, 84% of women] who received one course of RTX, 209 had an inadequate response to anti-TNF and 16 had a contraindication to TNF blockers. Among them, 109 did not give their consent for the genetic search. Thus 115 patients could be genotyped and were analysed in the present study.

The frequencies of the genotypes of *BAFF-871C>T* in this population were CC=34%, CT=47% and TT=19% and were comparable to the frequencies of the genotypes of the HapMap database for Caucasians (33, 42 and 25%, respectively). Patients' baseline characteristics according to *BAFF-871C>T* genotypes are presented in Table 1.

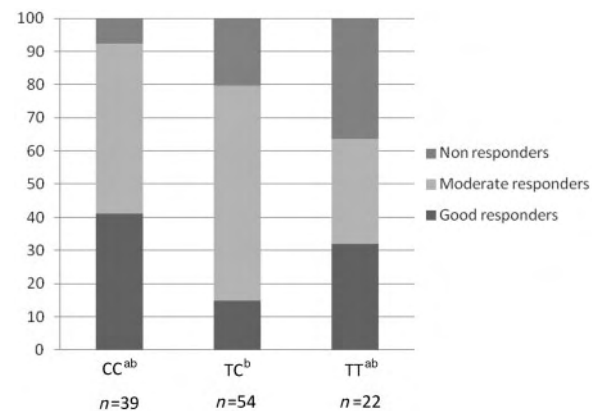
Demographic characteristics did not differ across the different genotypes. Although the proportion of ACPA-positive patients was similar between the different genotypes, patients with the TT genotype were less often RF positive and the duration of TNF blockers before inclusion in SMART was shorter in these patients, but these differences were not statistically significant. The patients included in the study had longer disease duration, more active disease and more often erosions ( $P=0.02$ ,  $P=0.03$  and  $P=0.04$ , respectively) in comparison with the patients who did not give consent for this ancillary study.

### EULAR response rates according to *BAFF-871C>T* genotypes

The *BAFF* genotyping was in Hardy-Weinberg equilibrium ( $P=0.669$ ). Twenty-four weeks after the first course of RTX, 93 patients (81%) were responders, of whom 31 (27%) were good responders. The EULAR response rate 24 weeks after the first course of RTX according to the *BAFF-871C>T* genotypes is presented in Fig. 1.

The analysis showed a significantly better response to RTX across the three genotypes according to the number of copies of the C allele carried (Cochran-Armitage trend test;  $P=0.006$ ) and 92% of patients with *BAFF-871C>T* CC genotype experienced a response (good or moderate) to the first course of RTX, while the response rate was lower in the TT genotype (64% of responders,  $P=0.012$ ).

Fig. 1 EULAR response rate according to *BAFF-871C>T* genotype distribution.



<sup>a</sup>Comparison of responders (good and moderate) between CC and TT genotypes with Fisher's exact test;  $P=0.01$ . <sup>b</sup>Comparison of responders (good and moderate) with Cochran-Armitage trend test across the three genotypes;  $P=0.006$ .

TABLE 1 Patients' baseline characteristics according to *BAFF-871C>T* genotypes distribution

Patient characteristics	CC (n = 39; 34%)	TC (n = 54; 47%)	TT (n = 22; 19%)	Whole sample (n = 115)
Age, mean (s.d.), years	54 (12)	58 (11)	56 (11)	56 (11)
Sex, females, n (%)	29 (74)	44 (82)	19 (86)	92 (80)
Disease duration, median (IQR), years	11.4 (6.9-17.8)	12.0 (6.9-19.7)	13.5 (5.2-23.9)	12.1 (6.9-19.9)
RF, n (%)	28 (74)	40 (74)	12 (55)	80 (70)
ACPA, n (%)	32 (84)	43 (80)	18 (82)	93 (82)
IgG, mean (s.d.), g/l	12.7 (2.5)	11.6 (2.8)	11.5 (3.1)	11.9 (2.8)
Presence of erosions, n (%)	38 (97)	47 (87)	22 (100)	107 (93)
DAS28-CRP, median (IQR)	5.6 (5.0-6.1)	5.7 (5.0-6.4)	5.9 (5.1-6.2)	5.7 (5.0-6.2)
Prednisone (<10 mg/day), n (%)	27 (69)	42 (78)	18 (82)	87 (76)
MTX dosage, median (IQR), mg/week	15 (10-15)	15 (10-15)	14 (10-15)	15 (10-15)
Time since last anti-TNF- $\alpha$ use, median (IQR), months	3 (2-14)	3 (2-5)	3 (2-14)	3 (2-8)
Anti-TNF- $\alpha$ duration before inclusion in SMART, median (IQR), months	16 (6-32)	17 (6-37)	9 (5-20)	14 (6-35)

### EULAR response rates according to *BAFF-871C>T* allele

C allele carriage was significantly associated with EULAR response (OR = 3.2; 95% CI 1.1, 9.2;  $P = 0.0271$ ) in univariate analysis and was then tested in a multivariate analysis to investigate whether it was an independent factor of response to RTX through a logistic regression where the response to RTX was the outcome assessed. Univariate analyses showed that baseline DAS28-CRP > 5.1, oral CS therapy and high serum IgG rate (>12.66 g/l) were associated with RTX response with  $P < 0.15$ . Oral CS therapy, high serum IgG rate and C allele carriage were then included in the model, adjusted on DAS28. The results of the univariate analyses and the logistic regression are presented in Table 2. The final model confirmed that *BAFF-871C>T* C allele carriage independently increased the chances of response to RTX (OR = 4.1; 95% CI 1.3, 12.7;  $P = 0.017$ ).

### Association between *BAFF-871C>T* polymorphism and serum BAFF level

The comparison of baseline serum BAFF level measured at baseline according to the different genotypes showed a trend towards a higher level of serum BAFF for patients carrying the TT genotype compared with CC and CT genotypes [mean serum BAFF level for TT genotype 772.14 pg/μl (s.d. 879.45 pg/μl), mean serum BAFF level for CT and TC genotypes 556.82 pg/μl (s.d. 193.38 pg/μl)], but the difference was not statistically significant ( $P$ -value of the global test = 0.16) (Fig. 2).

### Association between *BAFF-871C>T* polymorphism and serious adverse events

The number of patients with at least one serious adverse event in this study was 18 (16%), of whom 4 (3.5%) had a serious adverse event related to RTX. No association between *BAFF-871C>T* polymorphism and the risk of serious adverse events was observed (Fisher's exact test  $P = 1.0$  for comparison of C allele carriers vs non-carriers).

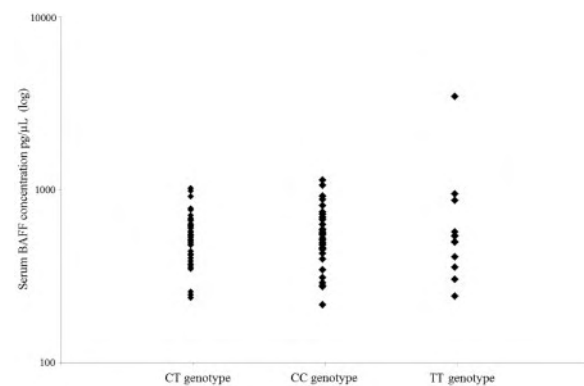
## Discussion

Biologic DMARDs have led to remarkable benefits for the treatment of RA, either in patients who have had inadequate response to MTX or to a TNF inhibitor. After TNF

inhibitor failure, there is evidence for the efficacy of switching to another TNF inhibitor or to another class of biologic DMARD such as abatacept, RTX or tocilizumab [12]. Since there are several therapeutic options, with no clear differences in efficacy or safety concerns, clinicians need predictive factors for the response to a biologic DMARD in an individual patient to make a tailored decision [13]. In the present study we confirm, as has already been reported in a study of 120 RA cases where the CC genotype of *BAFF-871C>T* was associated with a higher response rate to RTX [14], that *BAFF-871C>T* C allele carriage is an independent factor associated with the response to a first course of RTX associated with MTX in patients who have had inadequate response or a contra-indication to a TNF inhibitor.

In this study, no statistically significant correlation between the *BAFF-871C>T* polymorphism and baseline BAFF serum level before RTX course was identified, but a trend of higher BAFF serum level was observed in the TT genotype compared with CC and TC genotypes. Previous studies showed that *BAFF-871C>T* polymorphism was associated with BAFF serum level in familial lymphoproliferative disorders [4], idiopathic thrombocytopenic purpura [15], SS [6, 7] and mixed cryoglobulinaemia

**Fig. 2** Scatter plot of baseline serum BAFF level according to the different genotypes of *BAFF-871C>T* polymorphism.



Serum BAFF level mean (s.d.) for CC genotype, 566 (218); for CT genotype, 550 (175); for TT genotype, 772 (879).

**TABLE 2** Univariate and multivariate analyses assessing RTX response

Variable	Univariate analyses, OR (95% CI), $P$ -value	Multivariate analysis, <sup>a</sup> OR (95% CI), $P$ -value
C allele carriage	3.2 (1.1, 9.1), 0.027	4.1 (1.3, 12.7), 0.017
High serum IgG rate	3.6 (1.1, 11.5), 0.030	5.4 (1.5, 19.9), 0.011
Positive RF	1.9 (0.7, 4.9), 0.210	
Positive ACPA	1.4 (0.4, 4.3), 0.563	
Oral cortisone	0.3 (0.0, 1.3), 0.081	
DAS28-CRP > 5.1	3.2 (1.2, 8.5), 0.017	

<sup>a</sup>Adjusted on baseline DAS28 level. V: valine.

associated with HCV virus [5]. However, such an association was not identified in two studies involving RA [8, 9]. This discrepancy may be due to much higher serum BAFF levels in SS or haematological diseases. However, after B-cell depletion therapy, where BAFF/BAFF-R components are implicated, we could hypothesize that such a polymorphism could play a role in BAFF expression and in B-cell depletion and/or return, with a lower BAFF increase after B-cell depletion and delayed reconstitution or decreased survival of autoreactive B cells, explaining such differences in clinical outcome.

In the *BAFF* gene, located on Chs13 (13q32-q34), the position *\_871* corresponds to the binding site of transcription factor myeloid zinc finger protein (MZF1), which was reported to be preferentially expressed in differentiating myeloid cells, the prominent source of BAFF [16]. Thus it is possible that this single-nucleotide polymorphism may change the binding affinity of MZF1, and hence BAFF expression.

Although a previous study of the SMART trial demonstrated an association between RF or ACPA presence and the response to RTX [10], the RF positivity was not associated with EULAR response in the present ancillary study. In this sample of 115 patients, the difference between patients with and without RF antibodies in terms of EULAR response was only 11% (84% vs 73% of EULAR response, respectively), whereas in the sample of 208 patients, this difference was ~21% (79% vs 58%, respectively). The smaller difference in this sample can explain the absence of a statistically significant difference. Another explanation could be a selection bias of patients who gave their consent for the genetic study with a better response rate in the subgroup of RF-negative patients. However, we assume that this selection bias did not influence the *BAFF-871C>T* genotype distribution and its association with EULAR response.

If the association between *BAFF-871C>T* C allele carriage and the response to RTX could be replicated in independent studies, this pharmacogenetic marker, as well as B-cell activation biomarkers, could help clinicians to make a tailored decision in the choice of a biologic DMARD in an individual RA patient in the perspective of personalized medicine.

#### Rheumatology key messages

- *BAFF-871C>T* polymorphism influences the outcome after RTX in RA with inadequate response to anti-TNF.
- There was no association between *BAFF-871C>T* polymorphism and BAFF serum level in RA.

## Acknowledgements

We thank all the SMART investigators: Dr I. Azais, Poitiers; Dr J. C. Balblanc, Belfort; Dr F. Berenbaum, Paris; Dr P. Bertin, Limoges; Dr M.-C. Boissier, Bobigny; Dr P. Bourgeois, Paris; Dr A. Cantagrel, Toulouse; Dr P. Carli, Toulon; Dr P.-Y. Chouc, Marseille; Dr M. Couret, Valence;

Dr L. Euler-Ziegler, Nice; Dr P. Fardellone, Amiens; Dr P. Fauquert, Berck/Mer; Dr R.-M. Flipo, Lille; Dr P. Gaudin, Echirolles; Dr J.-L. Grauer, Aix en Provinces; Dr A. Heraud, Libourne; Dr P. Hilliquin, Corbeil; Dr S. Hoang, Vannes; Dr E. Houvenagel, Lomme; Dr D. Keita, Paris; Dr K. Lassoued, Cahors; Dr L. Le Dantec, Lievin; Dr J.-M. Le Parc, Boulogne; Dr L. Lequen, Pau; Dr F. Lioté, Paris; Dr C. Marcelli, Caen; Dr O. Meyer, Paris; Dr J.-L. Pellegrin, Pessac; Dr A. Perdriger, Rennes; Dr G. Rajzbaum, Paris; Dr S. Redeker, Abbeville; Dr J.-M. Ristori, Clermont-Ferrand; Dr A. Saraux, Brest; Dr G. Tanguy, La Roche sur Yon; Dr T. Thomas, Saint-Priest-en-Jarez; Dr L. Zabraniecki, Toulouse; Dr C. Zarnitski, Montvilliers; Dr Rosemary Jourdan and Dr Nadine Mackenzie (Roche, France) and Dr Jamila Filipecki (previously at Roche).

**Funding:** This work was supported by Roche France, but Roche was not involved in the interpretation of the data or in the preparation of the manuscript.

**Disclosure statement:** S.R. is a Roche employee. M.D. has participated at symposia and advisory boards organized by Roche. His department has also received grants from Roche in order to conduct clinical trials. X.M. received honoraria and research grants from Roche. B.C. is a consultant for and has received honoraria from Roche. J.S. has received honoraria <\$2000 for expert intervention from Roche, Abbott, Bristol Myers Squibb, Pfizer, Merck, UCB and Novartis. A.R.-W. has received task honoraria from Roche France for writing this manuscript. All other authors have declared no conflicts of interest.

## References

- 1 Cohen SB, Emery P, Greenwald MW *et al*. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum* 2006;54:2793-806.
- 2 Nakajima K, Itoh K, Nagatani K *et al*. Expression of BAFF and BAFF-R in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2007;36:365-72.
- 3 Thien M, Phan TG, Gardam S *et al*. Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity* 2004;20:785-98.
- 4 Novak AJ, Grote DM, Ziesmer SC *et al*. Elevated serum B-lymphocyte stimulator levels in patients with familial lymphoproliferative disorders. *J Clin Oncol* 2006;24: 983-7.
- 5 Gagnani L, Piluso A, Giannini C *et al*. Genetic determinants in hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia: role of polymorphic variants of BAFF promoter and Fcγ receptors. *Arthritis Rheum* 2011;63:1446-51.
- 6 Gottenberg JE, Sellam J, Ittah M *et al*. No evidence for an association between the -871 T/C promoter polymorphism in the B-cell-activating factor gene and primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R30.

- 7 Nossent JC, Lester S, Zahra D, Mackay CR, Rischmueller M. Polymorphism in the 5' regulatory region of the B-lymphocyte activating factor gene is associated with the Ro/La autoantibody response and serum BAFF levels in primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology* 2008;47:1311-6.
- 8 Gottenberg JE, Miceli-Richard C, Ducot B *et al.* Markers of B-lymphocyte activation are elevated in patients with early rheumatoid arthritis and correlated with disease activity in the ESPOIR cohort. *Arthritis Res Ther* 2009;11: R114.
- 9 Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, Hashimoto H, Tokunaga K. Presence of four major haplotypes in human BCMA gene: lack of association with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2001; 2:276-9.
- 10 Sellam J, Hendel-Chavez H, Rouanet S *et al.* B cell activation biomarkers as predictive factors for the response to rituximab in rheumatoid arthritis: a six-month, national, multicenter, open-label study. *Arthritis Rheum* 2011;63: 933-8.
- 11 van Gestel AM, Haagsma CJ, van Riel PL. Validation of rheumatoid arthritis improvement criteria that include simplified joint counts. *Arthritis Rheum* 1998;41: 1845-50.
- 12 Nam JL, Winthrop KL, van Vollenhoven RF *et al.* Current evidence for the management of rheumatoid arthritis with biological disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of RA. *Ann Rheum Dis* 2010;69:976-86.
- 13 Isaacs JD, Ferraccioli G. The need for personalised medicine for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2011;70: 4-7.
- 14 Fabris M, Quartuccio L, Saracco M *et al.* BLYS promoter polymorphism and response to rituximab in rheumatoid arthritis (RA) patients positive or negative for the rheumatoid factor. *Arthritis Rheum* 2009;60:1678 (abstract).
- 15 Emmerich F, Bal G, Barakat A *et al.* High-level serum B-cell activating factor and promoter polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2007;136:309-14.
- 16 Nardelli B, Belvedere O, Roschke V *et al.* Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood* 2001;97:198-204.

## LISTE DES ABREVIATIONS

AA : acide aminé

ACPA : anticorps anti-peptides citrullinés

ACR : American College of Rheumatology

AMM: autorisation de mise sur le marché

BAFF ou BLyS : B cell Activating Factor: facteur activateur des lymphocytes B

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CRP : Protéine C Réactive

DAS28 : Disease Activity Score on 28 joints

DMARDs : Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs

EIQ: Espace inter Quartile

ESPOIR: Etude et Suivi des Polyarthrites Indifférenciées Récentes

EULAR : EUropean League Against Rheumatisms

Fc $\gamma$ R : récepteur au fragment Fc des immunoglobulines

FR: Facteurs Rhumatoïdes

GWAS : Genome Wide Association Study

HAQ : Health Assessment Questionnaire

HLA : Human Leucocyt Antigens

*HLA-DRB1SE+* : Alleles du gène de *HLA-DRB1* codant pour l'Epitope Partagé

IL : Interleukine

INF- $\gamma$  : Interféron gamma

M-CSF : Macrophage-Colony Stimulating Factor

MMP: métallo-protéases

mESS : Score de Sharp Erosion modifié par Van der Heijde

mNSS : Score de Sharp pincement modifié par Van der Heijde

mTSS : score de Sharp Total modifié par van der Heijde

NAD : nombre d'articulations douloureuses

NAG : nombre d'articulations gonflées

NIMA: Non-inherited maternal antigens

OR : Odds Ratios

PAD : Peptidyl-Arginine Deaminase

PADI4 : Peptidyl-Arginine Deaminase type 4

PCR : Polymerase Chain Reaction

PG: Prostaglandines

PR : Polyarthrite Rhumatoïde

PTPN22: protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22

RANK : receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B

RANKL : receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand

RMP: Ranguel Midi-Pyrenees

SDD: Smallest Detectable Difference

TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosing Factor alpha

VS : Vitesse de sédimentation



## BIBLIOGRAPHIE

1. Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2006;36(3):182-8. Epub 2006/10/19.
2. Neovius M, Simard JF, Askling J. Nationwide prevalence of rheumatoid arthritis and penetration of disease-modifying drugs in Sweden. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70(4):624-9. Epub 2010/12/15.
3. Dadoun S, Zeboulon-Ktorza N, Combescure C, Elhai M, Rozenberg S, Gossec L, et al. Mortality in rheumatoid arthritis over the last fifty years: Systematic review and meta-analysis. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 2012. Epub 2012/03/31.
4. Atzeni F, Antivalle M, Pallavicini FB, Caporali R, Bazzani C, Gorla R, et al. Predicting response to anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis patients. *Autoimmunity reviews*. 2009;8(5):431-7. Epub 2009/02/13.
5. Saevarsdottir S, Wallin H, Seddighzadeh M, Ernestam S, Geborek P, Petersson IF, et al. Predictors of response to methotrexate in early DMARD naive rheumatoid arthritis: results from the initial open-label phase of the SWEFOT trial. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70(3):469-75. Epub 2010/12/15.
6. Ahlmen M, Svensson B, Albertsson K, Forslind K, Hafstrom I. Influence of gender on assessments of disease activity and function in early rheumatoid arthritis in relation to radiographic joint damage. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(1):230-3. Epub 2009/01/23.
7. de Rooy DP, van der Linden MP, Knevel R, Huizinga TW, van der Helm-van Mil AH. Predicting arthritis outcomes--what can be learned from the Leiden Early Arthritis Clinic? *Rheumatology (Oxford, England)*. 2011;50(1):93-100. Epub 2010/07/20.
8. Jawaheer D, Maranian P, Park G, Lahiff M, Amjadi SS, Paulus HE. Disease progression and treatment responses in a prospective DMARD-naive seropositive early rheumatoid arthritis cohort: does gender matter? *The Journal of rheumatology*. 2010;37(12):2475-85. Epub 2010/10/05.
9. Gabbay E, Tarala R, Will R, Carroll G, Adler B, Cameron D, et al. Interstitial lung disease in recent onset rheumatoid arthritis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;156(2 Pt 1):528-35. Epub 1997/08/01.
10. Shidara K, Hoshi D, Inoue E, Yamada T, Nakajima A, Taniguchi A, et al. Incidence of and risk factors for interstitial pneumonia in patients with rheumatoid arthritis in a large Japanese observational cohort, IORRA. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*. 2010;20(3):280-6. Epub 2010/03/11.
11. Nakajima A, Inoue E, Tanaka E, Singh G, Sato E, Hoshi D, et al. Mortality and cause of death in Japanese patients with rheumatoid arthritis based on a large observational cohort, IORRA. *Scandinavian journal of rheumatology*. 2010;39(5):360-7. Epub 2010/05/19.
12. Anderson ST. Mortality in rheumatoid arthritis: do age and gender make a difference? *Seminars in arthritis and rheumatism*. 1996;25(5):291-6. Epub 1996/04/01.
13. Gonzalez A, Maradit Kremers H, Crowson CS, Ballman KV, Roger VL, Jacobsen SJ, et al. Do cardiovascular risk factors confer the same risk for cardiovascular outcomes in rheumatoid arthritis patients as in non-rheumatoid arthritis patients? *Annals of the rheumatic diseases*. 2008;67(1):64-9. Epub 2007/05/23.
14. Merlino LA, Cerhan JR, Criswell LA, Mikuls TR, Saag KG. Estrogen and other female reproductive risk factors are not strongly associated with the development of rheumatoid arthritis in elderly women. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2003;33(2):72-82. Epub 2003/11/20.

15. Pikwer M, Bergstrom U, Nilsson JA, Jacobsson L, Turesson C. Early menopause is an independent predictor of rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012;71(3):378-81. Epub 2011/10/06.
16. Pikwer M, Nilsson JA, Bergstrom U, Jacobsson LT, Turesson C. Early menopause and severity of rheumatoid arthritis in women over 45 years of age. *Arthritis research & therapy*. 2012;14(4):R190. Epub 2012/08/21.
17. Salliot C, Bombardier C, Saraux A, Combe B, Dougados M. Hormonal replacement therapy may reduce the risk for RA in women with early arthritis who carry HLA-DRB1 \*01 and/or \*04 alleles by protecting against the production of anti-CCP: results from the ESPOIR cohort. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(9):1683-6. Epub 2009/09/11.
18. Karlson EW, Mandl LA, Hankinson SE, Grodstein F. Do breast-feeding and other reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis? Results from the Nurses' Health Study. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(11):3458-67. Epub 2004/11/06.
19. Pikwer M, Bergstrom U, Nilsson JA, Jacobsson L, Berglund G, Turesson C. Breast feeding, but not use of oral contraceptives, is associated with a reduced risk of rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68(4):526-30. Epub 2008/05/15.
20. Bhatia SS, Majka DS, Kittelson JM, Parrish LA, Ferucci ED, Deane KD, et al. Rheumatoid factor seropositivity is inversely associated with oral contraceptive use in women without rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2007;66(2):267-9. Epub 2006/07/27.
21. Camacho EM, Lunt M, Farragher TM, Verstappen SM, Bunn DK, Symmons DP. The relationship between oral contraceptive use and functional outcome in women with recent-onset inflammatory polyarthritis: results from the Norfolk Arthritis Register. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(8):2183-91. Epub 2011/04/27.
22. Doran MF, Crowson CS, O'Fallon WM, Gabriel SE. The effect of oral contraceptives and estrogen replacement therapy on the risk of rheumatoid arthritis: a population based study. *The Journal of rheumatology*. 2004;31(2):207-13. Epub 2004/02/05.
23. Hazes JM, Coulie PG, Geenen V, Vermeire S, Carbone F, Louis E, et al. Rheumatoid arthritis and pregnancy: evolution of disease activity and pathophysiological considerations for drug use. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2011;50(11):1955-68. Epub 2011/09/06.
24. Quintero OL, Amador-Patarroyo MJ, Montoya-Ortiz G, Rojas-Villarraga A, Anaya JM. Autoimmune disease and gender: plausible mechanisms for the female predominance of autoimmunity. *Journal of autoimmunity*. 2012;38(2-3):J109-19. Epub 2011/11/15.
25. Parks CG, D'Aloisio AA, Deroo LA, Huiber K, Rider LG, Miller FW, et al. Childhood socioeconomic factors and perinatal characteristics influence development of rheumatoid arthritis in adulthood. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012. Epub 2012/05/16.
26. Rasch EK, Hirsch R, Paulose-Ram R, Hochberg MC. Prevalence of rheumatoid arthritis in persons 60 years of age and older in the United States: effect of different methods of case classification. *Arthritis and rheumatism*. 2003;48(4):917-26. Epub 2003/04/11.
27. Symmons DP. Environmental factors and the outcome of rheumatoid arthritis. *Best practice & research Clinical rheumatology*. 2003;17(5):717-27. Epub 2003/08/14.
28. Baka Z, Buzas E, Nagy G. Rheumatoid arthritis and smoking: putting the pieces together. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(4):238. Epub 2009/08/15.
29. Kallberg H, Ding B, Padyukov L, Bengtsson C, Ronnelid J, Klareskog L, et al. Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: estimations of risks after various exposures to cigarette smoke. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70(3):508-11. Epub 2010/12/15.

30. Klareskog L, Gregersen PK, Huizinga TW. Prevention of autoimmune rheumatic disease: state of the art and future perspectives. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(12):2062-6. Epub 2010/11/26.
31. Mikuls TR, Hughes LB, Westfall AO, Holers VM, Parrish L, van der Heijde D, et al. Cigarette smoking, disease severity and autoantibody expression in African Americans with recent-onset rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2008;67(11):1529-34. Epub 2008/01/17.
32. Saag KG, Cerhan JR, Kolluri S, Ohashi K, Hunninghake GW, Schwartz DA. Cigarette smoking and rheumatoid arthritis severity. *Annals of the rheumatic diseases*. 1997;56(8):463-9. Epub 1997/08/01.
33. Wolfe F. The effect of smoking on clinical, laboratory, and radiographic status in rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2000;27(3):630-7. Epub 2000/04/01.
34. Matthey DL, Brownfield A, Dawes PT. Relationship between pack-year history of smoking and response to tumor necrosis factor antagonists in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2009;36(6):1180-7. Epub 2009/05/19.
35. Saevarsdottir S, Wedren S, Seddighzadeh M, Bengtsson C, Wesley A, Lindblad S, et al. Patients with early rheumatoid arthritis who smoke are less likely to respond to treatment with methotrexate and tumor necrosis factor inhibitors: observations from the Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis and the Swedish Rheumatology Register cohorts. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(1):26-36. Epub 2010/09/24.
36. Soderlin MK, Petersson IF, Geborek P. The effect of smoking on response and drug survival in rheumatoid arthritis patients treated with their first anti-TNF drug. *Scandinavian journal of rheumatology*. 2012;41(1):1-9. Epub 2011/11/29.
37. Farhat SC, Silva CA, Orione MA, Campos LM, Sallum AM, Braga AL. Air pollution in autoimmune rheumatic diseases: a review. *Autoimmunity reviews*. 2011;11(1):14-21. Epub 2011/07/19.
38. Stolt P, Yahya A, Bengtsson C, Kallberg H, Ronnelid J, Lundberg I, et al. Silica exposure among male current smokers is associated with a high risk of developing ACPA-positive rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(6):1072-6. Epub 2009/12/08.
39. Hart JE, Laden F, Puett RC, Costenbader KH, Karlson EW. Exposure to traffic pollution and increased risk of rheumatoid arthritis. *Environmental health perspectives*. 2009;117(7):1065-9. Epub 2009/08/06.
40. Kallberg H, Jacobsen S, Bengtsson C, Pedersen M, Padyukov L, Garred P, et al. Alcohol consumption is associated with decreased risk of rheumatoid arthritis: results from two Scandinavian case-control studies. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68(2):222-7. Epub 2008/06/07.
41. Maxwell JR, Gowers IR, Moore DJ, Wilson AG. Alcohol consumption is inversely associated with risk and severity of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2010;49(11):2140-6. Epub 2010/07/30.
42. Nissen MJ, Gabay C, Scherer A, Finckh A. The effect of alcohol on radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(5):1265-72. Epub 2010/03/10.
43. Lu B, Solomon DH, Costenbader KH, Keenan BT, Chibnik LB, Karlson EW. Alcohol consumption and markers of inflammation in women with preclinical rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(12):3554-9. Epub 2010/09/10.
44. Chen HH, Huang N, Chen YM, Chen TJ, Chou P, Lee YL, et al. Association between a history of periodontitis and the risk of rheumatoid arthritis: a nationwide, population-based, case-control study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012. Epub 2012/09/04.

45. Scher JU, Ubeda C, Equinda M, Khanin R, Buischi Y, Viale A, et al. Periodontal disease and the oral microbiota in new-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2012. Epub 2012/05/12.
46. Cutolo M, Otsa K, Uprus M, Paolino S, Serio B. Vitamin D in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity reviews*. 2007;7(1):59-64. Epub 2007/10/31.
47. Song GG, Bae SC, Lee YH. Association between vitamin D intake and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clinical rheumatology*. 2012. Epub 2012/09/04.
48. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis and rheumatism*. 2000;43(1):30-7. Epub 2000/01/22.
49. Seldin MF, Amos CI, Ward R, Gregersen PK. The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1999;42(6):1071-9. Epub 1999/06/12.
50. de Vries RR, van der Woude D, Houwing JJ, Toes RE. Genetics of ACPA-positive rheumatoid arthritis: the beginning of the end? *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70 Suppl 1:i51-4. Epub 2011/02/26.
51. Pollard KM. Gender differences in autoimmunity associated with exposure to environmental factors. *Journal of autoimmunity*. 2012;38(2-3):J177-86. Epub 2011/12/06.
52. Bowes J, Barton A. Recent advances in the genetics of RA susceptibility. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2008;47(4):399-402. Epub 2008/02/12.
53. Deighton CM, Walker DJ, Griffiths ID, Roberts DF. The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. *Clinical genetics*. 1989;36(3):178-82. Epub 1989/09/01.
54. Astorga GP, Williams RC, Jr. Altered reactivity in mixed lymphocyte culture of lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1969;12(6):547-54. Epub 1969/12/01.
55. Stastny P. Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation*. 1976;57(5):1148-57. Epub 1976/05/01.
56. Stastny P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine*. 1978;298(16):869-71. Epub 1978/04/20.
57. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1987;30(11):1205-13. Epub 1987/11/01.
58. de Vries N, Tijssen H, van Riel PL, van de Putte LB. Reshaping the shared epitope hypothesis: HLA-associated risk for rheumatoid arthritis is encoded by amino acid substitutions at positions 67-74 of the HLA-DRB1 molecule. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(4):921-8. Epub 2002/04/16.
59. Matthey DL, Dawes PT, Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Thomson W, Hajeer AH, et al. HLA-DRB1 alleles encoding an aspartic acid at position 70 protect against development of rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2001;28(2):232-9. Epub 2001/03/15.
60. van der Woude D, Lie BA, Lundstrom E, Balsa A, Feitsma AL, Houwing-Duistermaat JJ, et al. Protection against anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis is predominantly associated with HLA-DRB1\*1301: a meta-analysis of HLA-DRB1 associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in four European populations. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(5):1236-45. Epub 2010/02/05.
61. du Montcel ST, Michou L, Petit-Teixeira E, Osorio J, Lemaire I, Lasbleiz S, et al. New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(4):1063-8. Epub 2005/04/09.

62. Michou L, Croiseau P, Petit-Teixeira E, du Montcel ST, Lemaire I, Pierlot C, et al. Validation of the reshaped shared epitope HLA-DRB1 classification in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2006;8(3):R79. Epub 2006/05/02.
63. Reviron D, Perdriger A, Toussiroot E, Wendling D, Balandraud N, Guis S, et al. Influence of shared epitope-negative HLA-DRB1 alleles on genetic susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2001;44(3):535-40. Epub 2001/03/27.
64. Mackie SL, Taylor JC, Martin SG, Wordsworth P, Steer S, Wilson AG, et al. A spectrum of susceptibility to rheumatoid arthritis within HLA-DRB1: stratification by autoantibody status in a large UK population. *Genes and immunity*. 2012;13(2):120-8. Epub 2011/09/02.
65. Kallberg H, Padyukov L, Plenge RM, Ronnelid J, Gregersen PK, van der Helm-van Mil AH, et al. Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. *American journal of human genetics*. 2007;80(5):867-75. Epub 2007/04/17.
66. Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van Mil AH, Chen W, van Gaalen FA, Jawaheer D, et al. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(11):3433-8. Epub 2005/10/29.
67. Bax M, van Heemst J, Huizinga TW, Toes RE. Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Immunogenetics*. 2011;63(8):459-66. Epub 2011/05/11.
68. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. 2003;423(6937):356-61. Epub 2003/05/16.
69. Raychaudhuri S, Sandor C, Stahl EA, Freudenberg J, Lee HS, Jia X, et al. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nature genetics*. 2012;44(3):291-6. Epub 2012/01/31.
70. Mitsunaga S, Suzuki Y, Kuwana M, Sato S, Kaneko Y, Homma Y, et al. Associations between six classical HLA loci and rheumatoid arthritis: a comprehensive analysis. *Tissue antigens*. 2012;80(1):16-25. Epub 2012/04/05.
71. Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhira S, Sawada T, Suzuki M, et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nature genetics*. 2003;34(4):395-402. Epub 2003/07/02.
72. Carlton VE, Hu X, Chokkalingam AP, Schrodi SJ, Brandon R, Alexander HC, et al. PTPN22 genetic variation: evidence for multiple variants associated with rheumatoid arthritis. *American journal of human genetics*. 2005;77(4):567-81. Epub 2005/09/22.
73. Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *American journal of human genetics*. 2004;75(2):330-7. Epub 2004/06/23.
74. Thomson W, Barton A, Ke X, Eyre S, Hinks A, Bowes J, et al. Rheumatoid arthritis association at 6q23. *Nature genetics*. 2007;39(12):1431-3. Epub 2007/11/06.
75. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine*. 2007;357(10):977-86. Epub 2007/09/07.
76. Kurreeman FA, Padyukov L, Marques RB, Schrodi SJ, Seddighzadeh M, Stoeken-Rijsbergen G, et al. A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. *PLoS medicine*. 2007;4(9):e278. Epub 2007/09/21.
77. Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, Purcell S, Lee AT, Karlson EW, et al. Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22,

- CTLA4, and PADI4. *American journal of human genetics*. 2005;77(6):1044-60. Epub 2005/12/29.
78. Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA, Lee A, Selby S, Carlton VE, et al. Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *American journal of human genetics*. 2004;75(3):504-7. Epub 2004/07/27.
79. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nature genetics*. 2004;36(4):337-8. Epub 2004/03/09.
80. Amur S, Parekh A, Mummaneni P. Sex differences and genomics in autoimmune diseases. *Journal of autoimmunity*. 2012;38(2-3):J254-65. Epub 2011/12/30.
81. Desai AN, Jere A. Next-generation sequencing: ready for the clinics? *Clinical genetics*. 2012;81(6):503-10. Epub 2012/03/02.
82. Owen RD, Wood HR, Foord AG, Sturgeon P, Baldwin LG. EVIDENCE FOR ACTIVELY ACQUIRED TOLERANCE TO Rh ANTIGENS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1954;40(6):420-4. Epub 1954/06/01.
83. Burlingham WJ, Grailer AP, Heisey DM, Claas FH, Norman D, Mohanakumar T, et al. The effect of tolerance to noninherited maternal HLA antigens on the survival of renal transplants from sibling donors. *The New England journal of medicine*. 1998;339(23):1657-64. Epub 1998/12/03.
84. Feitsma AL, Worthington J, van der Helm-van Mil AH, Plant D, Thomson W, Ursum J, et al. Protective effect of noninherited maternal HLA-DR antigens on rheumatoid arthritis development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(50):19966-70. Epub 2007/12/14.
85. Ostensen M, Villiger PM, Forger F. Interaction of pregnancy and autoimmune rheumatic disease. *Autoimmunity reviews*. 2012;11(6-7):A437-46. Epub 2011/12/14.
86. Yan Z, Aydelotte T, Gadi VK, Guthrie KA, Nelson JL. Acquisition of the rheumatoid arthritis HLA shared epitope through microchimerism. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(3):640-4. Epub 2011/03/02.
87. Rak JM, Maestroni L, Balandraud N, Guis S, Boudinet H, Guzian MC, et al. Transfer of the shared epitope through microchimerism in women with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(1):73-80. Epub 2009/01/02.
88. Guthrie KA, Dugowson CE, Voigt LF, Koepsell TD, Nelson JL. Does pregnancy provide vaccine-like protection against rheumatoid arthritis? *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(7):1842-8. Epub 2010/03/24.
89. Yan Z, Lambert NC, Ostensen M, Adams KM, Guthrie KA, Nelson JL. Prospective study of fetal DNA in serum and disease activity during pregnancy in women with inflammatory arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(7):2069-73. Epub 2006/06/29.
90. Costenbader KH, Gay S, Alarcon-Riquelme ME, Iaccarino L, Doria A. Genes, epigenetic regulation and environmental factors: which is the most relevant in developing autoimmune diseases? *Autoimmunity reviews*. 2012;11(8):604-9. Epub 2011/11/02.
91. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2007;370(9602):1861-74. Epub 2007/06/16.
92. Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2012;51 Suppl 5:v3-11. Epub 2012/06/29.
93. Marston B, Palanichamy A, Anolik JH. B cells in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology*. 2010;22(3):307-15. Epub 2010/01/22.
94. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid

- factor for rheumatoid arthritis. *Annals of internal medicine*. 2007;146(11):797-808. Epub 2007/06/06.
95. Luban S, Li ZG. Citrullinated peptide and its relevance to rheumatoid arthritis: an update. *International journal of rheumatic diseases*. 2010;13(4):284-7. Epub 2011/01/05.
96. Detert J, Pischon N, Burmester GR, Buttgereit F. The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Arthritis research & therapy*. 2010;12(5):218. Epub 2010/11/11.
97. Cooles FA, Isaacs JD. Pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology*. 2011;23(3):233-40. Epub 2011/03/24.
98. Hetland ML, Stengaard-Pedersen K, Junker P, Ostergaard M, Ejbjerg BJ, Jacobsen S, et al. Radiographic progression and remission rates in early rheumatoid arthritis - MRI bone oedema and anti-CCP predicted radiographic progression in the 5-year extension of the double-blind randomised CIMESTRA trial. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(10):1789-95. Epub 2010/05/07.
99. Klarenbeek NB, van der Kooij SM, Guler-Yuksel M, van Groenendael JH, Han KH, Kerstens PJ, et al. Discontinuing treatment in patients with rheumatoid arthritis in sustained clinical remission: exploratory analyses from the BeSt study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70(2):315-9. Epub 2010/11/12.
100. Mathsson L, Mullazehi M, Wick MC, Sjoberg O, van Vollenhoven R, Klareskog L, et al. Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(1):36-45. Epub 2008/01/01.
101. van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2005;7(5):R949-58. Epub 2005/10/07.
102. Chatzidionysiou K, Lie E, Nasonov E, Lukina G, Hetland ML, Tarp U, et al. Highest clinical effectiveness of rituximab in autoantibody-positive patients with rheumatoid arthritis and in those for whom no more than one previous TNF antagonist has failed: pooled data from 10 European registries. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70(9):1575-80. Epub 2011/05/17.
103. Sellam J, Hendel-Chavez H, Rouanet S, Abbed K, Combe B, Le Loet X, et al. B cell activation biomarkers as predictive factors for the response to rituximab in rheumatoid arthritis: a six-month, national, multicenter, open-label study. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(4):933-8. Epub 2011/01/13.
104. Gottenberg JE, Ravaud P, Cantagrel A, Combe B, Flipo RM, Schaeffer T, et al. Positivity for anti-cyclic citrullinated peptide is associated with a better response to abatacept: data from the 'Orencia and Rheumatoid Arthritis' registry. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012. Epub 2012/05/23.
105. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(2):380-6. Epub 2004/02/12.
106. Camacho EM, Verstappen SM, Symmons DP. Association between socioeconomic status, learned helplessness, and disease outcome in patients with inflammatory polyarthritis. *Arthritis care & research*. 2012;64(8):1225-32. Epub 2012/03/23.
107. de Vries-Bouwstra JK, Goekoop-Ruiterman YP, Verpoort KN, Schreuder GM, Ewals JA, Terwiel JP, et al. Progression of joint damage in early rheumatoid arthritis: association with HLA-DRB1, rheumatoid factor, and anti-citrullinated protein antibodies in relation to different treatment strategies. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(5):1293-8. Epub 2008/04/29.

108. Dixey J, Solymosy C, Young A. Is it possible to predict radiological damage in early rheumatoid arthritis (RA)? A report on the occurrence, progression, and prognostic factors of radiological erosions over the first 3 years in 866 patients from the Early RA Study (ERAS). *The Journal of rheumatology Supplement*. 2004;69:48-54. Epub 2004/04/01.
109. Kapetanovic MC, Lindqvist E, Saxne T, Eberhardt K. Orthopaedic surgery in patients with rheumatoid arthritis over 20 years: prevalence and predictive factors of large joint replacement. *Annals of the rheumatic diseases*. 2008;67(10):1412-6. Epub 2008/01/08.
110. Ruiz-Esquide V, Gomez-Puerta JA, Canete JD, Graell E, Vazquez I, Ercilla MG, et al. Effects of smoking on disease activity and radiographic progression in early rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2011;38(12):2536-9. Epub 2011/11/03.
111. Scott DL. Radiological progression in established rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology Supplement*. 2004;69:55-65. Epub 2004/04/01.
112. Gabriel SE, Michaud K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(3):229. Epub 2009/06/13.
113. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988;31(3):315-24. Epub 1988/03/01.
114. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(9):1580-8. Epub 2010/08/12.
115. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Furie RA, Genovese MC, et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum*. 2006;54(9):2793-806. Epub 2006/09/02.
116. van Gestel AM, Haagsma CJ, van Riel PL. Validation of rheumatoid arthritis improvement criteria that include simplified joint counts. *Arthritis Rheum*. 1998;41(10):1845-50. Epub 1998/10/20.
117. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1995;38(1):44-8. Epub 1995/01/01.
118. Smolen JS, Breedveld FC, Eberl G, Jones I, Leeming M, Wylie GL, et al. Validity and reliability of the twenty-eight-joint count for the assessment of rheumatoid arthritis activity. *Arthritis and rheumatism*. 1995;38(1):38-43. Epub 1995/01/01.
119. Bansard C, Lequerre T, Daveau M, Boyer O, Tron F, Salier JP, et al. Can rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate and biologics be predicted? *Rheumatology (Oxford, England)*. 2009;48(9):1021-8. Epub 2009/06/02.
120. Fautrel B, Granger B, Combe B, Saraux A, Guillemin F, Le Loet X. Matrix to predict rapid radiographic progression of early rheumatoid arthritis patients from the community treated with methotrexate or leflunomide: results from the ESPOIR cohort. *Arthritis research & therapy*. 2012;14(6):R249. Epub 2012/11/21.
121. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene. *Blood*. 2002;99(3):754-8. Epub 2002/01/25.
122. Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, Cartron G, Colombat P, Bardos P, et al. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res*. 2004;64(13):4664-9. Epub 2004/07/03.



123. Gragnani L, Piluso A, Giannini C, Caini P, Fognani E, Monti M, et al. Genetic determinants in hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia: Role of polymorphic variants of BAFF promoter and Fcγ receptors. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(5):1446-51. Epub 2011/05/04.
124. Kastbom A, Coster L, Arlestig L, Chatzidionysiou A, van Vollenhoven RF, Padyukov L, et al. Influence of FCGR3A genotype on the therapeutic response to rituximab in rheumatoid arthritis: an observational cohort study. *BMJ open*. 2012;2(5). Epub 2012/09/25.
125. Quartuccio L, Fabris M, Pontarini E, Salvin S, Zabotti A, Benucci M, et al. The 158VV Fcγ receptor 3A genotype is associated with response to rituximab in rheumatoid arthritis: results of an Italian multicentre study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2013. Epub 2013/03/19.
126. Sarsour K, Greenberg J, Johnston JA, Nelson DR, O'Brien LA, Oddoux C, et al. The role of the FcγRIIIa polymorphism in modifying the association between treatment and outcome in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab versus TNF-α antagonist therapies. *Clinical and experimental rheumatology*. 2013;31(2):189-94. Epub 2013/01/09.
127. Gottenberg JE, Sellam J, Ittah M, Lavie F, Proust A, Zouali H, et al. No evidence for an association between the -871 T/C promoter polymorphism in the B-cell-activating factor gene and primary Sjogren's syndrome. *Arthritis research & therapy*. 2006;8(1):R30. Epub 2006/03/02.
128. Nossent JC, Lester S, Zahra D, Mackay CR, Rischmueller M. Polymorphism in the 5' regulatory region of the B-lymphocyte activating factor gene is associated with the Ro/La autoantibody response and serum BAFF levels in primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2008;47(9):1311-6. Epub 2008/07/12.
129. Novak AJ, Grote DM, Ziesmer SC, Kline MP, Manske MK, Slager S, et al. Elevated serum B-lymphocyte stimulator levels in patients with familial lymphoproliferative disorders. *J Clin Oncol*. 2006;24(6):983-7. Epub 2006/01/25.
130. Fabris M, Quartuccio L, Vital E, Pontarini E, Salvin S, Fabro C, et al. The TTTT B lymphocyte stimulator promoter haplotype is associated with good response to rituximab therapy in seropositive rheumatoid arthritis resistant to tumor necrosis factor blockers. *Arthritis and rheumatism*. 2013;65(1):88-97. Epub 2012/09/25.
131. Isaacs JD, Ferraccioli G. The need for personalised medicine for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(1):4-7. Epub 2010/11/12.
132. Sellam J, Hendel-Chavez H, Rouanet S, Abbed K, Combe B, Loet XL, et al. B-cell activation biomarkers as predictive factors of the response to rituximab in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2011. Epub 2011/01/13.
133. Wang L, McLeod HL, Weinshilboum RM. Genomics and drug response. *The New England journal of medicine*. 2011;364(12):1144-53. Epub 2011/03/25.
134. Constantin A. Identification de marqueurs génétiques prédictifs de la sévérité de la polyarthrite rhumatoïde selon une approche gènes-candidats. Thèse de sciences. 2002.

## SUMMARY

### ASSOCIATION STUDIES BETWEEN SINGLE NUCLEOTID POLYMORPHISMS OF CANDIDATE GENES AND THE STRUCTURAL SEVERITY OR THE RESPONSE TO TREATMENT IN RHEUMATOID ARTHRITIS

Rheumatoid arthritis (RA) is a multifactorial complex disease resulting from the interactions between genes and environment and immunity. RA is characterized by the presence of anti-citrullinated peptide antibodies and leads to bone erosions. In 1987, an association between some alleles of the *HLA-DRB1* gene, encoding the  $\beta$  chain of MHC class II molecules, and RA susceptibility was reported. With the development of molecular biology, several associations between several single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in different genes implicated in RA physiopathology and RA susceptibility or ACPA presence were identified. Other studies found significant associations between some SNPs located in genes implicated in drug metabolism or in drug target expression and the response to treatment.

The objective of the thesis was to study the association between several SNPs of candidate genes and the structural severity or the response to treatment in RA.

The work is composed of 3 parts: 1) The identification of SNPs associated with the severity or structural progression based on 2 cohorts of early RA (ESPOIR and RMP). The severity was defined according to the presence of erosions and the structural progression according to the Total Sharp Score progression within one year. 2) The elaboration of an alternative classification of *HLA-DRB1* alleles, based on acid-base properties of amino acids, and the assessment of the association between allele groups and ACPA presence or structural progression in a cohorts of early RA (ESPOIR). 3) The identification of SNPs associated with the response to treatment in patients included in a randomized controlled trial assessing the clinical response to rituximab in RA (SMART). The response to treatment was defined according to the EULAR response criteria.

Two SNPs located in *IL2RB* gene were associated with the presence of erosion in ESPOIR cohort and after meta-analysis of ESPOIR and RMP cohorts. An alternative classification of *HLA-DRB1* alleles according to the acid-base properties of the amino acid at positions 70 and 71 was developed and was relevant in terms of prediction of ACPA presence and structural progression. Two SNPs located on *FCGR3A* gene or in the promoter of *BAFF* gene were associated with EULAR response after a first course of rituximab in RA in SMART trial.

We identified several associations between SNPs located on candidate genes and the severity or the response to treatment in RA. These findings contribute to the knowledge about RA physiopathology and could participate to the development of a personalized medicine.

**AUTEUR:** Adeline RUYSSSEN WITRAND

**TITRE:** ETUDES D'ASSOCIATION ENTRE DES POLYMORPHISMES DE GENES CANDIDATS ET LA SEVERITE STRUCTURALE OU LA REPONSE AU TRAITEMENT DANS LA POYARTHRITE RHUMATOIDE

**DIRECTEUR DE THESE:** PR Arnaud CONSTANTIN

**LIEU ET DATE DE SOUTENANCE:** Toulouse le 19 septembre 2013

---

## **RESUME**

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie multifactorielle complexe résultant de l'interaction entre des facteurs génétiques et environnementaux. Elle est notamment caractérisée par la présence d'auto-anticorps anti-peptides citrullinés (ACPA) et par l'apparition d'érosions. Parmi les facteurs génétiques associés à la susceptibilité de la maladie, certains allèles du gène *HLA-DRB1*, encodant la chaîne  $\beta$  des molécules HLA de classe 2, ainsi que certains polymorphismes mononucléotidiques (SNPs) situés dans de nombreux gènes intervenant dans la physiopathologie de la maladie ont été identifiés comme associés à la susceptibilité de la maladie ou la présence d'ACPA.

L'objectif de cette thèse est de rechercher une association entre des SNPs de gènes candidats et la sévérité structurale ou la réponse au traitement dans la PR

Ce travail s'est décomposé en 3 grandes parties: 1) L'identification de SNPs associés à la sévérité structurale à partir de 2 cohortes de PR récentes (cohortes ESPOIR et RMP). 2) Le développement d'une nouvelle classification des allèles de *HLA-DRB1* en fonction de leur propriétés acido-basiques des acides aminés situés en position 70 et 71 à partir d'une cohorte de PR récentes (cohorte ESPOIR). 3) L'identification de SNPs associés à la réponse au traitement dans chez des patients issus d'un essai randomisé (SMART) évaluant l'efficacité du rituximab dans la PR.

Deux SNPs situés sur le gène *IL2RB* ont été identifiés comme associés à la présence d'érosions dans la cohorte ESPOIR et après méta analyse sur les cohortes ESPOIR et RMP. Une nouvelle classification des allèles de *HLA-DRB1* en fonction des propriétés acido-basiques des acides aminés présents aux positions 70 et 71 a été développée et démontre un intérêt en termes d'association avec la production d'ACPA et la progression structurale. Deux SNPs situés sur le gène *FCGR3A* ou sur le promoteur de *BAFF* ont identifiés comme associés à la réponse EULAR chez les patients recevant un premier cycle de rituximab dans l'essai randomisé SMART.

---

**MOTS CLES:** Polyarthrite rhumatoïde, polymorphismes génétiques, anticorps anti-peptides citrullinés, érosions, pharmacogénétique

---

**DISCIPLINE ADMINISTRATIVE:** Physiopathologie

---

**INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE:** Inserm UMR 1027-Equipe 4, Faculté de Médecine, 37 allées Jules Guesdes, 31062 Toulouse 09