



Complexe Majeur d’Histocompatibilité et génomique fonctionnelle dans les spondylarthrites

Alice Talpin

► **To cite this version:**

Alice Talpin. Complexe Majeur d’Histocompatibilité et génomique fonctionnelle dans les spondylarthrites. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. <NNT : 2013PA05T037>. <tel-00917678>

HAL Id: tel-00917678

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00917678>

Submitted on 12 Dec 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L’archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d’enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS DESCARTES – SITE COCHIN
ECOLE DOCTORALE Gc2ID

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES
Science de la vie et de la santé

Spécialité : Génétique humaine

Présentée et soutenue publiquement par

Alice TALPIN

Le 22 novembre 2013

**COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE ET
GENOMIQUE FONCTIONNELLE DANS LES
SPONDYLARTHRISES**

JURY

Mr le Pr. Marc DELPECH

Mme le Pr. Géraldine FALGARONE

Mr le Pr. Thierry LEQUERRE

Mr le Pr. Rik LORIES

Mr le Pr. Henri-Jean GARCHON

Mr le Pr. Maxime BREBAN

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Co-directeur de thèse

Directeur de thèse

Résumé

La SpA est un rhumatisme inflammatoire chronique fréquent, dont la prévalence est de 0,3% en France. Les mécanismes pathologiques qui en sont à l'origine demeurent largement incertains. Néanmoins, l'hérédité de la maladie est élevée, impliquant de multiples facteurs génétiques, dont la région du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et plus particulièrement l'allèle HLA-B27 qui y exerce un rôle prédominant. L'objectif de ce travail était d'identifier de nouvelles cibles moléculaires, en vue d'améliorer la compréhension de la physiopathologie de la SpA, par des approches génétiques et de génomiques fonctionnelles.

La première partie de mon travail a consisté en l'identification de polymorphismes du CMH associés à la SpA et distinct de HLA-B27. Les études d'association portant sur les données génétiques de 3 cohortes indépendantes nous ont permis d'identifier 5 variants associés à la SpA indépendamment du HLA-B27. Les deux polymorphismes situés à proximité des gènes *MICA* et *MAPK14* semblent particulièrement intéressants pour leur implication potentielle dans la pathogénèse de la SpA. En marge de cette étude, nous avons entrepris de déterminer la prévalence du HLA-B27 dans une cohorte française représentative de la population générale, qui était de 6,9% chez les témoins et de 75% chez les sujets atteints de SpA.

Les études fonctionnelles conduites sur des cellules dendritiques dérivées de monocytes (MD-DCs) ont permis d'identifier un défaut de réponse proliférative des LT CD4⁺ stimulés par les MD-DCs de patients atteints de SpA, ainsi qu'une signature transcriptomique de 81 gènes caractéristique des MD-DCs de ces patients. Parmi les gènes validés, la surexpression d'*ADAMTS15*, de *F13A1* et de *SELL* pourrait jouer un rôle dans l'inflammation liée à la pathologie, alors que la sous-régulation de *CITED2* paraîtrait corrélée à une dérégulation de la voie Wnt. Enfin, nos investigations sur les MD-DCs nous ont amené à identifier une corrélation entre l'haplotype d'*ERAP1* prédisposant à la SpA, et un niveau accru d'expression de ce gène ainsi que de la protéine ERAP1.

Abstract

Spondyloarthritis (SpA) is a frequent chronic inflammatory rheumatic disorder, with a prevalence of 0.3% in France. Pathological mechanisms leading to SpA remain largely uncertain. Nevertheless, the heritability of this disorder is high, likely involving multiple genetic factors, among which the major histocompatibility complex (MHC) region and particularly the HLA-B27 allele which plays a prominent role. The objective of this work was to achieve a better understanding of SpA physiopathology via genetic and transcriptomic approaches.

The first part of my work consisted in identification of MHC polymorphisms associated with SpA, distinct of HLA-B27. Association studies based on the genetic data of 3 independent cohorts have allowed to identify 5 SNPs associated to SpA, independently of HLA-B27. Two polymorphisms localized next to *MICA* and *MAPK14* genes seem particularly interesting for their implication in SpA pathogenesis. In parallel of this study, we characterized HLA-B27 prevalence in a French cohort corresponding to 6.9% in healthy controls and 75% in SpA patients.

Functional studies on monocyte-derived dendritic cells (MD-DCs) revealed altered capacity to stimulate allogeneic CD4⁺ T cell responses by MD-DCs from SpA patients and a transcriptomic signature of 81 genes differentially expressed in those cells, as compared to those from healthy controls. Among validated genes, *ADAMTS15*, *F13A1* and *SELL* could play a role in SpA inflammation, whereas *CITED2* seemed to be correlated to Wnt pathway. Finally, a strong correlation between ERAP1 SpA-susceptibility haplotype and an increased expression of this gene and the ERAP1 protein has been identified.

Remerciements

J'adresse mes plus sincères remerciements à tous les membres de mon jury de thèse. Je souhaite remercier le Professeur Marc Delpech de me faire l'honneur de le présider. Je remercie également les Professeurs Géraldine Falgarone et Thierry Lequerré qui ont généreusement accepté de rapporter mon travail. Je leur suis extrêmement reconnaissante d'avoir bien voulu prendre de leur temps pour juger ce travail. J'exprime aussi toute ma reconnaissance au Professeur Rick Lorries pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'être examinateur au sein de mon jury.

Je tiens à remercier mes co-directeurs de thèse, Maxime Breban et Henri-Jean Garchon qui m'ont confié un projet de recherche complexe et passionnant à la fois. Ils ont su me guider dans cette tâche ambitieuse pour laquelle j'ai bénéficié de leurs compétences et de leurs regards critiques pour mieux faire avancer ces travaux. J'espère avoir été à la hauteur de leurs attentes.

Je remercie également Gilles Chiocchia, co-directeur du laboratoire avec Maxime Breban, de m'avoir accueilli au sein de l'équipe.

J'aimerais aussi remercier les membres de la Fondation Arthritis-Courtin, d'avoir cru en mes capacités de mener ce projet à bien et de m'avoir financé pendant plus de trois années.

Une pensée également pour tous les membres des plateformes de cytométrie, de séquençage et de génomique de l'Institut Cochin, pour l'aide qu'ils m'ont fourni tout au long de mes projets.

Voici le moment de remercier chaleureusement les personnes qui ont partagé avec moi un temps à « Hardy ». Colocataires de travail et de vie, ces moments vécus ensemble me resteront longtemps en mémoire. Que vous soyez présents ou partis pour d'autres aventures, vous m'avez tous apporté quelque chose qui fait que je ne suis plus tout à fait la même personne qu'au début de ma thèse. J'ai été très heureuse de passer ces quatre années de ma vie en votre compagnie !

Merci Nelly, de m'avoir pris sous ton aile à mon arrivée au labo, ouvert ton L2 et transmis tes savoirs en culture cellulaire! Grâce à toi, les MD-DCs n'ont plus de mystères pour moi! Nous avons formé une équipe de choc toutes les 2! Je me souviendrais longtemps de nos fameux J7, à « flusher» encore et encore nos puits, pour tenter de décoller quelques cellules. Et quels souvenirs de nos heures passées ensemble au canto 2, à se raconter nos histoires et de nombreux potins... Sans oublier nos apéros à l'ACAD, notre rendez-vous incontournable !!

Ah Félicie...aussi ! C'est l'occasion pour moi de te remercier affectueusement pour ces années de collaboration ! Merci pour nos discussions, scientifiques ou non, ton regard critique et tes précieux conseils ! Ca a été un immense plaisir de travailler avec toi ! Tu m'as appris beaucoup et cette ma thèse n'aurait pas été la même sans toi ! Merci !

Un grand merci à la Plateforme d'Imagerie du Petit Animal, ou «PIPA», de m'avoir accueilli dans votre bureau il y'a 4 ans ! Merci à toi Didier, grand chercheur et très grand bonhomme, pour nos discussions, tes conseils et tes blagues... Gilles merci de m'avoir fait découvrir tant de merveilles sur le net et de m'avoir fait partager «la Musique du Vendredi», qui était un excellent moyen de nous détendre à l'approche du we ! Merci également à toi Carmen toujours disponible pour m'aider ou me

conseiller, et merci aussi à Franck, plus récemment arrivé dans l'équipe, mais toujours prêt à nous organiser un petit apéro de derrière les fagots !

Merci également à la «B27 team», Claudine la chef, mais aussi Cindy, la « warrior » capable de finir sa thèse en pouponnant ses filles, bravo Mme Jeanty! Et puis merci à toutes les demoiselles croisées dans ce bureau ou le L2, Aurélie, Aurore, Adèle et stagiaires passées : bonne continuation les filles pour vos projets à venir !

Merci à la «Allanore team», et plus particulièrement à Barbara pour ton enthousiasme, nos discussions dans le L2 et les bières à l'Acad !

Nada et Clotilde, jeunes arrivantes dans l'équipe, nos chemins ne se sont pas croisés très longtemps, mais ça a été un grand plaisir de travailler à vos côtés ! Merci à toutes les 2 pour votre bonne humeur! En espérant que mon « squatte » des derniers mois, à vos bureaux, paillasses et L2 ne vous ai pas trop ennuyé.

Je souhaite également remercier Manu et Isabelle pour m'avoir donné de nombreux coups de mains lorsque je manquais de temps ! Votre enthousiasme a permis de me détendre plus d'une fois !

Merci aussi à Nathalie et Emna, pour les moments passés ensemble et pour nos discussions, scientifiques ou non.

Merci également à Abdel, Amir, Brigitte et Luiza, pour avoir contribué à la bonne ambiance de ce labo.

Je tiens également à te remercier Sonia ! Ce projet nous a donné l'occasion de nous rencontrer et ça a été un grand plaisir de travailler avec toi !

Greg, je souhaite te remercier chaleureusement pour ton écoute et les moments partagés à discuter de nos vies, de nos thèses... Merci de m'avoir soutenu dans les moments difficiles, merci pour ton amitié !

Ingrid, je souhaite te remercier pour ces quatre années passées ensemble, à partager nos vies de labo et vies perso, j'ai passé de très bons moments !

Merci Mademoiselle Valérie ! J'ai eu la chance d'apprendre à te connaître lors du congrès de la SFI à Marseille, où nous avons passé 3 jours ensemble très sympa! C'était le début d'une belle amitié !

Merci à tous les membres du labo qui m'ont aidé à un moment ou à un autre tout au long de ma thèse, Matthieu, Sandrine, Marie-Agnès, Roméro, Catherine, Ourdia...

Je tiens à remercier chaleureusement l'ensemble des membres de l'association des Jeunes Chercheurs de l'institut Cochin (JeCCo), passés et présents, avec qui j'ai travaillé pendant mes premières années de thèse. Merci à toi Simon de m'avoir poussé, à peine arrivée au sein de l'équipe, dans le bureau de l'association. J'ai rencontré des gens formidables, dès le début de mon investissement dans JeCCo, Pablo, Sandra, Sophie, Nicolas, Filippo, Maria-Angeles... mais également plus récemment arrivés, Laura, Anne, Alexandra, Marine, Marielle, John... Et j'en oublie sûrement que j'ai pu rencontrer lors de l'organisation d'un symposium, d'une course ou d'un afterlab ...

Merci à mes copines du Magistère de Génétique de Paris 7 qui ont toujours été là pour un moment de détente quand cela devenait nécessaire.

Et puis un grand merci à mes amis d'Orléans, de Tours, de Nantes, de Paris et d'ailleurs de m'avoir soutenu, encouragé et cru en moi ! Vous n'avez pas toujours compris en quoi consistait une thèse, mon projet, mon quotidien, mais vous avez été avec moi durant ces 4 années et ça m'a motivé jusqu'à la dernière ligne droite ! Spécial dédicace à Benny qui m'a permis de rédiger cette thèse avec un très bon outil de travail!!

Un très grand merci à mes parents et mon frère Julien pour votre soutien durant cette thèse et pour votre amour ! Vous m'avez donné le goût du savoir et je vous en suis extrêmement reconnaissante ! Merci papa d'avoir relu tout mon travail afin d'être sûre que je ne laisse pas passer quelques coquilles...

Et bien sûre merci à toi Yvan, pour avoir été à mes côtés tout au long de cette thèse. Tu as su m'écouter, me rassurer et m'encourager à tout moment ! Merci d'avoir supporté les heures tardives au labo, les we à travailler et les cellules à nourrir quel que soit le jour de la semaine ! Je te remercie aussi d'avoir tout mis en œuvre pour que mon travail se passe dans les meilleures conditions possibles ! Bref, il est difficile de décrire 4 années de thèse en quelques lignes, mais ce qui est sûr c'est que, sans toi, ce travail n'aurait pas été possible !

MERCI à tous !

Table des matières

Remerciements	5
Table des matières	8
Liste des figures et tableaux	12
Figures.....	12
Tableaux.....	13
Liste des abréviations	14
INTRODUCTION GENERALE	16
Chapitre 1	17
I. Qu'est-ce que les spondylarthropathies (SpA) ?	17
A. Le concept de SpA	17
B. Manifestations cliniques	18
1. Manifestations axiales.....	18
a) L'atteinte des articulations sacro-iliaques.....	19
b) L'atteinte du rachis.....	20
c) L'atteinte thoracique.....	21
2. Manifestations périphériques	22
a) Les arthrites.....	22
b) Les dactylites	23
c) Les enthésites.....	24
3. Manifestation extra-articulaires.....	25
C. Les différents sous-types de SpA	25
1. La spondylarthrite ankylosante (SA).....	26
2. Les arthrites réactionnelles (ARé)	26
3. Les rhumatismes associés aux entérocolopathies inflammatoires (ou « arthrites associées aux MICI »).....	27
4. Le rhumatisme psoriasique (RhPso).....	27
5. Spondylarthrites à début juvénile	28
6. Formes indifférenciées des spondylarthrites (uSpA)	28
D. Les critères de classifications des SpA.....	28
1. Les critères modifiés de New-York.....	29
2. Les critères d'Amor.....	29
3. Les critères de l'European Spondylarthropathy Study Group (ESSG)	30
4. Les critères de l'ASAS	31
E. Epidémiologie des SpA.....	33

1.	En France	33
2.	En Europe	33
3.	Dans le monde.....	33
F.	Traitements	34
1.	Traitement médicamenteux.....	34
a)	Les anti-inflammatoires.....	34
(1)	Les AINS	34
(2)	Les corticoïdes	35
b)	Les traitements de fond «classiques»	35
c)	Les anti-TNF α	35
2.	Rééducation fonctionnelle	36
Chapitre 2	37
II.	Modèle de rat transgénique pour HLA-B27	37
A.	La spondylarthrite du rat.....	38
B.	La part des facteurs génétiques et environnementaux	38
C.	Les mécanismes immunologiques de la SpAr	39
1.	Expériences de transfert cellulaire <i>in vivo</i>	39
2.	Rôle des cellules dendritiques dans la SpA ?.....	40
a)	Les cellules dendritiques	40
b)	Les DC jouent-elles un rôle dans la SpA ?.....	41
3.	Inflammation et SpAr	41
Chapitre 3	43
III.	Génétique de la SpA	43
A.	Epidémiologie génétique	43
1.	Quels sont les arguments pour l'implication de facteurs génétiques dans le déterminisme des SpA ?	43
2.	Quels sont ces facteurs génétiques ?	44
3.	Concordance de développement de la SA chez les jumeaux monozygotes et dizygotes ? ..	45
4.	Implication d'autres facteurs génétiques que le HLA-B27 ?	46
B.	Quel sont les autres facteurs génétiques de la SpA ?	48
1.	Etude des facteurs génétiques du Complexe Majeur d'Histocompatibilité.....	48
a)	Rappels sur le système HLA.....	48
(1)	Le locus génétique.....	48
(2)	La structure biochimique.....	50
(3)	La régulation de l'expression.....	51
b)	HLA-B27 et SpA.....	52
(1)	HLA-B27, quel modèle de transmission ?.....	52

(2)	Association entre les différents sous-types allélique du HLA-B27 et la SpA ?	53
(3)	Quel est le rôle du HLA-B27 dans la prédisposition à la SpA ?	56
c)	HLA-B27 n'explique pas l'ensemble du déterminisme génétique de la SpA : implication d'autres gènes du locus CMH ?	57
(1)	Les gènes du CMH de classe I	57
(2)	Les gènes du CMH de classe II	58
(3)	Les gènes du CMH de classe III	59
2.	Quels sont les facteurs génétiques impliqués dans la SpA en dehors du CMH?	60
a)	Etudes de liaison par criblage génomique	60
(1)	Criblages génomiques de l'équipe d'Oxford	60
(2)	Criblage génomique du Consortium nord-américain (NASC).....	61
(3)	Criblage génomique du GFEGS.....	61
(4)	Meta-analyse des études de liaison par criblage génomique	62
b)	Etudes d'association pangénomiques	63
(1)	Etude d'association du WTCCC et du TASC	64
(2)	Etude d'association génome entier (GWAS) du TASC.....	64
(3)	GWAS de l'équipe chinoise.....	64
(4)	GWAS du WTCCC2 et du TASC	65
(5)	Etude d'association « Immunochip » du IGASC	65
c)	Etudes d'association de type « gène candidat »	69
(1)	Cluster de l'interleukine 1	70
(2)	L'interleukine 10.....	70
(3)	Card15/Nod2	70
(4)	Le cytochrome P450 2D6 (CYP2D6).....	71
(5)	Autres gènes étudiés	71
	Chapitre 4.....	72
	IV. Transcriptomique de la SpA : un autre moyen d'identifier des gènes impliqués dans la maladie ?	72
A.	Tissus inflammatoires.....	76
B.	Sang total.....	77
C.	Leucocytes du sang circulant	78
	Objectifs du travail de thèse	80
	TRAVAUX ORIGINAUX.....	82
	Article 1 : Association of Major Histocompatibility Complex loci independently of HLA-B27 in French patients with spondyloarthritis	83
	Article 2 : Life-time Prevalence of Spondyloarthritis in Reference to HLA-B27 in a French Worker Population: Results of the GAZEL Cohort	100

Article 3 : Monocyte-Derived Dendritic Cells from HLA-B27 ⁺ AxialSpondyloarthritis Patients Display Altered FunctionalCapacity and Deregulated Gene Expression	125
Article 4 : SpA-associated polymorphisms of ERAP1 are correlated with gene expression and protein level of the amino-peptidase.....	160
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	191
Discussion	192
Perspectives.....	206
CONCLUSIONS	210
BIBLIOGRAPHIE	213

Liste des figures et tableaux

Figures

Figure 1. Le concept de SpA et ses différentes formes.....	18
Figure 2. Schéma d'une articulation sacro-iliaque normale, enflammée et ankylosée.	19
Figure 3. Schéma du rachis normal, inflammatoire et ankylosé.....	20
Figure 4. Les signes de l'ankylose rachidienne.	21
Figure 5. Représentation des articulations touchées par les atteintes thoraciques.	22
Figure 6. Schéma d'une articulation normale et arthritique.	23
Figure 7. Schéma d'une enthèse calcanéenne.....	24
Figure 8. Critères de classification ASAS pour la spondylarthrite axiale.	32
Figure 9. Critères de classification ASAS pour la spondylarthrite périphérique.....	32
Figure 10. Structure de la région HLA. Ce locus est constitué de trois sous-loci : les loci du CMH de classe I, II et III.	50
Figure 11. Structure des molécules HLA de classe I et II.....	51
Figure 12. Structure tridimensionnelle des domaines extracellulaires de la molécule HLA-B27 obtenue par cristallographie.	54
Figure 13. Gènes situés à proximité des SNPs identifiés lors des études d'association pangénomiques.....	63
Figure 14. Structure de la région du cluster de gènes qui entoure ERAP1.....	67
Figure 15. Schéma résumant les étapes d'une étude d'expression globale à l'aide de puces.	73
Figure 16. Schéma rassemblant les principales étapes de la PCR quantitative en temps réel (PCRq).....	74

Tableaux

Tableau 1. Critères diagnostiques de la SA.....	29
Tableau 2. Critères diagnostiques de la SpA d'Amor	30
Tableau 3. Critères diagnostiques de la SpA de l'ESSG.....	31
Tableau 4. Principales lignées de rats transgéniques pour le HLA-B27 ou le HLA-B7 et la β 2m humaine.....	37
Tableau 5. Prévalence de l'allèle HLA-B27 dans les différentes formes de SpA.	52
Tableau 6. Fréquences des sous-types alléliques de HLA-B27 à travers le monde.....	53
Tableau 7. Principales études de puces à expression menées sur la SA ou la SpA.	75

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

Ag : Antigène

AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens

ARé : Arthrite Réactionnelle

ARN : Acide ribonucléique

ASAS : ASsessment of SpondyloArthritis international Society

β2m : β2-microglobuline

CD : Cluster de Différentiation

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes

Da : Dalton

DC : Dendritic Cell (cellule dendritique)

DZ : Dizygotes

DL : Déséquilibre de Liaison

ESSG : European spondyloarthropathies study group (Groupe européen de l'étude des spondylarthropathies)

GFEGS : Groupe français pour l'étude génétique de la spondylarthrite
GWAS : genome wide association studies (études d'association pan-génomiques)
HLA : human leucocyte antigen (antigène des leucocytes humains)

HLA : Human Leucocyte Antigen (antigène des leucocytes humains)

IC : Intervalle de Confiance

IFNγ : Interféron-γ

IL- : InterLeukine

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

Kb : kilobases

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Lymphocytes T

MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

MZ : Monozygotes

NF- κ B : nuclear factor - kappa B (facteur nucléaire – kappa B)

NK : natural killer (cellules « tueuses naturelles »)

NO : Oxyde Nitrique

nsSNP : SNP non-synonyme

OR : Odds Ratio (rapport de cotes)

PBMCs : Peripheral Blood Mononuclear Cells

Pb : Paires de bases

PCR : polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

PR : Polyarthrite Rhumatoïde

P : P-value (niveau de probabilité)

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

RE : Réticulum Endoplasmique

RhPso : Rhumatisme Psoriasique

RCH : rectocolite ulcéro-hémorragique

SA : Spondylarthrite Ankylosante

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SpA : Spondylarthrite ou Spondylarthropathies

SpAr : SpA du rat

TASC : Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium

TNF- α : Tumor Necrosis Factor α (facteur nécrosant des tumeurs α)

UAA : Uvéite Antérieure Aigüe

USpA : formes indifférenciées de SpA

WTCCC : Wellcome Trust Case Control Consortium

Première partie

INTRODUCTION GENERALE

Chapitre 1

I. Qu'est-ce que les spondylarthropathies (SpA) ?

A. Le concept de SpA

Les études paléopathologiques effectuées sur des momies égyptiennes suggèrent que la maladie, aujourd'hui connue sous le nom de spondylarthrite ankylosante (SA), frappe l'humanité depuis l'Antiquité ^{1 2}. La première description historique de la SA n'apparut dans la littérature qu'en 1559, par Realdo Colombo, qui dépeint les particularités anatomiques de la SA dans son livre *De Re Anatomica* ³. En 1693, plus d'un siècle après, Bernard Connor, expose dans sa thèse de médecine les caractéristiques cliniques de la SA observées sur un squelette humain, incluant une courbure anormale de la colonne vertébrale et des vertèbres fusionnées ⁴. A la fin du 19^{ème} siècle, trois médecins indépendants, Wladimir Von Bechterew en Russie (1893), Adolph Strümpell en Allemagne (1897) et Pierre Marie en France (1898), ont décrit d'autres traits de la SA, identifiable par la radiographie ⁵. L'éponymie « maladie de Bechterew » est peu utilisée en France mais répandue partout ailleurs et particulièrement en Allemagne. Jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle, la plupart des rhumatismes inflammatoires étaient regroupés au sein des arthrites rhumatoïdes. Ainsi, le concept des SpA est né en 1974 à la suite des travaux de Moll *et al.* Il désigne une famille de maladies partageant des caractéristiques cliniques distinctes de la polyarthrite rhumatoïde ⁶. Ces travaux furent rapidement validés par la découverte de la forte association génétique de ces différentes entités cliniques avec la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I HLA-B27 ⁷. Les SpA réunissent cinq entités précédemment considérées comme distinctes : SA, rhumatisme psoriasique, rhumatisme des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, arthrite réactionnelle, spondylarthrite à début juvénile et spondylarthrite indifférenciée (**Figure 1**). Aujourd'hui, les terminologies de « spondylarthrite », de « groupe des spondylarthrites » ou de « spondyloarthrite », sont couramment employées pour désigner ces pathologies.

Les SpA constituent le 2ème rhumatisme inflammatoire chronique le plus fréquent après la polyarthrite rhumatoïde, avec une prévalence estimée à 0,3% de la population adulte en France. En raison de sa plus grande prévalence, la SA est considérée comme le chef de file de ce groupe de rhumatismes inflammatoires.



Figure 1. Le concept de SpA et ses différentes formes.

B. Manifestations cliniques

Les SpA se caractérisent sur le plan anatomo-clinique par une atteinte inflammatoire du squelette axial ou périphérique, diversement associée à des manifestations extra-articulaires comme le psoriasis, les maladies inflammatoires intestinales et les uvéites antérieures aiguës.

1. Manifestations axiales

La caractéristique principale des SpA est l'atteinte du squelette axial, correspondant à toutes les manifestations cliniques touchant l'axe du corps. En pratique, il s'agit de douleurs dues à l'inflammation des articulations sacro-iliaques, du rachis et de la paroi thoracique. Elle est responsable de douleurs d'horaire inflammatoire, d'une raideur, et peut conduire à une

ankylose progressive. Une description plus précise des trois principales atteintes du squelette axial est donnée ci-dessous.

a) L'atteinte des articulations sacro-iliaques

Chaque articulation sacro-iliaque réunit le sacrum à l'os iliaque (**Figure 2**). L'inflammation de cette articulation, appelée également sacroiliite, est une caractéristique clinique et radiologique de la SA, qui est le prototype des SpA. Cette inflammation est responsable de douleurs, siégeant le plus souvent en pleine fesse, prédominant dans la deuxième partie de la nuit. Ainsi le patient éprouve au réveil une sensation de raideur lombaire prolongée au-delà de 30 minutes. L'enraidissement se manifeste également dans la journée à la suite d'une période d'immobilité.

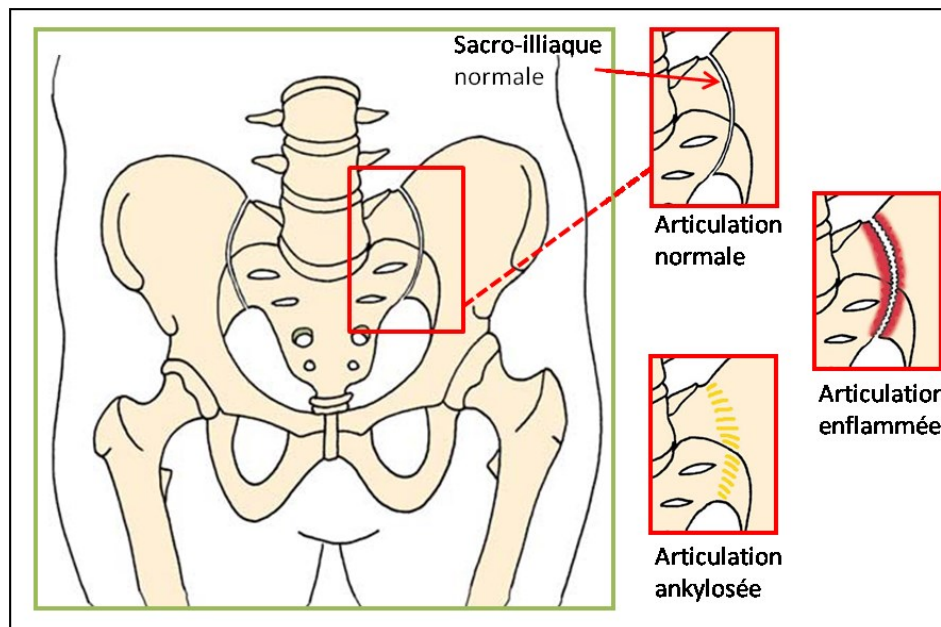


Figure 2. Schéma d'une articulation sacro-iliaque normale, enflammée et ankylosée.

(D'après « Spondylarthrite en 100 questions », édition 2005, Dougados M).

Les rares études histologiques récentes de sacroiliite montrent qu'il s'agit d'une synovite avec formation d'un pannus et d'un tissu de granulation⁸. Ce tissu inflammatoire contient principalement des lymphocytes T (LT) CD4+ et CD8+ et des macrophages activés⁹. Il s'accompagne d'une néo-angiogenèse (favorisant le recrutement des cellules du système immunitaire vers l'articulation), d'une prolifération exagérée de synoviocytes et d'une expression des ARN messagers de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF alpha mais aussi du TGF beta¹⁰. Cet état inflammatoire aigu de la synoviale s'associe à une destruction du cartilage et de l'os sous-jacent, conduisant à leur remplacement progressif par un tissu de cicatrisation fibreux, puis par une ossification et un néocartilage. L'étape finale de ce

processus est la fusion chondrale et l'ossification endochondrale menant à l'ankylose osseuse intra-articulaire. Cela aboutit à la disparition de l'articulation sacro-iliaque, par formation de ponts osseux entre les deux berges de l'articulation⁸. Toutefois, l'ankylose osseuse s'accompagne d'une disparition de la douleur et ne provoque qu'une légère gêne fonctionnelle, l'articulation sacro-iliaque n'ayant naturellement qu'une mobilité très limitée.

b) L'atteinte du rachis

Le rachis (ou colonne vertébrale) est constitué des vertèbres, de ligaments et d'articulations joignant ces vertèbres entre elles. Au cours des SpA, l'inflammation du rachis touche l'insertion osseuse des ligaments reliant les vertèbres, ainsi que les articulations situées entre les arcs postérieurs de celles-ci. L'atteinte rachidienne se traduit par des douleurs particulièrement exacerbées en fin de nuit ou au réveil, et par une raideur du dos qui perdure longtemps lors de la mise en mouvement, provoquant un déverrouillage matinal qui peut durer plusieurs heures. Elle est ainsi responsable d'impotence ou de gêne fonctionnelle et de diminution de la mobilité du rachis. Cette douleur se différencie aisément de la douleur due à d'autres affections du rachis de nature "mécanique", telles que la hernie discale, ou l'arthrose. En effet, dans ces derniers cas, la douleur est surtout nette après des exercices physiques et disparaît au repos. Le risque principal de ces atteintes, comme dans les cas des articulations sacro-iliaques, est l'évolution vers une ankylose osseuse du rachis (Figure 3).

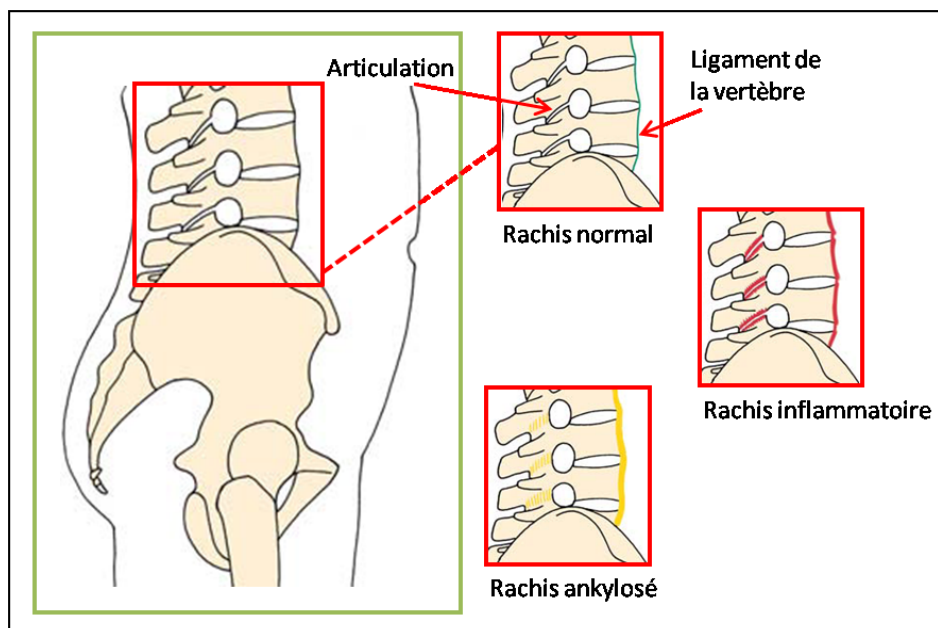


Figure 3. Schéma du rachis normal, inflammatoire et ankylosé.

(D'après « Spondylarthrite en 100 questions », édition 2005, Dougados M).

L'ankylose est due à l'ossification des ligaments et des articulations intervertébrales. Elle est responsable d'une perte définitive de la souplesse rachidienne (raideur); raideur pouvant se faire dans une position normale ou anormale (**Figure 4**).

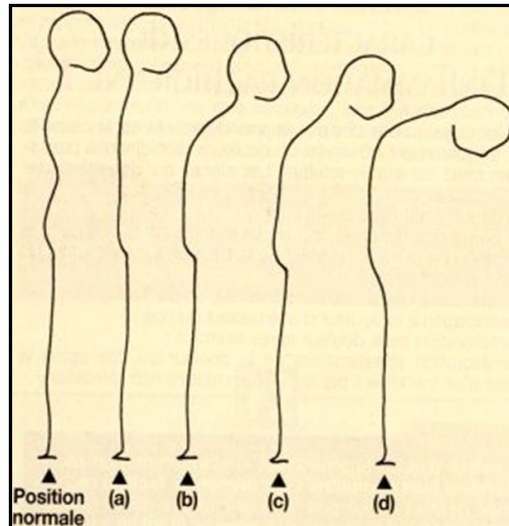


Figure 4. Les signes de l'ankylose rachidienne.

Les attitudes anormales les plus souvent observées sont: **(a)** d'abord la perte de la cambrure des reins (le terme médical est "perte de la lordose lombaire"); **(b)** peut s'ensuivre une position penchée en avant, due à une bosse du dos (le terme médical est "cyphose dorsale"); **(c)** peut s'ensuivre une ankylose du cou qui va alors empêcher le malade de relever la tête; **(d)** ici, la gêne peut être très importante, notamment si l'attitude vicieuse est telle que le patient n'arrive plus à relever la tête pour regarder face à lui.

(D'après « *Spondylarthrite en 100 questions* », édition 2005, Dougados M).

c) L'atteinte thoracique

La cage thoracique contient notamment le cœur, les poumons et la trachée. Elle est constituée de la colonne vertébrale en arrière, du sternum en avant et des côtes réunissant ces deux éléments latéralement. La paroi thoracique comprend de très nombreuses articulations, qui peuvent être touchées par l'inflammation au cours des SpA (**Figure 5**). L'atteinte de la paroi thoracique peut être responsable de douleurs très localisées, aggravées par les efforts de toux et d'éternuement mais qui peuvent parfois être confondues avec des douleurs de poitrine que l'on rencontre au cours des maladies cardiaques comme l'infarctus. En cas d'ankylose des articulations de la paroi thoracique, les capacités respiratoires peuvent être diminuées. À terme, dans des cas exceptionnels, peut survenir une insuffisance respiratoire. En pratique, on évalue cette ankylose en mesurant la différence de périmètre

du thorax (grâce à un simple mètre de couturière) en expiration (après avoir vidé ses poumons) et en inspiration (après avoir gonflé ses poumons).

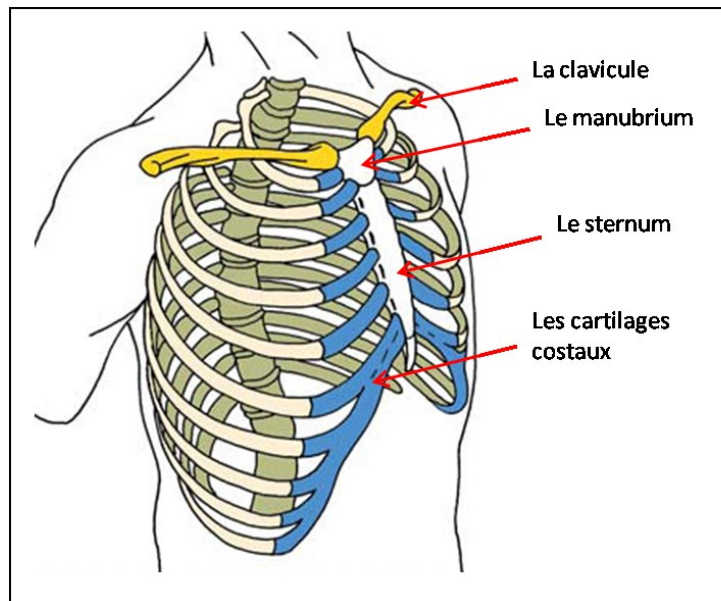


Figure 5. Représentation des articulations touchées par les atteintes thoraciques.
(D'après « *Spondylarthrite en 100 questions* », édition 2005, Dougados M).

2. Manifestations périphériques

L'atteinte des articulations périphériques, tels que les arthrites ou les dactylites, rapproche la SpA des autres rhumatismes inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde. Cependant la SpA possède une individualité anatomique propre puisque la zone cible de l'inflammation est l'enthèse, zone d'insertion des tendons et des ligaments dans l'os.

a) Les arthrites

Les atteintes arthritiques se manifestent par l'inflammation du tissu qui entoure la cavité articulaire, la membrane synoviale. Ce qui induit un épaissement de celle-ci, pouvant aller jusqu'à éroder l'os sous-jacent, et entraînant la formation de nodules inflammatoires que l'on appelle des pannus synoviaux (**Figure 6**). Ces atteintes peuvent se manifester par tous les symptômes de la réaction inflammatoire qui combine rougeur, raideur, douleur et gonflement de l'articulation, en rapport avec l'accumulation dans l'articulation de liquide synovial anormalement sécrété par la membrane synoviale inflammée (épanchement de synovie). Elles ne touchent le plus souvent que quelques articulations à la fois (oligo-

arthrites) et se caractérisent par leur distribution asymétrique affectant préférentiellement les grosses articulations (hanches, épaules, genoux et chevilles).

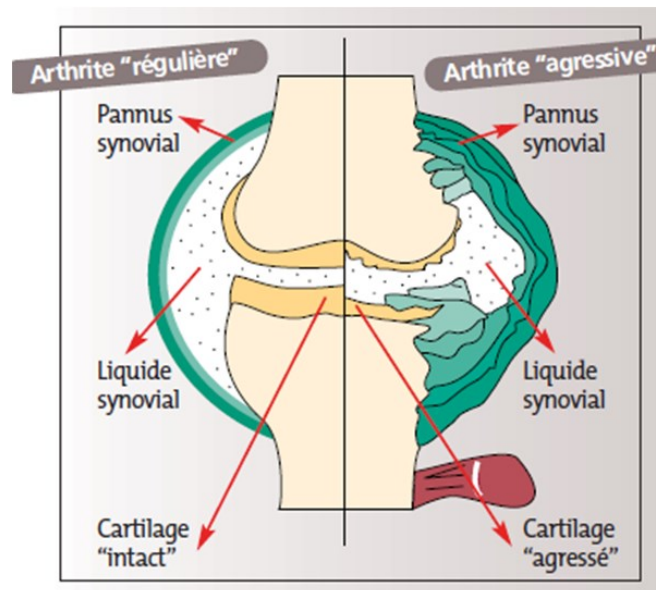


Figure 6. Schéma d'une articulation normale et arthritique.
(D'après « Spondylarthrite en 100 questions », édition 2005, Dougados M).

Les études histologiques des arthrites de patients atteints de SpA ont permis d'identifier que la membrane synoviale inflammée était le siège d'une hyper vascularisation dans laquelle de nombreux facteurs sont impliqués, comme le VEGF, l'angiopoïétine, le TGF beta et la MMP-9. Un infiltrat inflammatoire y est également observé, constitué principalement de lymphocytes et d'un sous-type de macrophages exprimant le récepteur « scavenger » CD163 (marqueur des macrophages impliqués dans la régulation de l'inflammation). Ces cellules peuvent influencer l'inflammation locale par une expression élevée de la molécule HLA-DR et une production en forte quantité de cytokines pro-inflammatoires (TNF alpha, IL-1 beta, IL-6 et IL-18) et en faible quantité de molécules anti-inflammatoires comme l'IL-10¹¹⁻¹⁴. D'autre part, ces macrophages exprimant le CD163 pourraient inhiber la prolifération et l'activation des lymphocytes T. Ces données valident la théorie d'une rupture de tolérance immunitaire, produisant un environnement permissif pour la diminution d'une défense antibactérienne et le maintien d'une réponse inflammatoire déséquilibrée au sein des articulations de patients atteints de SpA.

b) Les dactylites

Lorsque les arthrites touchent toutes les articulations d'un même doigt ou orteil et qu'elles s'accompagnent d'une inflammation des gaines tendineuses entourant l'articulation

(téno-synovite), le doigt ou l'orteil apparaît alors gonflé dans son ensemble et prend l'aspect d'une saucisse. Cet aspect de doigt ou orteil "en saucisse" correspond à une dactylite qui est une manifestation caractéristique et relativement spécifique des affections du groupe des SpA.

c) Les enthésites

L'enthèse est le site d'attachement des ligaments et des tendons à l'os. C'est également un tissu dynamique capable de s'adapter aux forces de compression et de distraction qui s'y exercent. L'inflammation de l'enthèse est une caractéristique clinique de la SpA. Toutes les enthèses périphériques fibro-cartilagineuses sont susceptibles d'être atteintes au cours de cette affection, mais les enthésites s'y observent surtout aux membres inférieurs. L'atteinte la plus fréquente au cours de la SpA est la talalgie (douleur du talon), qui a la particularité de s'améliorer à la marche et d'être fréquemment bilatérale (**Figure 7**). Ces atteintes sont constatées tout au long de l'évolution de la maladie, mais de diagnostic délicat, car pouvant induire des douleurs aiguës un jour et être asymptomatique le lendemain. Elles débutent par des lésions inflammatoires aiguës au site d'attachement à l'os. Elles évoluent ensuite vers une cicatrisation fibreuse puis vers une ossification pouvant s'étendre vers le ligament ou le tendon ¹⁵.

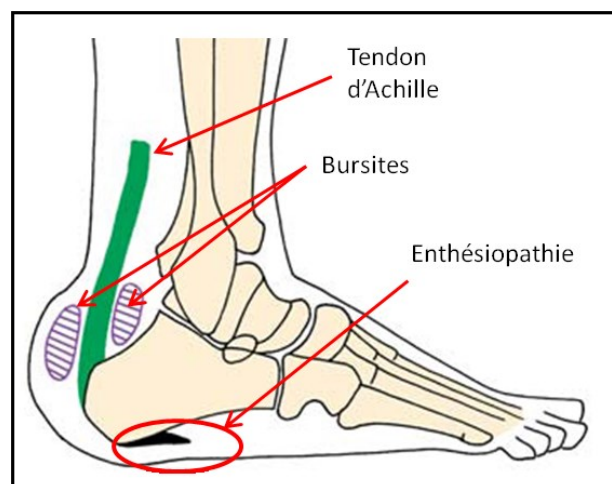


Figure 7. Schéma d'une enthèse calcanéenne.

Les bourses séreuses empêchent le frottement du tendon d'Achille sur l'os. Elles peuvent être le siège d'une inflammation, on parle alors de « bursite ». La douleur du dessous du talon est appelée une enthésopathie.

3. Manifestation extra-articulaires

Les spondylarthrites sont également caractérisées par de nombreuses atteintes non rhumatismales, témoignant du caractère systémique de cette affection. Les plus fréquentes sont :

- l'uvéite, principale atteinte ophtalmologique observée au cours des SpA. Le risque de développer une uvéite pour un patient atteint de cette affection est d'environ 40%, ce qui en fait la plus fréquente des manifestations extra-articulaires. Cliniquement, elle se manifeste par une douleur, une rougeur oculaire avec larmoiements, photophobie et baisse d'acuité visuelle.
- le psoriasis, manifestation inflammatoire de la peau et/ou des ongles.
- les atteintes inflammatoires intestinales pouvant se révéler par des diarrhées, des douleurs abdominales, des glaires ou des rectorragies correspondant à une maladie de Crohn ou une recto-colite hémorragique.

Des manifestations plus rares peuvent également être observées, comme l'atteinte bulleuse du poumon, conséquence tardive de l'ankylose osseuse de la paroi thoracique. L'atteinte cardiaque, affectant moins de 10% des patients atteints de SpA, se traduit par des troubles du rythme cardiaque (conduction auriculo-ventriculaire) et par des valvulopathies aortiques et/ou mitrales. Enfin, des atteintes uro-génitales dont la plus fréquente est l'urétrite aseptique peuvent se manifester.

C. Les différents sous-types de SpA

Les diverses manifestations cliniques des SpA ont permis de classer ce groupe d'affections en sous-types selon leur mode de présentation principale : la spondylarthrite ankylosante (atteinte axiale prédominante avec sacro-iliite radiologique certaine), le rhumatisme psoriasique, les arthrites réactionnelles faisant suite à un épisode infectieux, les arthrites associées à une maladie intestinale inflammatoire, les SpA à début juvénile et enfin les SpA indifférenciées.

1. La spondylarthrite ankylosante (SA)

La SA peut être considérée comme la forme emblématique des SpA, et également comme la plus sévère sur le plan structural. Son diagnostic n'est formellement établi qu'en présence d'une atteinte caractéristique des articulations sacro-iliaques, telle que mise en évidence par la radiographie du bassin, comme cela est décrit dans les critères originaux et modifiés de New York ¹⁶ (**Tableau 1**). Les autres manifestations les plus fréquentes de la SA sont l'atteinte rachidienne et les enthésites. Les études épidémiologiques indiquent que ce sous-type touche préférentiellement les hommes avec un ratio homme : femme de 2-3 : 1 ¹⁷.

2. Les arthrites réactionnelles (ARé)

La flore bactérienne peut être un élément déclencheur de la maladie, notamment lors des arthrites réactionnelles qui représentent environ 2% des SpA. Les facteurs environnementaux responsables de la survenue des autres sous-types de SpA restent pour la plupart inconnus. L'ARé est traditionnellement décrite comme une réaction articulaire inflammatoire aseptique (non infectieuse) à une infection bactérienne survenue quelques jours ou semaines plus tôt, d'où le terme d'arthrite réactionnelle. Le siège de l'infection bactérienne se situe en dehors de l'articulation, concernant l'intestin ou le tractus urogénital.

Les bactéries déclenchant ces ARé sont des entérobactéries telles que *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella*, *Campylobacter* ou des eubactéries comme *Chlamydia trachomatis* et *Chlamydia pneumoniae*. L'un des mécanismes pouvant expliquer le rôle de ces bactéries dans le déclenchement des ARé (mais qui reste discuté) serait la persistance de ces micro-organismes ou de leurs fragments, de façon anormalement prolongée dans l'organisme des patients.

Les facteurs génétiques jouent un rôle dans l'étiologie de la pathologie puisque l'allèle HLA-B27 est présent chez plus de 65% des patients atteints d'ARé. Cet allèle pourrait influencer les interactions bactérie/hôte et être notamment responsable d'un défaut d'élimination des bactéries par les cellules de l'hôte.

3. Les rhumatismes associés aux entérocolopathies inflammatoires (ou « arthrites associées aux MICI »)

Les entérocolopathies inflammatoires regroupent toutes les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Les plus fréquentes sont la rectocolite ulcéro-hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn. Elles se manifestent par des douleurs abdominales, une diarrhée chronique évoluant par poussées et la présence de sang ou de glaires dans les selles. Les MICI s'accompagnent dans 20 à 30 % des cas, de manifestations articulaires, qu'il s'agisse de sacro-illite, spondylite ou d'arthrite périphérique potentiellement destructrice.

L'atteinte inflammatoire de l'intestin correspond à une manifestation extra-articulaire associée aux SpA de façon fortuite, puisque 6,5% des patients atteints de SA développent une entérocolopathie inflammatoire durant leur vie (soit 20 fois plus que la population générale). Les liens entre l'inflammation de la muqueuse intestinale et les SpA apparaissent étroits. En effet, les rémissions de l'inflammation articulaire observées chez des patients souffrant de SpA sont souvent associées à une disparition de l'inflammation de l'intestin. Inversement, la persistance de l'inflammation locomotrice a été associée à une persistance de l'inflammation de l'intestin ¹⁸.

4. Le rhumatisme psoriasique (RhPso)

Le RhPso, ou arthrite psoriasique, est l'association de lésions cutanées de type psoriasis à des arthrites. Les aspects cliniques typiques du psoriasis cutané se traduisent par des lésions élémentaires érythémato-squameuses bien limitées, arrondies, ovalaires ou polycycliques (correspondant à des plaques rouges recouvertes d'une couche squameuse de couleur blanchâtre à gris argenté). Les localisations caractéristiques en sont les zones de frottement comme les coudes, les bords internes des avant-bras, les genoux, la région lombo-sacrée, le cuir chevelu, les paumes, les plantes, les ongles et l'ombilic. Le psoriasis est une manifestation plus fréquente au cours de SpA (15 à 20% des patients) que dans la population générale (3%). Par ailleurs, les lésions psoriasiques des ongles sont plus fréquemment observées chez des patients atteints d'arthrite psoriasique que chez ceux qui souffrent de psoriasis sans arthrite. Le RhPso s'accompagne d'arthrites périphériques souvent asymétriques et destructrices. La survenue de manifestations axiales s'observe dans près de 50% des cas, parfois après une longue évolution d'un rhumatisme périphérique ¹⁹.

5. Spondylarthrites à début juvénile

Les spondylarthrites juvéniles sont des arthrites inflammatoires débutant chez des enfants et répondant aux critères diagnostiques de spondylarthrite. Elles affectent de façon préférentielle de jeunes garçons, entre 8 et 13 ans. L'enthésite et la dactylite sont des caractéristiques prédominantes des formes à début juvénile. Les manifestations extra-articulaires sont plus fréquentes dans la SpA juvénile que dans la forme adulte. Ces formes peuvent évoluer à l'âge adulte vers une SA ou une autre forme clinique de SpA.

6. Formes indifférenciées des spondylarthrites (uSpA)

La SpA indifférenciée est l'un des sous-types les plus fréquents et correspondant à un rhumatisme inflammatoire chronique répondant aux critères de SpA mais ne pouvant être classée dans aucune des catégories précédentes. Il peut notamment s'agir de formes débutantes de la maladie. L'évolution des uSpA est variable, et plus de 50% des patients développent une SA dans les 10 années suivant le diagnostic de la maladie²⁰.

D. Les critères de classifications des SpA

Le diagnostic des SpA s'effectue souvent difficilement et tardivement, après plusieurs années d'évolution, du fait du caractère polymorphe des manifestations cliniques et de l'absence de test diagnostique possédant une sensibilité et une spécificité suffisantes. Le délai pour diagnostiquer une SpA a récemment été estimé à 7 ans en moyenne en France. Des systèmes de classifications ont été établis et validés au fil du temps, afin surtout d'améliorer la comparabilité des groupes de patients inclus dans les études. Ils sont relativement peu utilisables pour un diagnostic précoce, car ils ne suffisent pas toujours à identifier les formes débutantes de la maladie. Voici les différents critères de classifications proposés.

1. Les critères modifiés de New-York

Les critères modifiés de New-York ont été établis en 1984 pour classer les patients atteints de SA ¹⁶ (**Tableau 1**). Le diagnostic de SA est retenu si au moins un des trois critères cliniques et le critère radiologique sont remplis.

NEW YORK 1966 critères originaux	NEW YORK 1984 critères modifiés
<p>Diagnostic :</p> <p>1/ Limitation de la mobilité du rachis lombaire dans les 3 plans de l'espace : flexion antérieure, latéro-flexion et hyperextension</p> <p>2/ Douleur de la jonction dorso-lombaire ou du rachis lombaire</p> <p>3/ Limitation de l'expansion thoracique à 2,5 cm au moins, mesurée sur le 4^e espace intercostal.</p>	<p>Critères cliniques (au moins 1) :</p> <p>1/ Lombalgies et raideur lombaire de plus de trois mois améliorées par l'activité physique et non soulagées par le repos</p> <p>2/ Limitation de la mobilité du rachis lombaire dans le plan sagittal et frontal</p> <p>3/ Limitation de l'expansion thoracique par rapport aux valeurs de sujets de même âge et même sexe</p>
<p>Gradation radiographique (Normal 0, Suspecte 1, Sacroiliite minime 2, Sacroiliite modérée 3, Ankylose 4) :</p> <p><u>SA certaine :</u></p> <p>* Sacroiliite de grade 3-4 bilatéral avec au moins un critère clinique</p> <p>* Sacroiliite de grade 3-4 unilatéral ou grade 2 bilatéral avec le premier critère clinique ou avec les critères cliniques 2 et 3.</p> <p><u>SA probable :</u></p> <p>* Sacroiliite de grade 3-4 bilatéral sans critère clinique</p>	<p>Critères radiologiques :</p> <p>* Sacroiliite de grade \geq 2 si sacroiliite bilatérale</p> <p>ou</p> <p>* Sacroiliite de grade \geq 3 si sacroiliite unilatérale</p>

Tableau 1. Critères diagnostiques de la SA ¹⁶.

2. Les critères d'Amor

L'émergence du concept de SpA a conduit au début des années 1990 à l'élaboration de systèmes de classification basés sur des critères cliniques et radiologiques communs aux différentes entités du spectre de la SpA. Les critères d'Amor comportent une liste de douze signes sans mode d'entrée obligatoire. Un score total supérieur ou égal à six permet de déclarer le patient comme ayant une spondylarthrite. La plupart des patients atteints de SA selon les critères de New York modifiés répondent également aux critères d'Amor. L'analyse statistique de ces critères montre une sensibilité de 90 % et une spécificité de 87 % pour la classification des formes établies de SpA ²¹ (**Tableau 2**).

SIGNES CLINIQUES OU HISTOIRE CLINIQUE	Score
1/ Douleurs nocturnes lombaires ou dorsales ou raideur matinale lombaire ou dorsale	1
2/ Oligoarthritis asymétrique	2
3/ Douleur fessière sans précision	1
Douleur fessière à bascule	2
4/ Doigt ou orteil en saucisse	2
5/ Talalgie ou toute autre enthésopathie	2
6/ Iritis	2
7/ Urétrite non gonococcique ou cervicite moins d'un mois avant le début d'une arthrite	1
8/ Diarrhée aiguë moins d'un mois avant une arthrite	1
9/ Présence ou antécédent de psoriasis, de balanite, ou d'entérocolopathie chronique	2
SIGNES RADIOLOGIQUES	
10/ Sacro-iliite (stade>2)	2
TERRAIN GENETIQUE	
11/ Présence de l'antigène HLA-B27 ou antécédents familiaux de spondylarthrite, de MICI ou de psoriasis	2
SENSIBILITE AU TRAITEMENT	
12/ Nette amélioration en moins de 48 heures par anti-inflammatoires non stéroïdiens ou rechute à l'arrêt (<48 heures)	2
Le malade sera déclaré comme ayant une spondylarthrite si la somme des points des 12 critères est ≥ 6.	Sensibilité : 90% Spécificité : 87%

Tableau 2. Critères diagnostiques de la SpA d'Amor ²¹.

3. Les critères de l'European Spondylarthropathy Study Group (ESSG)

Ces critères offrent deux modes d'entrée possibles (non exclusifs) selon la présence d'une lombalgie inflammatoire, ou d'une arthrite périphérique. La présence d'un critère majeur et d'au moins un critère mineur permet de classer le patient comme ayant une spondylarthrite avec des sensibilité et spécificité de 87% ²² (**Tableau 3**).

Quelques différences existent entre les critères d'Amor et ceux de l'ESSG. En effet, les critères de l'ESSG, ne retiennent que les patients souffrant d'une atteinte rhumatismale axiale ou périphérique, alors que les critères d'Amor permettent de classer comme SpA des patients n'ayant aucune atteinte rhumatismale. De plus, la présence du HLA-B27 n'est utilisable que dans les critères d'Amor.

CRITERES MAJEURS	CRITERES MINEURS
1/ Synovites (passées ou présentes) asymétriques ou prédominant aux membres inférieurs Ou 2/ Douleurs du rachis lombaire, dorsal ou cervical (passées ou présentes) Présence des 3 à 5 critères suivants : <ul style="list-style-type: none"> * début avant 45 ans * début progressif * amélioration par l'exercice * raideur le matin * depuis plus de 3 mois 	1/ ATCD familiaux de spondylarthrite, psoriasis, uvéite, arthrite réactionnelle ou entérocolopathie 2/ Psoriasis (antécédent ou en cours) objectivé par un médecin 3/ Infection génitale ou digestive (un mois avant arthrite) 4/ Entérocolopathie (antécédent ou en cours, de Crohn ou rectocolite hémorragique) 5/ Enthésopathie (achilléenne ou plantaire) 6/ Douleur des fesses à bascule 7/ Sacro-iliite radiologique (stade 2-4 bilatéral ou 3-4 unilatéral selon la cotation suivante : 0= normal ; 1= possible ; 2= modérée ; 3= évoluée, 4= ankylose)
Il faut un critère majeur ET un critère mineur pour remplir les critères de classification.	Sensibilité : 87% Spécificité : 87%

Tableau 3. Critères diagnostiques de la SpA de l'ESSG.

4. Les critères de l'ASAS

Le développement de l'imagerie par résonance magnétique permettant de faciliter le diagnostic précoce de sacroiliite, et l'avènement des biothérapies anti-TNF comme traitement des SpA, ont suscité un intérêt pour améliorer les critères de classification des spondylarthrites. En effet, en 2009 le groupe ASAS/OMERACT (Assessment of Spondyloarthritis international Society - Outcome Measures In Rheumatology Clinical Trials) a validé de nouveaux critères de classification des SpA. Ces nouveaux critères ont été développés afin d'établir plus précocement le diagnostic de SpA, et notamment des formes axiales (**Figure 8**), pour lesquelles la classification inclut le critère IRM sacro-iliaque²³. De la même manière, l'ASAS a proposé un système de classification des spondylarthrites périphériques (**Figure 9**)²³. Ces critères d'ASAS ne concernent que les patients ayant débuté une SpA avant l'âge de 45 ans, et comme les critères ESSG, leur application dépend d'un mode d'entrée obligatoirement rhumatologique de la maladie.

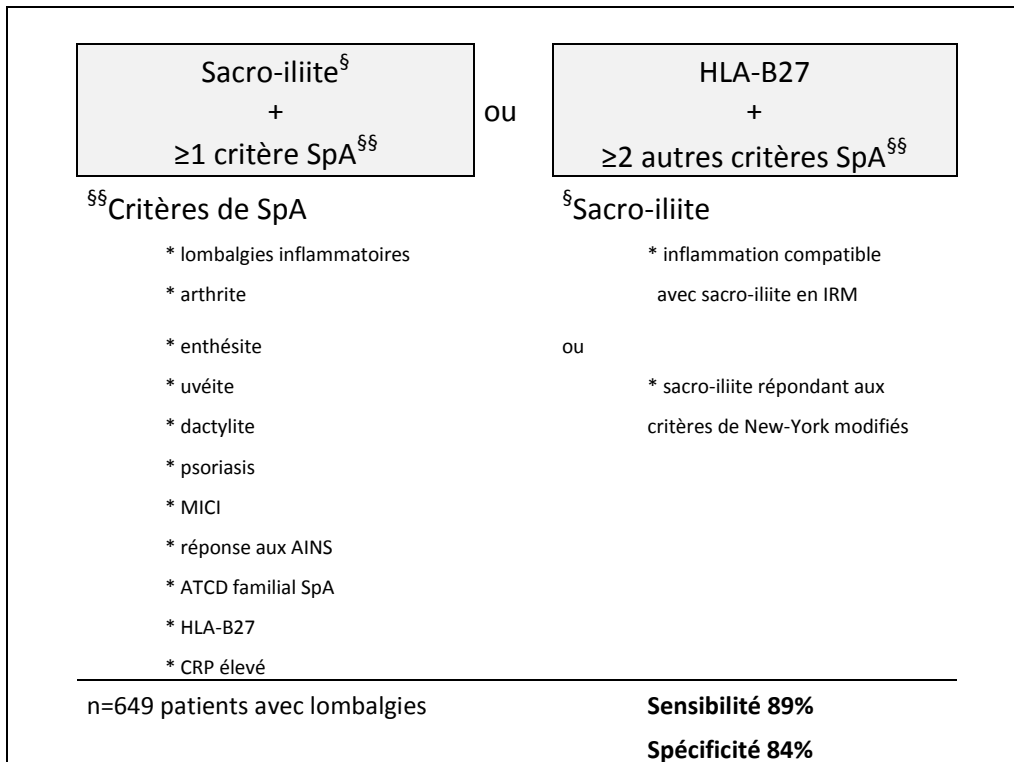


Figure 8. Critères de classification ASAS pour la spondylarthrite axiale.

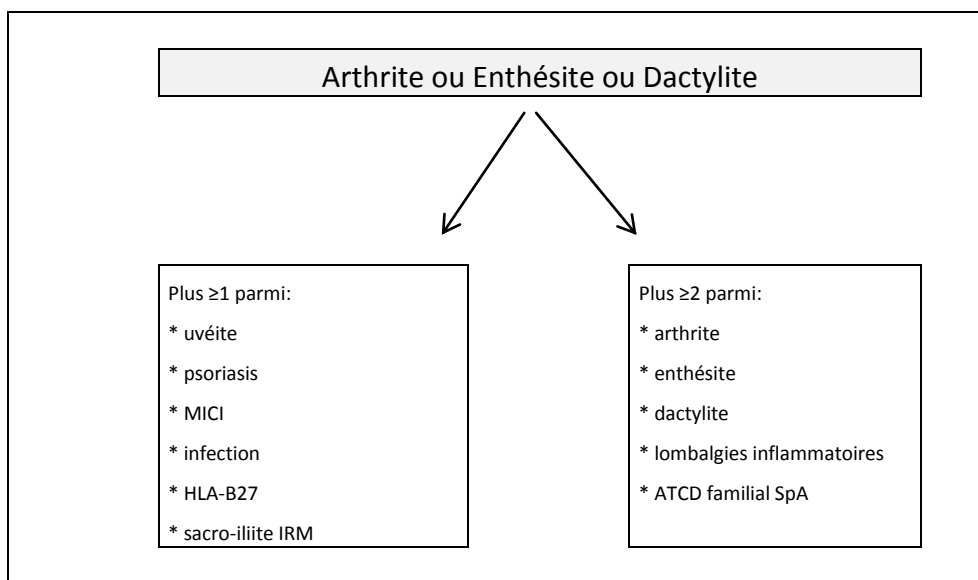


Figure 9. Critères de classification ASAS pour la spondylarthrite périphérique.

E. Epidémiologie des SpA

1. En France

Les études épidémiologiques des 20 dernières années indiquent que les spondylarthrites représentent le deuxième rhumatisme inflammatoire chronique le plus fréquent après la polyarthrite rhumatoïde, dans la population française ^{24 25}.

Une enquête menée à l'échelle nationale par le biais de questionnaires et d'interrogatoires téléphoniques, a évalué la prévalence des SpA dans la population adulte française à 0,30 % ²⁵, mais cette prévalence pourrait être en réalité plus élevée, compte tenu de la latence du diagnostic, et de la méthodologie utilisée dans cette étude ²⁶.

Contrairement à la polyarthrite rhumatoïde, la SpA peut survenir à tout âge, mais se déclare généralement chez l'adulte jeune ²⁷. Elle semblerait atteindre autant les femmes que les hommes (0,29% et 0,31%, respectivement) ^{25 28}, toutefois les formes les plus sévères sont plus souvent observées dans la population masculine ^{29 30}.

2. En Europe

Il est difficile d'évaluer de façon précise la prévalence de la SpA en Europe. En effet, son estimation varie entre 0,2% et 1,9% ³¹. Par exemple, la prévalence de la SpA en Ecosse est de 0,21% ³², alors que dans la population berlinoise elle est estimée à 1,9% ^{33 34}. Ces variations pourraient notamment être dues à l'utilisation de critères de classification et de méthodologies différentes selon les études. L'amplitude de fréquence de l'allèle HLA-B27 entre les différentes populations pourrait également expliquer une telle variabilité. En effet, l'étude allemande montre que chez les individus porteurs de l'allèle HLA-B27, la prévalence de la SpA atteint 13,5%. Fréquence de HLA-B27 et prévalence de la maladie semblent étroitement corrélées à travers le monde.

3. Dans le monde

La prévalence de la SpA est de 2,5% et celle du HLA-B27 de 25 à 40% chez les Eskimos d'Alaska ³⁵. Inversement, chez les Japonais il existe une très faible prévalence (0,007%) de SA, ce qui pourrait être attendu puisque seulement 0,5% de la population japonaise est porteuse de l'allèle HLA-B27 ³⁶. De même, la SA est extrêmement rare en Afrique sub-

saharienne, ce qui peut aussi s'expliquer du fait d'une prévalence du HLA-B27, inférieure à 1% dans cette partie du monde (Congo, Afrique du Sud et Nigeria) ²⁶. Cependant, en Afrique de l'Ouest où HLA-B27 est présent chez 2 à 9% des individus de la population, la pathologie est presque absente. Des facteurs autres que la faible fréquence de HLA-B27 doivent donc permettre d'expliquer la faible prévalence de SA ou de SpA dans certaines régions du monde, comme certaines zones d'Afrique sub-saharienne.

F. Traitements

La SpA est une maladie inflammatoire systémique. Son traitement doit donc être adapté au sous-type de la maladie (atteintes rhumatismales et/ou extra-articulaires), à la sévérité des symptômes et au profil du patient (âge, sexe et sensibilité à certains types de traitements). Sur le plan articulaire, le traitement est avant tout symptomatique, visant à réduire les douleurs et raideurs, ainsi qu'à prévenir d'éventuelles complications de la maladie. Ce traitement repose sur l'administration de médicaments généralement associée à une rééducation physique.

1. Traitement médicamenteux

a) Les anti-inflammatoires

(1) Les AINS

Le traitement de première ligne d'un patient atteint de spondylarthrite repose sur la prise d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), visant à réduire l'inflammation articulaire et la douleur et à améliorer la mobilité. Il pourrait également induire dans certains cas une véritable rémission de la maladie et prévenir l'apparition des lésions osseuses ankylosantes, mais cela n'a pas été totalement démontré. Il faut néanmoins noter qu'environ 25% des patients ne répondent pas à ce type de traitement et qu'une proportion significative d'entre eux présentent une intolérance gastrique lors de la prise prolongée d'AINS, rendue cependant nécessaire pour contrôler la maladie chronique, ce qui peut conduire à l'échec de cette stratégie thérapeutique.

(2) Les corticoïdes

Des traitements corticoïdes peuvent être prescrits à la place ou en complément des AINS. Par voie générale ils sont souvent peu ou pas efficaces sur l'inflammation ostéo-articulaire, alors que leur administration locale intra-articulaire peut s'avérer remarquablement efficace, de même que leur utilisation pour traiter les atteintes extra-articulaires (uvéite, psoriasis, MICI).

b) Les traitements de fond «classiques»

En cas d'insuffisance des traitements anti-inflammatoires précédents, d'autres types de traitement à action plus lente peuvent être prescrits, tels que la sulfasalazine et le méthotrexate. Ils sont surtout efficaces en cas d'atteinte articulaire périphérique et/ou extra-articulaire. Mais à l'heure actuelle aucun de ces traitements de fond n'a formellement démontré son efficacité dans des études contrôlées sur les atteintes articulaires axiales, qui sont les plus fréquentes.

c) Les anti-TNF α

Le Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF α) est un médiateur faisant partie du groupe des cytokines, qui est notamment produit par les lymphocytes T et les macrophages activés. Ce médiateur protéique peut induire l'apoptose de cellules cibles, ou au contraire l'activation et la prolifération de celles-ci. Le TNF α peut également induire dans ces cellules l'acquisition de fonctions effectrices telles que la production d'autres médiateurs impliqués dans l'inflammation (IL-1, IL-6, métalloprotéases...). Au cours de certaines maladies comme les SpA, sa présence en excès favoriserait l'inflammation chronique et la destruction de l'os. Les inhibiteurs du TNF α sont prescrits quand la maladie est sévère et persistante malgré les traitements conventionnels. Ils possèdent un effet symptomatique extrêmement efficace et permettent une amélioration de la qualité de vie dans toutes les formes de SpA. Le blocage du TNF α permettrait également d'empêcher l'évolution de la maladie vers la destruction articulaire. Ce type de traitement comporte peu d'effets secondaires en dehors d'une augmentation du risque infectieux, comme celui d'une réactivation d'une tuberculose latente. Compte tenu des avantages de ce traitement, il est proposé qu'il soit prescrit en deuxième intention en cas de réponse insuffisante ou d'intolérance aux AINS, malgré son coût élevé, estimé à 15.000 euros par an et par patient. Les anti-TNF α sont administrés en

injections, par voie intraveineuse ou sous-cutanée, selon le produit utilisé. Aujourd'hui, quatre molécules bénéficient d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans la SpA :

-l'infliximab (Rémicade[®]) : Anticorps monoclonal chimérique qui se compose d'une partie variable d'origine murine reconnaissant le TNF α humain et d'une partie conservée humaine.

Il est dirigé contre la cytokine soluble ou fixée à son récepteur.

-l'éta nercept (Enbrel[®]) : Récepteur soluble du TNF α humain dimérisé.

-l'adalimumab (Humira[®]) : Anticorps monoclonal entièrement humain.

-le golimumab (Simponi[®]) : Anticorps monoclonal complètement humain. Il se lie aux formes solubles et transmembranaires du TNF α humain et forme des complexes stables avec celles-ci, empêchant ainsi le TNF α de se fixer à ses récepteurs.

Une autre molécule, le certolizumab pegol (Cimzia[®]), présente des résultats très encourageants de l'étude clinique menée en phase 3, mais elle n'a pas encore reçu son AMM. Elle est déjà autorisée dans certains pays pour traiter la PR et la maladie de Crohn. Il s'agit d'un fragment F(ab)' pégylé humanisé d'un anticorps monoclonal qui se lie aux formes solubles et transmembranaires du TNF α humain.

2. Rééducation fonctionnelle

La SpA est une maladie qui entraîne un enraidissement et une déformation principalement du squelette axial nécessitant le recours à la rééducation en complément des traitements médicamenteux. En effet, la rééducation fonctionnelle favorise la réduction des douleurs, l'amélioration de la mobilité et la prévention des déformations responsables d'attitudes vicieuses. La rééducation est réalisée avec l'aide d'un kinésithérapeute qui pourra aussi enseigner au patient des exercices personnels, de posture et de gymnastique, à effectuer quotidiennement seul chez lui. Une rééducation respiratoire est recommandée afin de prévenir une éventuelle ankylose de la cage thoracique. Enfin, cette rééducation doit s'accompagner d'une hygiène de vie adaptée : literie de bonne qualité et activités physiques régulières. L'appareillage peut permettre de lutter contre les déformations, telles que les orthèses plantaires, les corsets plâtrés ou les attelles de postures.

Chapitre 2

II. Modèle de rat transgénique pour HLA-B27

Bien que l'association de la SpA à l'allèle HLA-B27 ait été découverte il y a 40 ans⁷, les mécanismes biologiques sous-jacents demeurent inconnus. Afin d'étudier le rôle de B27 dans ces maladies, en 1990, Joël Taurog et Robert Hammer, ont produit des rats transgéniques pour le gène HLA-B*2705 et celui de la β_2 -microglobuline humaine (β_2m)³⁷. Plusieurs lignées de rats transgéniques HLA-B27 ont ainsi été générées par micro-injection d'ADN génomique humain dans des œufs fécondés de rat. Le nombre de copies intégrées s'est fait de manière aléatoire en un seul site propre à chaque lignée^{37 38} (**Tableau 4**).

Lignée	Transgène HLA	Nombre de copies du transgène HLA	Nombre de copies du transgène β_2m	Fond génétique	Développement de la maladie	
					Hémizygotes	Homozygotes
33-3	B*2705	55	66	F344	oui	ND
21_3	B*2705	20	15	Lewis	non	oui
21-4H	B*2705	150	90	Lewis	oui	ND
21-4L	B*2705	6	6	Lewis	non	non
120-4	B*0702	26	5	Lewis	non	non

Tableau 4. Principales lignées de rats transgéniques pour le HLA-B27 ou le HLA-B7 et la β_2m humaine.

De façon spectaculaire, une maladie inflammatoire rassemblant les manifestations décrites au cours de la SpA (arthrites, psoriasis, inflammation intestinale) se développe spontanément à partir de 6 semaines dans les lignées ayant intégré un grand nombre de copies du transgène HLA-B27 (>40)³⁹. A l'inverse les rats transgéniques pour HLA-B7 (lignée 120-4), un allèle du CMH de classe I proche du HLA-B27, ne présentent pas ces atteintes inflammatoires. Le développement de la spondylarthrite du rat (SpAr) est donc spécifique de HLA-B27³⁸ et ne résulte pas de la surexpression d'un quelconque allèle du CMH de classe I.

A. La spondylarthrite du rat

Les premiers signes cliniques observés chez les rats malades sont très souvent liés à une inflammation gastro-intestinale sévère, se manifestant sous forme de diarrhée. Cette atteinte chronique s'aggrave au cours du temps et peut devenir hémorragique. Les études histologiques ont montré une prédominance des lésions au niveau du côlon et du caecum. Elles se caractérisent par une infiltration de la lamina propria par des cellules inflammatoires (lymphocytes, macrophages, neutrophiles), une hyperplasie des cellules épithéliales et des abcès cryptiques³⁷. Chez l'homme, ces atteintes intestinales surviennent moins fréquemment, chez 5 à 10% des patients atteints de SpA, et sont classées en « maladie de Crohn » ou en « rectocolite hémorragique »^{40 41}.

Les rats transgéniques B27 développent également des arthrites périphériques, sous forme de gonflement ou d'érythèmes des pattes arrière. Ces atteintes articulaires se manifestent aléatoirement (localisation et durée), peuvent être chroniques ou récidivantes. Les articulations des doigts et du carpe, le squelette axial et les enthèses peuvent aussi être touchés, mais moins fréquemment.

D'autres manifestations extra-articulaires sont également observées dans ces lignées B27 telles que des lésions de la peau et des ongles, proches histologiquement du psoriasis humain⁴². Une inflammation du tractus génital chez le rat mâle, caractérisée par une orchite et responsable de leur stérilité, est souvent constatée. Enfin, les rats atteints de SpAr peuvent développer, plus rarement, des myocardites et des uvéites.

L'ensemble de ces atteintes, articulaires et extra-articulaires, caractéristiques de la SpA humaine, sont également spécifiques chez le rat, de la présence de HLA-B27. Ce qui conforte l'unicité la spondylarthropathie, considérant que toutes ces manifestations cliniques correspondent à différents modes d'expression d'une même maladie déterminée par des facteurs prédominants communs dont fait partie le terrain génétique, ici représenté par le HLA-B27^{43 44}.

B. La part des facteurs génétiques et environnementaux

Le développement de la SpAr chez les rats transgéniques B27 dépend de leur fond génétique propre. En effet, les fonds *Fisher* et *Lewis* sont permissifs, ce qui n'est pas le cas du fond *Dark Agouti*, qui protège de la maladie³⁸. Ces différences révèlent, comme chez

l'homme, l'importance de facteurs génétiques propres au rat et donc le caractère multigénique de la maladie.

La flore bactérienne joue également un rôle majeur dans le développement de la SpAr. En effet, les rats transgéniques élevés en isolateur stérile (condition « germ-free ») ne développent plus d'atteinte intestinale ou articulaire ⁴⁵. Par ailleurs, ces inflammations se manifestent à nouveau lors de la reconstitution d'une flore bactérienne intestinale. Étonnamment, les lésions de la peau et des organes génitaux semblent échapper à l'influence de la flore bactérienne. Ces dernières manifestations seraient donc principalement causées par un dérèglement endogène de la réponse inflammatoire.

Le rôle joué par les bactéries sur le déclenchement de la SpAr a été étudié par Rath *et al.* en 1996 ⁴⁶. Aucune spécificité d'espèce absolue n'a été observée, cependant la colonisation par des bactéries anaérobies du genre Bactéroïde, spécifiquement *B. vulgatus*, suffit à induire une inflammation articulaire et intestinale marquée. Ces atteintes semblent résulter d'une réaction inflammatoire anormale de la muqueuse intestinale, qui prendrait son origine au niveau du caecum et se propagerait à tout l'intestin et aux articulations. Chez l'homme, la physiopathologie de l'Aré présente des similitudes avec celle de la SpAr. En effet, la destruction de l'épithélium de la muqueuse digestive par des bactéries pathogènes entéro-invasives, exposant la lamina propria aux composants de la flore bactérienne induit une forte inflammation.

C. Les mécanismes immunologiques de la SpAr

1. Expériences de transfert cellulaire *in vivo*

En 1993, Breban *et al.* se sont intéressés aux mécanismes immunologiques à l'origine de cette maladie inflammatoire multi-systémique du rat ⁴⁷. La SpAr a été induite chez des rats sains (non transgéniques ou transgéniques B27 provenant d'une lignée ne développant pas spontanément de SpAr) par des expériences de greffe de moelle osseuse contenant les cellules souches hématopoïétiques de rats HLA-B27 malades ⁴⁷. Cette étude a démontré que le développement de la maladie ne nécessitait pas l'expression du transgène B27 par les cellules épithéliales de l'organe cible. Son expression était plutôt restreinte aux cellules d'origine hématopoïétiques infiltrant la muqueuse.

Les lymphocytes T (LT) jouent cependant un rôle essentiel puisque les rats transgéniques B27 athymiques (rats « nude »), dépourvus de LT thymo-dépendants, sont protégés du développement de la maladie. L'injection de LT purifiés, provenant de donneurs transgéniques ou non, s'accompagne de l'apparition des manifestations inflammatoires chez ces rats « nude »⁴⁸.

La molécule HLA-B27 étant une molécule du CMH de classe I, certaines hypothèses proposent qu'une réponse lymphocytaire pathogène médiée par des LT CD8⁺ pourrait expliquer la SpA. Toutefois, Breban *et al.* ont mis en évidence une bien plus grande efficacité des LT CD4⁺ par rapport aux LT CD8⁺ pour induire la SpAr chez des rats B27 nude⁴⁸. De plus, les LT CD8⁺ des rats transgéniques B27 malades n'expriment pas un phénotype de cellules activées, ne subissent pas d'expansion clonale et leur déplétion ne modifie pas l'expression de la maladie^{49 50}. A l'inverse, les LT CD4⁺ subissent une expansion clonale importante, indiquant ainsi que ces cellules seraient des cellules effectrices de la maladie. Néanmoins, ces LT ne sont pas suffisants pour induire la maladie puisque le transfert isolé de LT de rats malades B27 à des rats témoins ne permet pas son apparition⁴⁸.

Ces différents travaux démontrent ainsi le rôle joué, par des cellules d'origine hématopoïétiques exprimant un niveau élevé de HLA-B27 et par les LT CD4⁺, dans le développement de la SpAr. Parmi les cellules hématopoïétiques, les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles, telles que les cellules dendritiques (DC), les lymphocytes B activés, ou les monocytes/macrophages paraissent être les meilleures candidates⁴⁷. Une interaction entre les LT CD4⁺ et des CPA HLA-B27⁺ pourrait être à l'origine de la maladie.

2. Rôle des cellules dendritiques dans la SpA ?

a) Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) sont des CPA dites « professionnelles » qui ont pour rôle d'apprêter les antigènes captés dans les tissus, de migrer vers des organes lymphoïdes, afin de les présenter aux LT et d'induire une réponse immune adaptative, spécifique de ces antigènes. Durant ce processus, les DC immatures acquièrent un phénotype mature, caractérisé par la forte expression de certains marqueurs de surface comme les molécules du CMH de classe I et II et les molécules de co-stimulation, leur permettant d'activer les LT.

Au sein de notre laboratoire, les travaux sur les CPA dans les SpA se sont focalisés sur la DC qui présente la propriété remarquable de pouvoir activer les LT CD4⁺ naïfs qui, une fois activés, semblent jouer un rôle prépondérant dans la pathologie.

b) Les DC jouent-elles un rôle dans la SpA ?

Les DC provenant de rats transgéniques HLA-B27 ont un défaut d'activation des LT CD4⁺ allogéniques ou syngéniques⁵¹. Cette anomalie fonctionnelle n'est pas due à la maladie mais à l'expression du transgène HLA-B27. En effet, elle a également été observée chez les rats « nude » B27 protégés du développement de la SpAr, alors qu'elle ne l'est pas chez des rats non transgéniques ou transgéniques pour le HLA-B7. Par ailleurs, la formation d'une synapse immunologique stable entre DC B27 et LT est diminuée, impliquant un déficit d'engagement des molécules de co-stimulation tel que le couple CD86/CD28 et cela indépendamment de l'engagement du TCR. Ce phénomène ne s'avère pas être une conséquence de l'immaturation des cellules ou de la production de facteurs inhibant l'activation des LT⁵¹⁻⁵³.

Des protéines différentiellement exprimées entre les DC spléniques de rats malades et celles de rats témoins (rats HLA-B7 et non transgéniques) ont été mises en évidence par une étude protéomique⁵⁴. Elles peuvent être classées en trois groupes fonctionnels : celles impliquées dans le « processing » de l'antigène et la réponse UPR (« unfolded protein response »), dans la mobilité du cytosquelette et dans la synthèse du CMH de classe II. Par ailleurs, un défaut de mobilité des DC de rats malades, une augmentation de l'apoptose et une diminution de l'expression des molécules du CMH II ont été observés.

Ces résultats s'accordent avec l'hypothèse qu'une forte expression de B27 par les DC induirait une anomalie fonctionnelle de ces cellules conduisant à une rupture de la tolérance immunitaire médiée par les LT CD4⁺, entraînant ainsi une réponse immunitaire exagérée dirigée contre les bactéries du tractus intestinal^{48 55}.

3. Inflammation et SpAr

Les sites principaux de l'inflammation et notamment la muqueuse intestinale ont fait l'objet d'études conduisant à l'identification de nombreuses cytokines ou autres médiateurs

solubles exprimés au cours de la maladie. L'interféron (IFN)- γ et l'IL-2 sont des cytokines produites précocement au sein de la muqueuse intestinale, suggérant une réponse pro-inflammatoire de type TH1. La présence d'IL-1 α , d'IL-1 β , de TNF α , de macrophage inflammatory protein 2 et la production par l'épithélium intestinal d'oxyde nitrique (NO) par la NO synthase inductible (iNOS) ont également été identifiés à la phase d'état de la maladie³⁸. Le rôle de ces différents acteurs de l'inflammation dans la SpAr reste cependant imparfaitement établi. En effet, l'administration aux rats d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire inhibant la production d'IFN γ et d'IL-2), n'a pas eu d'effet sur la pathologie. A l'inverse, une aggravation de la sévérité des arthrites et de l'inflammation intestinale a été observée lors de l'inhibition de l'iNOS, indiquant l'effet protecteur du NO produit par la muqueuse intestinale dans la SpAr. En revanche, l'administration d'anti-TNF α s'est révélée efficace en réduisant l'inflammation de l'intestin et des articulations des rats malades^{56 57}.

Une augmentation d'IL-23 a également été identifiée de façon plus récente, notamment dans le colon des rats malades. La quantité d'IL-17 produite est, elle aussi, amplifiée et corrélée avec celle de l'IL-23 dans les tissus inflammatoires. La cytokine IL-23 est synthétisée par les APC et participe à la stabilisation et l'amplification du phénotype Th17, alors que l'IL-17 est produite par les Th17, et participe à la réponse pro-inflammatoire.

Afin de comprendre l'implication respective des DC et des LT CD4⁺ dans la SpAr, des travaux menés conjointement sur ces populations cellulaires ont montré que les DC provenant de rats transgéniques B27 favorisaient la différenciation de lymphocytes Th17 caractérisés par la production d'IL17 α et de TNF α ^{58 59}.

Le modèle du rat transgénique HLA-B27 a ainsi permis de mieux comprendre les événements cellulaires et moléculaires impliqués dans la SpA. Cependant les mécanismes mis en jeu sont complexes et les différentes études menées dans ce modèle n'ont pas encore permis d'en comprendre parfaitement tous les aspects.

Chapitre 3

III. Génétique de la SpA

A. Epidémiologie génétique

1. Quels sont les arguments pour l'implication de facteurs génétiques dans le déterminisme des SpA ?

Comme je l'ai précédemment décrit, le concept de SpA comme groupe pathologique est né en 1974. Auparavant, les études épidémiologiques concernaient principalement le sous-type le plus fréquent, la SA. A partir de 1918, l'implication de facteurs génétiques dans la pathogénie de ce phénotype a été suspectée face à l'observation d'agrégations familiales⁶⁰. Dans les années 1950, les premières études épidémiologiques basées sur le caractère héréditaire de la pathologie et reposant sur des diagnostics établis avec précision ont vu le jour^{60 61}. Une des premières études, celle de De Blécourt *et al.* en 1961, a comparé la prévalence de la SA entre deux échantillons d'individus :

- 2 478 sujets apparentés de 100 individus atteints de SA
- 2 441 individus témoins

45 personnes atteintes de SA ont été identifiées au sein du premier échantillon (1,8%) et seulement 2 dans le second (0,08%).

Le risque relatif de récurrence d'une maladie (λ) se définit comme le rapport entre le risque de récurrence chez un individu apparenté à un malade et le risque d'un individu pris au hasard dans la population (prévalence). Dans le cas présent, le risque relatif était donc $\lambda=22,5$ (1,8/0,08).

En 2000, une méta-analyse des données disponibles de 7 études familiales a également permis d'estimer le risque de développer une SA, selon le lien de parenté avec le patient, au sein d'un échantillon davantage représentatif de la population générale⁶². Les résultats ont indiqué un risque de SA de 8,2% chez les apparentés de premier degré (8,2% chez les germains* et 7,9% chez les parents). Avec une prévalence de SA de 0,1% dans la

population générale, le risque relatif a été évalué à : $\lambda_1^{\text{‡}}_{(SA)}=82$ (=8,2/0,1). Chez les apparentés de second et troisième degrés, le risque diminuait à 1% ($\lambda_{2(SA)}=10$) et 0,7% ($\lambda_{3(SA)}=7$) respectivement.

Pour ce qui est du caractère héréditaire des autres sous-types de SpA, des travaux ont été rapportés à partir de 1969⁶³⁻⁶⁵. Cependant, en ce qui concerne la SpA dans son ensemble, une seule étude épidémiologique chez des apparentés de premier degré de patients atteints de SpA a été menée à ce jour en France⁶⁶. Cette étude a évalué, comme cela était déjà le cas pour la SA, la fréquence de SpA équivalente entre parents et germains, de l'ordre de 12%. Prenant une prévalence de SpA de 0,3% dans la population française, le risque relatif a été estimé à $\lambda_{1(SpA)}=40$ (=12/0,3).

Ces études familiales ont ainsi permis de mettre en évidence l'implication de facteurs génétiques dans le déterminisme de la SA mais également de la SpA dans sa globalité.

2. Quels sont ces facteurs génétiques ?

En 1973, deux équipes ont identifié parallèlement une très forte association de la SA à l'antigène tissulaire HLA-B27. En effet, Schlosstein *et al.* ont observé 35 individus positifs pour HLA-B27 parmi 40 patients (88%). A l'inverse, seulement 73 personnes sur 906 (8%) ont été identifiées positives pour cet antigène tissulaire au sein de l'échantillon témoin⁷. De manière analogue, l'équipe anglaise releva 96% de patients pour 4% d'individus sains, positifs pour l'allèle HLA-B27⁶⁷.

Puis à partir de 1977, des études aspirant à déterminer la prévalence de HLA-B27 au sein de familles de patients atteints de SA et leurs apparentés se sont multipliées⁶⁸⁻⁷⁰.

Concernant les autres sous-types de SpA, c'est à partir de 1974 qu'ils ont eux aussi été associés à l'antigène HLA-B27⁷¹⁻⁷³.

Ce type d'étude familiale s'étendit à la SpA dans sa globalité en 1998 avec les travaux de Braun *et al.*, menés sur la population Berlinoise³³. Puis une étude française évalua la fréquence de la maladie à 22,7% chez les apparentés de premier degré B27⁺ (en prenant en considération les apparentés B27 négatifs, ce risque s'abaissait à 12%)⁶⁶.

* Individus de la même fratrie.

‡ Risque relatif chez les apparentés de premier degré.

L'ensemble de ces travaux a ainsi permis de mettre en évidence les premiers éléments en faveur d'un facteur génétique majeur de susceptibilité à la SpA, HLA-B27.

3. Concordance de développement de la SA chez les jumeaux monozygotes et dizygotes ?

Un autre argument à l'appui du rôle de facteurs génétiques dans la susceptibilité à cette maladie pourrait être apporté par l'étude de jumeaux, comparant la concordance pour la survenue de la SA dans des paires de jumeaux monozygotes (MZ) et dizygotes (DZ). Le taux de concordance pour une maladie chez les jumeaux correspond au rapport entre le nombre de paires de jumeaux présentant deux individus atteints et le nombre total de paires étudiées. Deux jumeaux concordants présentent donc le même phénotype, ce qui n'est pas le cas des jumeaux discordants.

Schématiquement, les jumeaux MZ ont le même génotype mais partagent aussi le même environnement alors que les jumeaux DZ n'ont en commun que la moitié de leur patrimoine génétique alors qu'ils partagent également le même environnement. Ainsi, la discordance entre jumeaux MZ est d'origine purement environnementale, alors que la discordance entre jumeaux DZ est d'origine mixte : génétique et environnementale. Si le taux de concordance pour les paires de jumeaux MZ est supérieur à celui des paires de jumeaux DZ, cela signifie que des facteurs génétiques sont en cause.

Deux études se sont intéressées au taux de concordance chez les jumeaux atteints de SA. Celle de Jarvinen *et al.* comprenait 26 paires de jumeaux de même sexe (6 MZ et 20 DZ), avec au moins un individu par paire présentant un diagnostic de SA ⁷⁴. Le taux de concordance chez les paires MZ B27⁺ atteignait 50%, alors que les jumeaux DZ présentaient des taux de concordance de 15%, et 20% lorsque n'étaient prises en compte que les paires concordantes pour B27. Les jumeaux MZ présentaient donc un taux de concordance bien supérieur à celui des DZ, indiquant l'implication de facteurs génétiques dans le déterminisme de la SA.

Une autre étude a été menée sur 40 paires de jumeaux (8 MZ et 32 DZ) ⁷⁵. Les taux de concordance chez les DZ atteignaient 12,5% et 27% lorsque les paires étaient toutes B27⁺ alors que chez les MZ B27⁺ le taux de concordance était égal à 75%. Les auteurs ont ainsi

estimé l'héritabilité à plus de 90%. Par ailleurs, les différences de taux de concordance entre MZ et DZ (48% après ajustement sur B27), ont permis de confirmer le rôle de B27 tout en suggérant l'existence d'autres facteurs de prédisposition génétiques.

4. Implication d'autres facteurs génétiques que le HLA-B27 ?

Les premiers travaux évoquant l'implication d'autres facteurs génétiques que l'antigène HLA-B27 dans le déterminisme de la SA datent de 1983 ⁷⁶. Cette étude portait sur 2 échantillons d'individus:

- 282 apparentés de premier degré de 79 individus B27 positifs atteints de SA
- 217 apparentés de premier degré de 69 donneurs sains B27 positifs

50% des individus du premier échantillon étaient B27 positifs (142/282), dont 10,6% (15/142) atteints de SA. Au sein du deuxième échantillon, la même proportion de personnes B27⁺ fût observée (50% soit 108/217), mais seulement 1,9% (2/108) d'entre elles avaient une SA. Le risque relatif de récurrence de SA était de 5,6 (10,6/1,9) : le risque de développer la maladie était donc plus de cinq fois supérieure si l'individu appartenait au premier échantillon. Les deux hypothèses proposées par l'auteur afin d'expliquer la différence de prévalence observée entre les 2 groupes d'apparentés étaient :

- que la molécule HLA-B27 soit différente entre les patients et les sujets sains.
- que d'autres gènes que HLA-B27 soient impliqués dans la prédisposition à la maladie.

Une étude similaire a été menée au Pays-Bas, où la fréquence de HLA-B27 était de 7,8% dans la population générale ⁷⁷. Ces travaux portaient sur :

- des apparentés au premier degré de 20 individus B27⁺ atteints de SA dont 21% (5/24) avaient eux-mêmes une SA.
- des individus B27⁺ provenant d'un échantillon de 2 957 témoins recrutés dans la population générale dans le cadre d'une étude épidémiologique dont 1,3% (3/230) présentaient la maladie.

Le risque relatif dans cette étude était donc égal à 16 (21/1,3), ce qui signifiait qu'il y avait 16 fois plus de risques de développer une SA si l'on était un apparenté au premier degré de patients atteints B27⁺ par rapport à une personne B27⁺ provenant de la population générale.

Van der Linden *et al.* suggèrent ainsi le rôle d'autres facteurs génétiques que HLA-B27 pour expliquer le déterminisme génétique de la SA.

Les études d'agrégation familiale et de jumeaux ont montré que la composante génétique de la maladie n'était pas totalement expliquée par la présence du HLA-B27. En vue de modéliser l'implication des différents locus dans la prédisposition génétique à la SA, Brown *et al.* proposèrent de définir un modèle de susceptibilité génétique à la maladie en se basant sur l'exploration de risques relatifs de récurrence chez les apparentés calculés lors de travaux précédents ⁶². L'auteur présenta un modèle oligogénique, de trois à neuf gènes (incluant HLA-B27), en interaction épistatique les uns aux autres, et en exerçant entre eux des effets multiplicatifs.

D'autre part, il était d'un intérêt particulier d'estimer le poids génétique des gènes non-HLA en calculant le $\lambda_{\text{non-HLA-B27}}$, qui est le rapport entre la fréquence de la maladie chez les apparentés de patients porteurs du B27 et celle de la maladie chez les porteurs du HLA-B27 dans la population générale. Dernis *et al.* ont ainsi estimé le $\lambda_{\text{non-HLA-B27}}$ à 6,5 ⁶⁶. Pour ce qui est de la contribution génétique de HLA-B27, elle serait seulement de 5 à 7 selon les études, ce qui corrobore les estimations déduites des analyses de liaison pangénomiques ⁶⁶
78-80 .

Enfin, ces différentes études suggèrent que la région HLA, très associée à tous les sous-types de la maladie, serait responsable d'environ la moitié de la part génétique de la SpA et que l'autre moitié serait due à des facteurs localisés en dehors du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Dernièrement, d'autres études ont estimé la contribution génétique du gène *HLA-B27* dans les SpA à environ 30-40 % ^{30 81 82}. Ainsi, il semble très probable que d'autres facteurs génétiques localisés en dehors du CMH soient impliqués. Néanmoins, il apparaît aussi que d'autres allèles au sein du CMH, distincts de HLA-B27 pourraient jouer un rôle.

B. Quel sont les autres facteurs génétiques de la SpA ?

1. Etude des facteurs génétiques du Complexe Majeur d'Histocompatibilité

a) Rappels sur le système HLA

(1) Le locus génétique

Le gène *HLA-B* appartient au Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), lequel joue un rôle majeur dans l'immunité. Le CMH se compose en effet de plusieurs systèmes, dont le système HLA (Human Leukocyte Antigen), découvert par Jean Dausset en 1958 pour sa capacité à induire le rejet de greffe allogénique⁸³. Cette région génomique est située sur le bras court du chromosome 6 (6p21.3) et s'étend sur 3 600 kilobases (kb). Son séquençage complet en 1999 a permis l'annotation de 224 gènes, soit une moyenne d'un gène tous les 16 kb^{84 85}. L'étude des séquences situées de part et d'autre du CMH a ensuite conduit à identifier des gènes synténiques* chez la souris, ce qui amena à étendre les limites du CMH humain, pour définir le « CMH étendu », qui représente 7,6 Mb^{86 87}. Il se compose de 421 loci correspondant à 60% de gènes exprimés et 7% de gènes transcrits. Cette région est génétiquement associée à plus d'une centaine de maladies, dont de nombreuses en lien avec le système immunitaire⁸⁵. C'est également la région du génome la plus dense en gènes et la plus polymorphe⁸⁷. Elle se compose de trois sous-régions du centromère au télomère : celles de classe II, de classe III et de classe I (**Figure 10**) :

- **Les gènes de classe II** (la plus centromérique) comprennent des gènes principaux codant pour les molécules HLA-DR, HLA-DQ et HLA-DP ainsi que d'autres gènes codant pour des molécules intervenant dans la présentation des antigènes, comme TAP1 et TAP2.
- **Les gènes de classe III** (intermédiaire) contiennent des éléments du complément, des molécules de l'inflammation (TNF α et β) et des protéines de choc thermique (HSP70).

⁸³ Greffe provenant d'un autre organisme humain, par opposition à l'autogreffe.

* Conservation de l'ordre des gènes entre deux espèces différentes.

- **Les gènes de classe I** (la plus télomérique) comportent les gènes majeurs d'histocompatibilité codant pour les molécules HLA-A, HLA-B et HLA-C (molécules HLA dites « classiques »), ainsi que des gènes HLA mineurs tels que *HLA-E*, *HLA-F*, *HLA-G* et *MIC* (molécules dites « non classiques »).

Les régions de classe I et II sont riches en pseudogènes^φ : il semblerait que certains gènes se soient dupliqués de nombreuses fois, générant de nouveaux membres de ces familles de gènes, qui ont évolué vers de nouvelles fonctions⁸⁴.

Ces gènes sont considérés comme co-dominants (leurs allèles sont toujours exprimés quand ils sont présents) et fortement polyalléliques (2 128 allèles pour l'ensemble des gènes de classe I et 954 allèles pour l'ensemble des gènes de classe II) (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>).

L'ensemble des gènes du CMH est généralement transmis en bloc, les recombinaisons sont rares ($\leq 1\%$ en moyenne) et les pressions de sélection importantes. Il en résulte donc un fort déséquilibre de liaison (DL) entre les allèles de certains gènes du CMH. Cette affirmation est cependant à nuancer car l'haplotype exerce une influence très importante sur le DL.

^φ Le terme « pseudogène » fait référence à un gène inactif. Durant longtemps la communauté scientifique a considéré ces éléments comme totalement inutiles, mais aujourd'hui il a été montré qu'ils peuvent jouer un rôle.

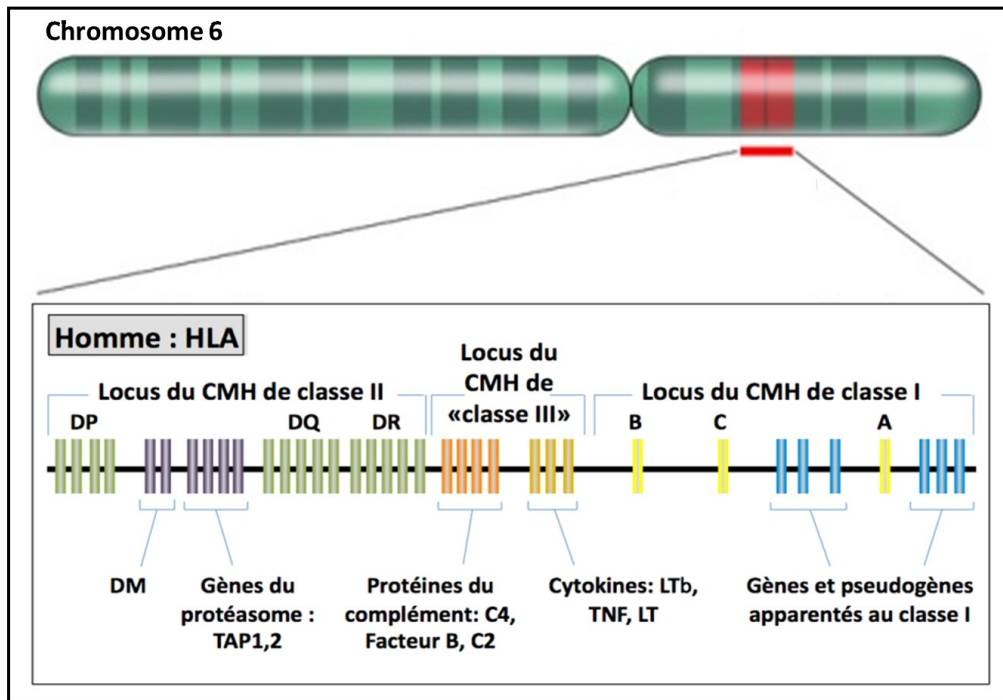


Figure 10. Structure de la région HLA. Ce locus est constitué de trois sous-loci : les loci du CMH de classe I, II et III.

Le locus du CMH I code pour les molécules HLA-A, -B et -C. Le locus du CMH II code pour les molécules HLA-DP, -DQ, -DR et -DM et pour les molécules TAP1 et TAP2 (transporteurs associés au chargement de peptides). Le locus du CMH III code pour certaines protéines du complément et pour des cytokines comme le TNF.

(D'après Abbas A.K. et Lichtman A.H., *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*, Edition Elsevier, 2005).

(2) La structure biochimique

Les gènes de classe I et II codent pour des glycoprotéines transmembranaires, assurant la présentation des peptides issus des protéines du « soi » et étrangères aux cellules du système immunitaire, participant ainsi à la réponse immunitaire. Ces glycoprotéines présentent notamment des différences de structure :

- Molécule HLA de classe I

Les molécules HLA de classe I sont des dimères formés d'une chaîne lourde α (44 kDa), associée de manière non covalente, à la β 2 microglobuline (β 2m), chaîne invariante dite légère de 11,5 kDa non codée par le CMH. La chaîne lourde α compte une partie intracytoplasmique, une partie transmembranaire et une partie extracellulaire composée de trois domaines (α 1, α 2 et α 3). L'étude de sa structure tridimensionnelle montre que la région

extracellulaire de la chaîne lourde α ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) est le siège d'une cavité correspondant au site de fixation du peptide endogène de 8 à 10 acides aminés de long (**Figure 11**).

- Molécule HLA de classe II

Les molécules HLA de classe II sont, comme les molécules de classe I, des hétérodimères composés de deux chaînes protéiques notées α et β . Ces deux chaînes sont codées par des gènes situés dans la région dite de classe II et ne sont pas associées avec la $\beta 2m$ (**Figure 11**). Les peptides exogènes de 15 à 25 acides aminés se fixent dans le sillon composé de $\alpha 1$ et $\beta 1$.

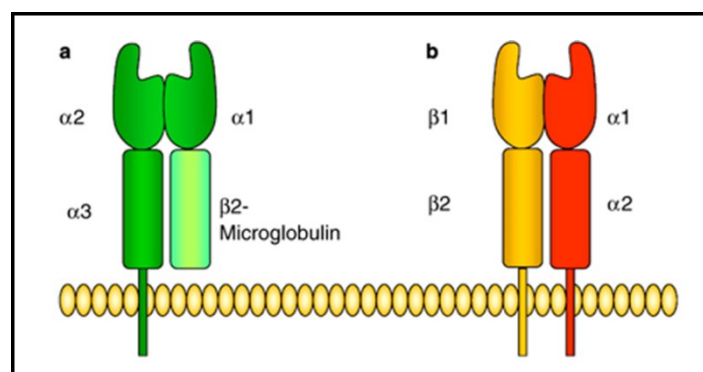


Figure 11. Structure des molécules HLA de classe I et II.

(a) molécule de classe I; (b) molécule de classe II.

(D'après Cassinotti A. dans *HLA and Autoimmune Digestive Disease: A Clinically Oriented Review for Gastroenterologists*, Am J Gastroenterol., 2009).

(3) La régulation de l'expression

Les molécules du CMH de classe I sont exprimées par la quasi-totalité des cellules nucléées de l'organisme. Néanmoins, des variations quantitatives sont notables : les lymphocytes T et B, les cellules dendritiques (DC) et les macrophages sont parmi les plus riches en molécules HLA de classe I. Ces molécules présentent classiquement l'antigène aux lymphocytes T cytotoxiques $CD8^+$ (LT $CD8^+$) qui reconnaissent le complexe CMH/peptide via leur TCR (« T cell receptor »). Ces LT $CD8^+$, une fois activés, se différencient en cellules effectrices, prolifèrent, et éliminent par cytotoxicité les cellules qui expriment l'antigène dont elles sont spécifiques au sein des tissus.

Les molécules du CMH de classe II ne sont exprimées constitutivement que par les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (DC, lymphocytes B et monocytes/macrophages). Elles présentent des peptides, provenant de la dégradation de

protéines exogènes qui ont été internalisées, aux lymphocytes T CD4⁺ naïfs, spécifiques de l'antigène présenté, afin de les activer.

b) HLA-B27 et SpA

Quarante ans après sa découverte, l'association génétique entre la molécule HLA-B27 et la SpA continue d'être l'une des plus fortes associations entre un antigène du CMH et une maladie complexe (**Tableau 5**). Néanmoins, aujourd'hui le mystère persiste quant à sa contribution dans l'induction de la pathologie.

Sous-types SpA	Prévalence de HLA-B27 (%)
Spondylarthrite ankylosante	≥ 90%
Arthrite réactionnelle	70%
Rhumatisme psoriasique	60-70%
Spondylarthrites des entérocolopathies inflammatoires	50-60%

Tableau 5. Prévalence de l'allèle HLA-B27 dans les différentes formes de SpA.

(D'après Reveille JD, *The genetic basis of spondyloarthritis*, Ann Rheum Dis (70), pp. 44-50, 2011).

(1) HLA-B27, quel modèle de transmission ?

Il est acquis aujourd'hui que l'antigène HLA-B27 constitue le facteur génétique quasi nécessaire pour développer une SpA. En effet, plus de 90% des patients atteints de SA sont porteurs de l'antigène HLA-B27, alors qu'il n'est présent que chez 7,5% des individus de la population générale française. Cela ne semble cependant pas suffisant.

Plusieurs études ont cherché à modéliser le mode d'héritabilité de la SpA. La ségrégation familiale^{88 89} comme l'absence d'excès d'homozygotie chez les patients⁹⁰⁻⁹² pourraient laisser penser que l'effet de B27 se rapprocherait d'un modèle dominant avec pénétrance incomplète. Néanmoins ce modèle n'est pas encore clairement établi, puisque certaines équipes ont montré que les homozygotes B27 étaient plus susceptibles de développer une SA comparés aux hétérozygotes^{93 94}, ou ont rapporté des observations en faveur d'un modèle récessif^{33 95}.

(2) Association entre les différents sous-types allélique du HLA-B27 et la SpA ?

Actuellement 105 sous-types de l'antigène HLA-B27 ont été identifiés (HLA-B*27:01 à HLA-B*27:105) (IMGT/HLA database, <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/align.html>). L'allèle ancestral, dont les autres dériveraient par mutation, serait HLA-B*2705, majoritaire dans les populations caucasiennes. Parmi ces sous-types, 38 codent pour des protéines de la surface cellulaire et diffèrent par quelques substitutions nucléotidiques (non-synonymes pour la plupart) dans les exons 2 et 3 qui codent pour les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ qui forment le site de fixation du peptide⁹⁶.

Population	27:01	27:02	27:03	27:04	27:05	27:06	27:07	27:08	27:09	27:13	27:14
Northern Europe		10			90						
Denmark		10			90						
Southern Europe		20			80						
Spain (Galicia)		18			80			3			
Northern Spain		7			91		1			1	
Azores			7		86		7				
Italy		30			65		2		3		
Sardinia		3			77				20		
Greece		34	8		50		8				
Cyprus		52			32		17				
Turkey	7	30			43		14	5			
Lebanon		24	12		35		30				
Jewish		48		3	38		13				
Siberia		14			84						2
North India				33	61		6				
West India				34	34		18	12			2
Japan				82	18						
Chinese		2		66	31		2				
Taiwan	0.05	0.5		87	4	7	2	0.02			
Taiwan (Han)			3	94	6						
Taiwan Aborigines				100							
Chinese Indonesian				38		62					
Native Indonesian				6	6	89					
Malays				19	6	72	3				
Thailand				42	5	53					
Maoris				36	64						
Brazil		10	6		80		3				
North Africa		50			50						
West Africa			32		68						

Tableau 6. Fréquences des sous-types alléliques de HLA-B27 à travers le monde.

(D'après Reveille J. dans *The genetic basis of spondyloarthritis*, Ann Rheum Dis, pp. 44-50, 2011).

Certains de ces variants ont été découverts récemment et semblent assez rares, il est donc difficile de savoir s'ils sont associés à la SpA. Cependant, quand les allèles sont suffisamment fréquents pour être étudiés, une association entre B27 et la maladie est révélée presque dans tous les cas⁹⁷⁻¹⁰⁰. Parmi ceux-ci, B*2702, B*2704, B*2705 et B*2707 sont les plus clairement associés à la SA (**Tableau 6**)¹⁰⁰. B*2705 est présent dans quasiment toutes les populations, alors que B*2702 s'observe plus particulièrement chez les Caucasiens

méditerranéens. B*2704 est plutôt retrouvé au Moyen Orient et B*2707 en Asie du Sud. Il est intéressant de constater que seuls deux des sept acides aminés appartenant au motif B27 sont conservés parmi ces formes alléliques et pourraient donc être directement impliqués dans la prédisposition à la SpA. Il s'agit de l'acide glutamique en position 45 et de la cystéine en position 67 (**Figure 12**).

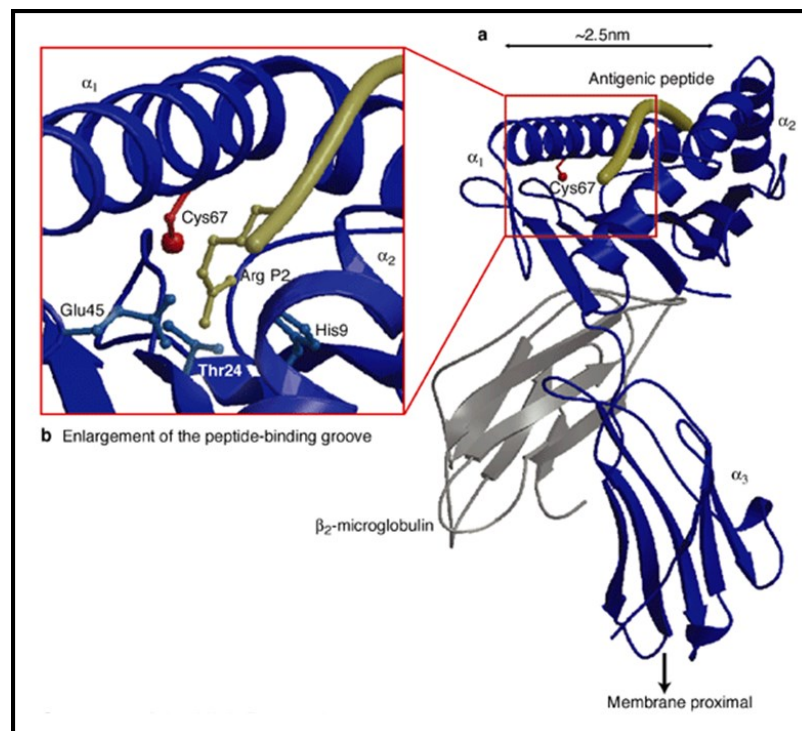


Figure 12. Structure tridimensionnelle des domaines extracellulaires de la molécule HLA-B27 obtenue par cristallographie.

(a) la chaîne lourde (en bleu) est constituée d'un domaine intra-cytoplasmique d'une faible longueur et d'un domaine extracellulaire important, formé de trois sous-domaines : α_1 , α_2 et α_3 . Le α_3 est très conservé, alors que α_1 et α_2 sont très polymorphes. Les domaines α_1 et α_2 constituent un sillon où vient se loger le peptide antigénique. Deux acides aminés sont remarquables dans le sillon : l'acide glutamique en position 45 (Glu45) et la cystéine en position 67 (Cys67). (b) montre la composition en acide-aminés (His 9, Thr 24, Glu 45, Cys 67 et Lys 70) de cette poche indispensable à la liaison avec le peptide.

(D'après Bowness P., *Expert Rev Mol Med*, pp. 1-10, 1999).

Néanmoins, il existe deux sous-types qui semblent ne pas être associés à la SA. B*2706 assez fréquent dans le Sud-Est de l'Asie^{99 101} et B*2709, retrouvé spécifiquement dans le sud de l'Italie et chez les Sardes^{102 103}. Ces deux formes alléliques ont en commun une mutation de l'acide aminé en position 116 qui pourrait jouer un rôle dans la susceptibilité à la maladie. Cette mutation est cependant retrouvée dans le sous-type

associé à la SA, HLA-B27*07. D'autre part, elles possèdent comme la majorité des autres sous-types, le résidu cystéine en position 67. L'allèle B*2706 apparaît pourtant très protecteur (OR=0,128) dans une méta-analyse* réalisée sur 13 cohortes de populations asiatiques ¹⁰⁴. Quant au HLA-B*2709, seulement quelques cas de SA ont été identifiés porteurs de ce sous-type, et ces observations sont sujettes à controverse car l'un des patients était également porteur de l'allèle HLA-B*1403 prédisposant à la SA (voir ci-dessous) ^{102 103 105}. L'une des hypothèses proposées, pour expliquer la faible association du HLA-B*2709 à la SA en Sardaigne, est que ce sous-type serait porté par un haplotype particulier qui diffère de ceux des sous-types prédisposant à la maladie ¹⁰⁶.

Les autres sous-types de HLA-B27 sont trop rares pour être associés à la maladie de façon bien établie, bien que quelques cas de SA aient été identifiés comme pour B*2701, *2703, *2708, *2710, B*2713, *2714, *2715, *2719 et B*2725 ¹⁰⁰.

Il semblerait donc qu'aucun acide aminé de la molécule HLA-B27, notamment la cystéine en position 67, ne soit associé de façon parfaitement spécifique à la SA. D'autres facteurs doivent discriminer ces sous-types, pour expliquer qu'ils soient ou non associés à la maladie. Parmi les candidats possibles, le SNP rs4349859, qui était le plus fortement associé à la SA dans l'étude génome-entier d'Evans *et al.* publiée en 2011, peut également étiqueter HLA-B27, avec une bonne sensibilité (98%) et une bonne spécificité (99%) ¹⁰⁷. Il se situe à 41kb de *HLA-B* du côté centromérique et à 5,4kb du gène *MICA*, situé du côté télomérique et qui a précédemment été associé à la SA (voir ci-dessous). Cet étiquetage de HLA-B27 pourrait être dû au fort DL de la région ou bien indiquer le variant causal de la maladie. En effet, il reconnaît des sous-types associés à la SA tels que HLA-B*2702, B*2705 et B*2708. Cependant il marque aussi l'allèle HLA-B*2709 non associé à la maladie.

* C'est une démarche statistique combinant les résultats d'une série d'études indépendantes sur un problème donné

Par contre, il ne reconnaît pas des sous-types fréquents en Afrique ou en Asie, qu'ils soient (HLA-B*2703, B*2704, et B*2707) ou non (B*2706) associés à la SA. Ces recoupements nous indiquent donc que ce n'est vraisemblablement pas un SNP causal de la maladie.

Néanmoins, il semble clair ici que le fort DL, à proximité immédiate de HLA-B, puisse dissimuler d'autres polymorphismes, en DL avec le locus, et soient responsables de l'association de B27 à la SA.

(3) Quel est le rôle du HLA-B27 dans la prédisposition à la SpA ? Si le rôle de HLA-B27 dans la pathogénie ne fait pas de doute, son mécanisme en est à l'heure actuelle non éclairci. Plusieurs théories ont émergé ces dernières années, certaines spécifiques de l'antigène, d'autres non.

Les théories spécifiques de l'antigène :

- « Peptide arthritogène » : un ou plusieurs antigènes particuliers, exprimés dans les tissus cibles, seraient capables de se fixer préférentiellement au HLA-B27 et d'induire une réponse inflammatoire médiée par des LT CD8⁺ ¹⁰⁸.
- « Mimétisme moléculaire » : cette hypothèse relie celle du « peptide arthritogène » au rôle de l'environnement bactérien. Les peptides dérivés de pathogènes ressemblant à des peptides du soi seraient présentés à des LT CD8⁺ auto-réactifs, rompant ainsi le système de tolérance au soi et conduisant à une réponse auto-immune, à des lésions tissulaires et à une inflammation ^{109 110}.

Mais aucune étude n'a permis de déterminer la véritable nature du ou des peptides, et encore moins de montrer leur rôle dans la survenue ou la pérennisation de la maladie.

Les théories indépendantes de l'antigène :

- « Anomalie de repliement » : la chaîne lourde du HLA-B27 se replie plus lentement que d'autres molécules HLA, aussi bien lors de sa synthèse que lors de son assemblage avec la β 2m et le peptide, et ces protéines mal repliées auraient tendance à s'accumuler dans le RE et déclencher un stress du RE ^{111 112}.

- « Formation d'homodimères » : des complexes homodimériques de chaînes lourdes du HLA-B27, reliés par des ponts disulfures entre Cys67, s'exprime à la surface cellulaire ¹¹³. Il peut s'en suivre une interaction inhabituelle entre ces homodimères et des récepteurs de LT CD4⁺, CD8⁺ ou d'autres récepteurs immunomodulateurs de cellules NK (KIR3DL1, KIR3DL2) ¹¹⁴.

Les théories spécifiques de l'antigène n'ont jamais réellement fait leurs preuves et ont été progressivement délaissées à la faveur des hypothèses indépendantes du peptide. A ce jour, le rôle joué par HLA-B27 n'est pas encore bien déchiffré même s'il est clairement admis qu'il représente le facteur génétique majeur impliqué dans le déterminisme de la SpA. Néanmoins, il a été démontré que d'autres gènes pouvaient également jouer un rôle dans la susceptibilité à cette maladie.

c) HLA-B27 n'explique pas l'ensemble du déterminisme génétique de la SpA : implication d'autres gènes du locus CMH ?

Les études familiales suggèrent une contribution de HLA-B27 correspondant à moins de 40% de l'ensemble du déterminisme génétique de la SpA, alors que l'effet global de la région du CMH serait de 50% ⁷⁵. Ainsi, d'autres gènes du CMH, distincts de B27, seraient impliqués dans la SpA. Leur identification est rendue très délicate par l'existence d'un fort déséquilibre de liaison au sein de cette région et par le poids du B27.

(1) Les gènes du CMH de classe I

Une association entre l'allotype HLA-B60 et la SA a été décrite chez des patients caucasiens B27⁺ ⁹⁵ puis confirmée dans deux autres études ^{75 115}. Depuis cette association a été retrouvée chez des patients taiwanais porteurs ou non de HLA-B27 ¹¹⁶ puis chez des Néerlandais chez lesquels une interaction épistatique entre HLA-B60 et HLA-B27 a été observée ¹¹⁷.

HLA-B*1403, un allèle rare structurellement proche du HLA-B27, retrouvé exclusivement en Afrique sub-saharienne et dans les populations afro-américaines, avec une prévalence inférieure à 1%, a été identifié comme associé à la susceptibilité à la SA au Togo puis dans une cohorte zambienne de SpA ^{118 119}. En revanche, HLA-B*1402, qui ne diffère du

HLA-B*1403 que d'un acide aminée en position 156, ne semble faire preuve d'aucune association à la SA. Il est peu probable que cette absence d'association avec la SA soit haplotype-dépendante, à l'inverse de ce qui a été suggéré pour le HLA-B*2709.

D'autres allèles HLA-B tels que B35 et B39 pourraient être associés, mais cela n'a pas été confirmé^{36 120 121}.

Outre HLA-B, des études ont mis en évidence des gènes du CMH de classe I contribuant à la susceptibilité à la SA, tel que le gène *MICA* qui est immédiatement adjacent à HLA-B. Les protéines MIC sont considérées comme des marqueurs de stress de l'épithélium et agissent comme des ligands pour les récepteurs des cellules NK (NKG2D). En effet, plusieurs études avaient suggéré une association de *MICA* à la SA, mais celle-ci avait été finalement expliquée par le déséquilibre de liaison avec HLA-B27^{122 123}. C'est plus récemment que l'association de *MICA* à la SpA a été confirmée. Tout d'abord chez des Algériens HLA-B27 atteints de spondylarthrite juvénile, puis chez des patients B27 positifs et négatifs atteints de SA et provenant de différents groupes ethniques^{124 125}.

(2) Les gènes du CMH de classe II

Les allèles du CMH de classe II ont également fait l'objet d'études, comme celle de Brown *et al.* consacrée aux molécules HLA-DR qui avait suggéré une association de l'allèle HLA-DRB1*01 à la SA¹²⁶. Une autre étude a rapporté une association de l'allèle HLA-DRB1*08 à la spondylarthrite juvénile¹²⁷, confirmée par Brown *et al.* en 1998¹²⁶. Cet allèle est aussi associé à un âge de début plus précoce et au risque de survenue d'une uvéite antérieure aiguë (UAA)¹²⁸. Enfin, des travaux ont montré que HLA-DRB1*04 était impliqué dans la susceptibilité à la SpA¹²⁹. En effet, la présence de la molécule HLA-DR4 multiplierait par un facteur de 2,8 le risque de SpA chez les individus B27⁺ apparentés de patients¹²¹.

L'allèle HLA-DPB1*0301 semble associé à la spondylarthrite juvénile, mais cette association n'a pas été retrouvée depuis¹²⁷. Récemment, Díaz-Peña *et al.* ont rapporté l'association d'une région, située entre les gènes *HLA-DPA1* et *HLA-DPB1*, à la SA¹³⁰, dans une population espagnole puis confirmée chez les Portugais¹³¹.

Les gènes impliqués dans la présentation des peptides par les molécules de classe I, TAP1 et TAP2, ont été associés à l'arthrite réactionnelle¹³² et à la SA¹³³. Cependant, d'autres travaux ont montré que les polymorphismes identifiés n'affectaient pas le répertoire des ligands de HLA-B27 et donc ne devaient pas jouer un rôle décisif dans le

développement de la maladie ¹³⁴. De plus, aucune association de ces gènes à la SA n'a été identifiée par les données de Fraile *et al.* ¹³⁵.

Les gènes *LMP2* et *LMP7*, codant pour les sous-unités d'un complexe multi-catalytique d'une protéinase appartenant au protéasome, ont fait l'objet d'études. Leur fonction est de dégrader les protéines cytosoliques en peptides qui sont ensuite présentés par les molécules du CMH de classe I. Certaines données suggèrent que le gène *LMP2* est associé à la SA chez les Mexicains ¹³⁶ et chez des Canadiens atteints d'UAA ¹³⁷. Haroon *et al.* ont mis en évidence des variants de *LMP2* qui pourraient affecter la sévérité radiographique de la SA dans une population canadienne ¹³⁸. Enfin, *LMP7* a également été identifié comme impliqué dans la susceptibilité à la SA chez les Espagnols ¹³⁹. Cependant, ces résultats n'ont pas été largement répliqués à ce jour.

(3) Les gènes du CMH de classe III

Des études ont aussi été consacrées aux gènes du CMH de classe III. Le gène du TNF alpha code pour une cytokine pro-inflammatoire et un modulateur de la réponse immune, sécrétée par les macrophages, les LT et les cellules NK. Les anticorps anti-TNF α ont prouvé leur efficacité dans la SpA suggérant l'importance d'un processus inflammatoire dans cette maladie. Quelques études ont identifié une association du polymorphisme en position 308 du promoteur du gène à la SA chez les Anglais et les Ecosais ^{140 141}. Elle a ensuite été retrouvée chez les Mexicains et les Portugais ^{142 143}. Rudwaleit *et al.* ont également démontré une diminution de la sécrétion de cette cytokine chez les patients atteints de SA porteur de ce variant génétique ¹⁴⁴. Cependant, ces données n'ont pas été confirmées dans toutes les populations comme l'indique la méta-analyse, rassemblant 8 études, ayant porté sur des Européens et des Latino-Américains ¹⁴⁵⁻¹⁴⁷.

Le gène qui code pour la protéine de choc thermique, HSP70, a été étudié chez des patients mexicains atteints de SpA, et une association a été observée chez les individus B27 positifs et négatifs ¹⁴⁸. Ce résultat n'a cependant pas été répliqué dans d'autres populations à ce jour.

L'interprétation de ces résultats reste difficile au regard du poids du facteur HLA-B27 et de la force du DL au sein de cette région et certaines des associations qui ont été décrites sont vraisemblablement la conséquence d'un DL entre les allèles identifiés et HLA-B27. C'est

pourquoi le développement de méthodologies adaptées permettant de s'affranchir du poids de B27 est nécessaire pour l'identification et/ou la confirmation des gènes du CMH impliqués dans le déterminisme de la SpA.

Par ailleurs si le CMH n'explique que la moitié du déterminisme génétique de la SpA, l'autre part de susceptibilité génétique serait due à des facteurs localisés en dehors de cette région.

2. Quels sont les facteurs génétiques impliqués dans la SpA en dehors du CMH?

Aucune hypothèse physiopathologique n'est clairement établie à ce jour. Par conséquent, la recherche sans *a priori* dans l'ensemble du génome de nouveaux gènes de susceptibilité à la SpA, par le biais d'études de liaison et d'association pangénomiques, semble une approche adaptée.

a) Etudes de liaison par criblage génomique

Les études de liaison consistent à identifier des régions du génome pouvant contenir des gènes de susceptibilité pour le phénotype étudié. Elles analysent la co-transmission (ou la co-ségrégation) d'un locus avec un phénotype, à partir de données familiales et cela grâce à des marqueurs génotypiques. Une liaison est vraisemblable si la fraction de recombinaison entre le gène de susceptibilité expliquant le phénotype et la région chromosomique testée est inférieure à 0,5. La vraisemblance de la liaison est estimée à l'aide du « LOD score » : seules des valeurs de LOD score supérieures ou égales à 3,6 sont significatives, des valeurs supérieures ou égales à 2,2 n'étant que suggestives.

A ce jour, trois études de liaison ayant porté sur l'ensemble du génome ont été rapportées, deux dans la SA^{78 80 149} et une chez des patients atteints de SpA⁷⁹. Deux méta-analyses de ces trois études de liaison ont également été publiées^{150 151}.

(1) Cribrages génomiques de l'équipe d'Oxford

Le groupe d'Oxford a le premier réalisé un criblage génomique, mené en deux étapes successives^{149 78}. Les résultats présentés ici correspondent aux données combinées des deux

phases. Ces travaux ont porté sur 185 familles anglaises, correspondant à 818 individus dont 445 atteints de SA. Le panel final de génotypage était composé de 527 marqueurs microsatellites[‡]. En dehors du CMH, un seul autre locus, situé sur le bras long du chromosome 16, comportait une liaison significative (LOD score de 4,7). Six loci supplémentaires situés sur les chromosomes 1p34, 2q21, 9p24, 9q22-34, 10q23 et 19q13 ont présenté une liaison suggestive.

(2) Criblage génomique du Consortium nord-américain (NASC)

La seconde étude de liaison publiée par le groupe « The North American Spondylitis Consortium » (NASC)⁸⁰ portait sur 180 familles composées de 244 paires de germains atteints. Le panel de génotypage était composé de 417 marqueurs microsatellites. Là encore, la liaison était fortement significative sur toute la région du CMH, avec un pic au niveau du HLA-DRB1 en 6p21.32. Les autres localisations les plus parlantes étaient situées sur les bras longs du chromosome 6 et du chromosome 11. Cependant, aucune n'atteignait le seuil de significativité statistique, même suggestif.

(3) Criblage génomique du GFEGS

Le seul criblage génomique concernant le phénotype SpA est celui du Groupe Français d'Étude Génétique des SpA (GFEGS)⁷⁹. Il a été réalisé sur un panel de 65 familles multiplex* comportant 151 paires de germains atteints de SpA, à l'aide de 369 marqueurs microsatellites régulièrement répartis sur le génome.

Comme dans le cas de la SA, une liaison hautement significative a été mise en évidence dans la région du CMH en 6p22.2. En dehors de cette région, quatre loci d'intérêt potentiel ont été identifiés, sans atteindre le seuil de suggestivité, sur les bras longs des chromosomes 5, 9, 13 et 17.

‡ Courtes séquences d'ADN formées par la répétition en tandem d'un même motif.

*Une famille multiplex est une famille qui comporte plusieurs atteints, elle est définie par rapport à une famille simplex, qui ne contient qu'un seul atteint. Pour les analyses de liaison seules les familles multiplex sont utilisables.

La deuxième étape du travail du GFEGS a consisté en une étude d'extension centrée sur les quatre régions potentiellement intéressantes décrites ci-dessus. 55 familles multiplex supplémentaires et 21 marqueurs microsatellites localisés dans ces régions ont été sélectionnés. L'augmentation de l'effectif de l'échantillon analysé a mis en évidence une liaison significative en 9q31-34. Ce locus, précédemment détecté de façon suggestive dans l'étude de l'équipe d'Oxford, a été baptisé SPA2⁷⁸. Aucune des autres régions candidates n'a atteint un niveau significatif ou même suggestif dans l'analyse finale.

(4) Meta-analyse des études de liaison par criblage génomique
Les équipes ayant mené les trois criblages génomiques précédemment décrits se sont réunies pour réaliser une méta-analyse de leurs données¹⁵¹.

Les travaux du GFEGS concernaient le phénotype SpA donc seules les 27 familles multiplex atteintes de SA ont été intégrées dans la méta-analyse par souci d'homogénéité phénotypique. Les données ont été ré-analysées de façon individuelle et combinée. La région du CMH a été identifiée comme étant la plus fortement liée à la SA. Des liaisons suggestives ont également été identifiées au niveau des régions 6q, 10q et 16q. D'autres régions présentaient une liaison suggestive voire significative dans au moins deux criblages, bien que n'atteignant pas le seuil de suggestivité dans les analyses combinées : 1q, 3q, 5q, 9q (locus SPA2), 17q et 19q.

Dans les maladies génétiques complexes comme la SpA, les analyses de liaison ont une faible puissance pour plusieurs raisons. Tout d'abord, un phénotype peut être dû à des gènes différents si bien qu'une faible proportion de l'ensemble des familles contribue à l'identification d'un locus donné (hétérogénéité génétique). Par ailleurs, les familles présentent souvent peu d'individus atteints. Enfin, en l'absence de modèle de transmission préétabli, il faut recourir à des méthodes d'analyse de liaison non paramétriques, peu puissantes. C'est pourquoi d'autres approches comme les études d'association sont nécessaires.

b) Etudes d'association pangénomiques

Le principe des études d'association est de comparer la fréquence des allèles chez des patients et chez des sujets témoins. Il suppose l'existence d'un DL entre l'allèle testé et l'allèle du locus de la maladie. Ces études testent donc directement la corrélation entre des variations génétiques et la maladie. Si cette corrélation est observée, cela signifie que le variant testé est impliqué directement dans la maladie, soit que sa fréquence reflète celle du variant causal. La force de l'association peut être mesurée, entre autres indicateurs, par la P-value (P) ou par un odds-ratio (OR).

La mise en œuvre des méthodes d'association génétique a été grandement facilitée par le développement des méthodes de génotypage de haut-débit à l'aide de puces. Ces études impliquent toutefois de réaliser de multiples tests statistiques, ce qui impose des critères de significativité statistique adaptés pour limiter le nombre de faux-positifs.

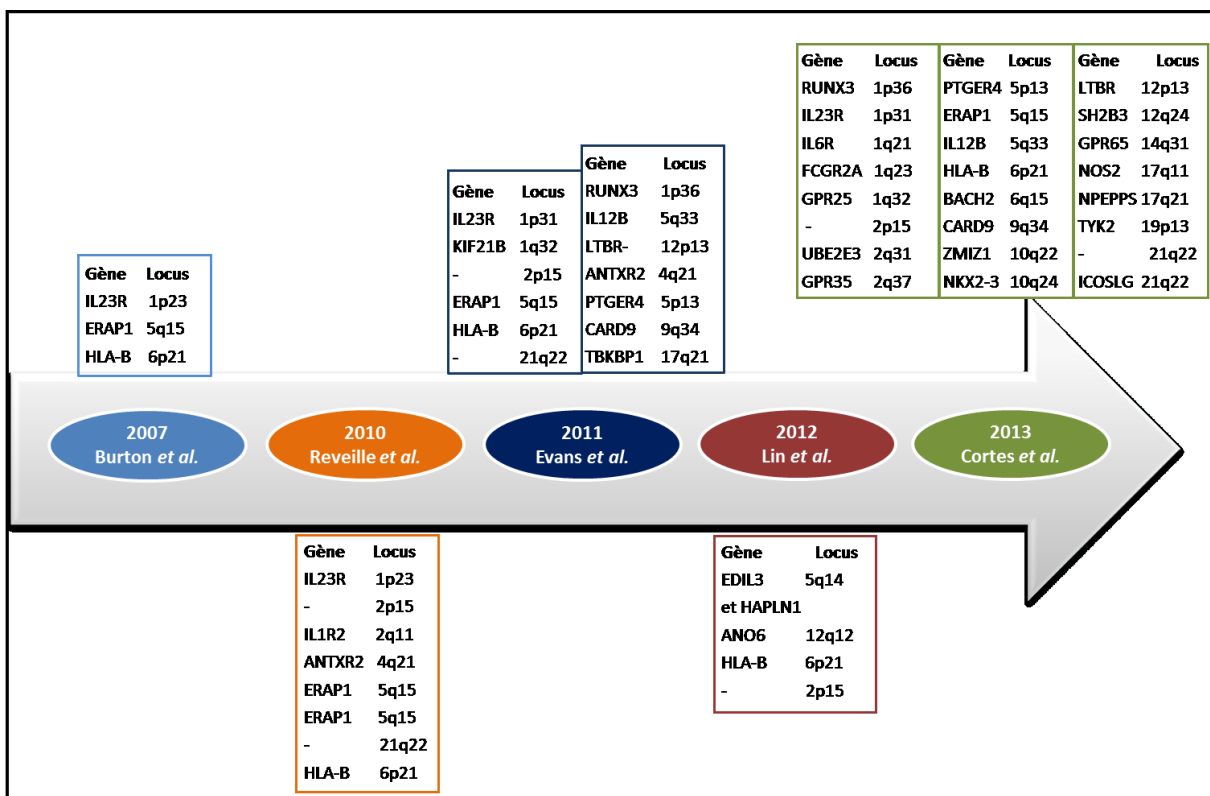


Figure 13. Gènes situés à proximité des SNPs identifiés lors des études d'association pangénomiques.

La première colonne indique le gène candidat à proximité du polymorphisme identifié (s'il n'y en a pas, cela est signalé par un « - ») ; la deuxième précise le locus chromosomique où se situe le gène d'intérêt. Les différentes études d'associations pangénomiques sont décrites ci-dessous.

Nous donnons ci-dessous une description des différentes études d'association pangénomiques menées à ce jour, ainsi que les gènes situés à proximité des polymorphismes identifiés (**Figure 13**).

(1) Etude d'association du WTCCC et du TASC

Le « Wellcome Trust Case Control Consortium » (WTCCC) et l'« Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium » (TASC), ont rapporté en 2007 les résultats d'une étude d'association concernant sept maladies communes, réalisée avec 14 436 SNPs non-synonymes* répartis sur l'ensemble du génome, ainsi que 897 SNPs localisés dans le CMH¹⁵². Cette étude a porté sur 1 000 individus atteints de SA et 1 500 témoins sains. Leur principal résultat dans la SA, outre la réplication de l'association très forte avec le CMH, a été l'identification pour la première fois de deux gènes, *ERAP1* et *IL23R* contenant des polymorphismes significativement associés à la maladie.

(2) Etude d'association génome entier (GWAS) du TASC

Le groupe TASC a publié en 2010 la première véritable étude d'association génome entier (GWAS) de haute densité portant sur la spondylarthrite ankylosante¹⁵³. Les individus étaient tous Caucasiens et comprenaient 2 951 patients atteints de SA et 6 658 témoins sains. Ils ont été génotypés pour 288 662 SNPs à l'aide d'une puce Illumina®. Comme attendu, le CMH est ressorti dans cette étude comme fortement associé à la SA. De plus, ces travaux ont permis de répliquer l'association précédemment identifiée des gènes *IL23R* et *ERAP1* à la maladie¹⁵². Par ailleurs, d'autres loci ont été mis en évidence, à savoir deux régions inter-géniques en 2p15 et 21q22, et les gènes *ANTXR2* et *IL1R2*.

(3) GWAS de l'équipe chinoise

Un GWAS a aussi été mené au sein d'une population chinoise, rassemblant 3 937 patients atteints de SA, 7 727 individus sains et analysant 1 356 350 SNPs répartis sur l'ensemble du génome.

*Un SNP non-synonyme est un polymorphisme conduisant à un remplacement d'un acide aminé par un autre. Ces SNPs sont aussi appelés polymorphismes codants.

Ces travaux ont permis de mettre en évidence deux nouveaux loci de susceptibilité, entre EDIL3 et HAPLN1 en 5q14.3 et dans le gène *ANO6* en 12q12¹⁵⁴. Les associations avec les régions 2p15 et CMH, précédemment identifiées dans le GWAS du groupe TASC, ont été répliquées¹⁵³.

(4) GWAS du WTCCC2 et du TASC

Le WTCCC2 et le TASC se sont de nouveau réunis afin de publier un GWAS portant sur 5 134 patients atteints de SA et 13 262 témoins sains¹⁰⁷. Cette étude a permis de répliquer l'association des gènes *HLA-B*, *ERAP1*, *IL23R*, *ANTXR2*, *CARD9*, *PTGER4*, *KIF21B* et *TBKBP1* ainsi que des régions inter-géniques, à la SA. Quatre nouveaux loci de susceptibilité ont également été mis en lumière : *RUNX3*, *IL12B* et *LTBR-TNFRSF1A*. Ces travaux ont donc établi l'association de 13 loci à la SA dans une population européenne.

(5) Etude d'association « Immunochip » du IGASC

Récemment, le groupe « International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium » (IGASC) a exploité des puces de génotypage sur mesure appelées « Immunochip ». Elles sont composées de SNPs identifiés dans de larges études d'association menées sur des maladies auto-immunes et inflammatoires, telles que la SA, le psoriasis et les MICI, afin de créer une base de données pour des études immunogénétiques¹⁵⁵. Cette étude d'association a porté sur 10 619 individus atteints de SA et 15 145 individus sains, venant d'Europe, d'Asie de l'Est et d'Amérique latine. Ces travaux ont répliqué l'association de 12 des 13 loci précédemment identifiés chez les Européens (*HLA-B*, *ERAP1*, *IL23R*, *CARD9*, *IL12B*, *RUNX3*, *KIF21B*, *LTBR-TNFRSF1A*, *PTGER4*, *NPEPPS-TBKBP1-TBX21* ainsi que les régions 2p15 and 21q22) et de déceler 13 nouvelles régions au seuil de significativité pangénomique ($P=5 \times 10^{-8}$). Aucun SNP du gène *ANTXR2* n'avait été inséré sur la puce. Les loci identifiés chez les Asiatiques n'ont pas été retrouvés¹⁵⁴.

Parmi ces nouveaux gènes, les deux premiers d'entre eux, *ERAP1* et *IL23R*, ont déjà fait l'objet de nombreuses études supplémentaires.

ERAP1 (endoplasmic reticulum aminopeptidase 1)

Le gène *ERAP1* (ou *ARTS1* pour « aminopeptidase regulator of TNFR1 shedding ») est localisé sur le chromosome 5q15 et code pour une aminopeptidase transmembranaire ayant pour principale fonction de compléter dans le RE le clivage des peptides générés par le protéasome, afin d'atteindre une longueur optimale (8-9 acides-aminés de longueur) pour leur présentation par les molécules du CMH de classe I^{156 157}.

Une autre fonction a été également proposée : il s'agit du clivage des récepteurs de cytokines pro-inflammatoires exprimés à la surface cellulaire : TNFR1, IL-1R2 et IL-6R¹⁵⁸⁻¹⁶⁰, ce qui permettrait de réduire leur capacité à transmettre des signaux à la cellule, affectant ainsi le processus inflammatoire. Cette hypothèse n'a pas cependant été confirmée depuis.

ERAP1 a été associé à la SA pour la première fois en 2007. Les cinq polymorphismes non-synonymes testés (rs27044, rs30187, rs17482078, rs10050860 et rs2287987) tous en fort DL les uns avec les autres présentaient une forte association à la maladie, et avec un effet allant dans la même direction dans les deux populations étudiées, anglaises et américaines. En effet, les allèles rares des SNPs rs27044 et rs30187 augmentaient plutôt le risque de développer une SA, avec un OR allant de 1,30 à 1,40, dans les différentes populations d'étude. Alors que les allèles rares des SNPs rs17482078, rs10050860 et rs2287987 étaient associés à une réduction du risque de SA avec un OR de 0,65 à 0,75¹⁵². De nombreuses études ont ensuite confirmé cette association chez les Caucasiens et chez les Chinois Han¹⁶¹⁻¹⁶⁸. L'ensemble des GWAS menés depuis ont également répliqué ces résultats, et cela exclusivement chez les patients HLA-B27 positifs^{107 153 155}. Ainsi, il a été observé que l'effet des allèles de prédisposition d'*ERAP1* n'était détectable qu'en présence de HLA-B27. Cette interaction au sens génétique du terme est très en faveur de l'implication de cette aminopeptidase dans la susceptibilité à la maladie^{107 169}.

Le gène *ERAP1* se compose de 20 exons et mesure 47,38 kb. Il fait partie d'un cluster de gènes composé de *CAST* du côté télomérique, d'*ERAP2* et de *LNPEP* du côté centromérique. *ERAP2* et *LNPEP* appartiennent également à la famille des aminopeptidases, et leur séquence est homologue à celle d'*ERAP1*. Ils sont situés dans une région en DL qui associe leurs allèles à la maladie et pourraient ainsi être de bons gènes candidats. En effet, l'association de *LNPEP* à la SA a été confirmée, indépendamment de son fort DL avec *ERAP1*

^{152 155}. Ce dernier code pour la protéine ERAP-1 qui peut former un hétérodimère avec ERAP-2, dont le gène montre également une association avec la SA, chez les patients B27 positifs et négatifs et cela indépendamment d'ERAP1 ¹⁵⁵.

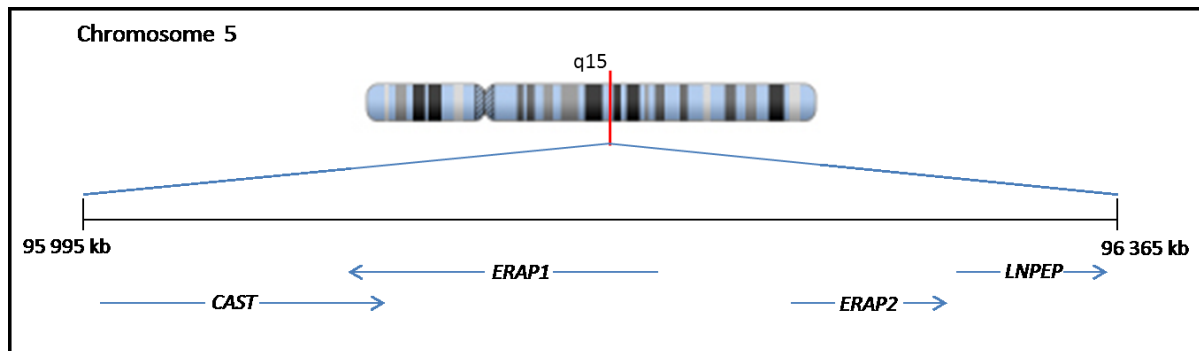


Figure 14. Structure de la région du cluster de gènes qui entoure ERAP1.

Ce locus est constitué de quatre gènes : *CAST*, *ERAP1*, *ERAP2* et *LNPEP* et se situe sur le chromosome 5q15.

Le rôle physiopathologique joué par ERAP1 dans la SA est encore inconnu à ce jour. Les variants de ce gène pourraient avoir un effet quantitatif ou qualitatif sur la présentation des peptides par les molécules du CMH de classe I à la surface des cellules. En effet, la production d'une souris déficiente pour ERAP1 a permis d'observer une réduction de l'expression des molécules de classe I, ainsi qu'une diminution de la stabilité et un défaut des antigènes présentés à la surface des cellules ^{170 171}. Chez l'homme, l'allèle rare, T, du SNP le plus associé à la maladie, rs30187, situé dans l'exon 11 et codant le variant K528R, augmente le risque de SA ; l'acide aminé concerné est très proche du site catalytique de l'activité aminopeptidase ¹⁷². De fait, des expériences de clivage d'un peptide spécifique du HLA-B27 par le variant 528R ont révélé que ce dernier était moins efficace dans le traitement des peptides par rapport à la protéine sauvage (528K), suggérant un défaut de l'activité catalytique dans la SA ^{173 174}.

A côté de l'hypothèse d'un défaut qualitatif découlant d'un polymorphisme codant, une variation quantitative de la protéine pourrait également être incriminée. En effet, les SNPs associés à la maladie étaient déjà connus comme des « expressions » QTL (locus de trait quantitatif), c'est-à-dire des SNPs associés à une variation quantitative des transcrits de

ERAP1^{175 176}. Reprenant les résultats d'expression disponibles dans la littérature, Harvey *et al.* ont relevé une corrélation entre la force de l'association de SNPs à la SA et la force de l'association de ces mêmes SNPs à la quantité de transcrits produite¹⁶³. D'autre part, il a été rapporté un niveau plus important de protéine ERAP1, au sein de DCs dérivées de monocytes de patients B27⁺ atteints de SA, comparés aux sujets sains B27 négatifs¹⁷⁷. Ces résultats suggèrent qu'une surexpression d'ERAP1 pourrait jouer un rôle dans le mécanisme affectant la présentation du peptide par le CMH de classe I et ainsi induire la maladie.

Il convient de souligner que de nombreux autres SNPs associés à la SA, situés dans des exons ou dans des régions régulatrices du gène, pourraient également entraîner des conséquences fonctionnelles^{163 178}. Cependant, l'analyse par régression logistique multivariée des SNPs de ce locus n'a pas permis de distinguer le SNP causal¹⁶³. Très récemment, notre groupe a d'ailleurs identifié un haplotype constitué par les allèles T, T et C des SNPs rs17482078, rs10050860, rs30187 respectivement, qui est significativement associé à une réduction de risque de SpA, alors que l'haplotype CCT est associé à une augmentation du risque de la maladie^{161 168}.

Ainsi, l'identité du SNP responsable de la maladie au sein du locus ERAP1 et son mécanisme d'action pathogène demeurent largement des questions à résoudre.

IL23R

Les variants du gène *IL23R* ont d'abord été associés aux MICI¹⁷⁹ et au psoriasis¹⁸⁰. C'est ensuite, dans l'étude d'association menée par le WTCCC en 2007, que le gène codant pour le récepteur à l'interleukine 23, fut impliqué dans la SA¹⁵². Depuis, ce résultat a été largement répliqué dans des cohortes de patients provenant du Canada, d'Espagne, de Hongrie et d'Angleterre^{165 181-183}. Cependant, cette association n'a pas été observée chez les Chinois ou les Coréens^{167 184}.

Le gène de l'IL-23R localisé sur le chromosome 1p31 est également à proximité d'un locus identifié par les criblages génomiques d'Oxford^{78 149}. La voie de l'IL-23 est une piste d'intérêt pour mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la SpA. Son activité pro-inflammatoire a été en partie attribuée à sa capacité de stabiliser et

d'amplifier un sous-type de LT CD4⁺ appelé Th17. Ces cellules, impliquées dans de nombreuses maladies inflammatoires dont les SpA, expriment le récepteur de l'IL-23.

Il faut également noter qu'une augmentation d'IL-23 a été identifiée dans le colon des rats transgéniques B27 malades. La quantité d'IL-17, produite par les Th17, est elle aussi amplifiée et corrélée avec celle de l'IL-23 dans les tissus inflammatoires, et participe à la réponse pro-inflammatoire.

De plus, le taux sérique d'IL-17 a été retrouvé plus élevé dans une cohorte de patients atteints de SA comparés à des témoins¹⁸⁵. Il a aussi été rapporté que les cellules Th17 circulantes étaient plus fréquentes chez les patients atteints de SpA¹⁸⁶.

Enfin, il a été mis en évidence que des variations génétiques du locus IL23R, associées à la SpA, pouvaient influencer les fonctions effectrices des LT CD4⁺, en particulier celles des Th1 et Th17. En effet, des patients atteints de SpA, porteurs des allèles fréquents et prédisposant des SNPs rs11209026 et rs1343151, présentent une expression plus forte des gènes de la voie Th17 (*IL17A*, *IL17F*, *IL23R*, et *RORC*) et de la voie Th1 (*IFNG*, *TNFA*, *IL12RB2*, et *TBX21*) au sein de LT CD4⁺, comparés aux patients portant les allèles rares protecteurs¹⁸⁷.

L'association du gène *IL23R* à la SA, démontrée par le WTCCC, a donc été le premier élément de preuve du rôle de l'axe IL-17-IL-23 dans la maladie. De plus, l'implication de ce gène dans les MICI et le psoriasis fournit un nouvel argument pour soutenir l'hypothèse d'une base génétique commune pour les différents sous-types de la SpA.

c) Etudes d'association de type «gène candidat»

Les gènes candidats peuvent être sélectionnés sur différents critères tels que la localisation dans des régions liées lors de criblages génomiques, une fonction connue du gène pouvant suggérer un rôle potentiel de la protéine produite dans la physiopathologie de la maladie, ou encore une association connue avec une pathologie similaire. Ci-dessous figurent les principaux gènes étudiés en suivant cette approche.

(1) Cluster de l'interleukine 1

Le criblage génomique d'Oxford a mis en évidence une liaison suggestive à proximité du cluster de gènes de l'interleukine 1 ou IL-1 (1p34)⁷⁸. Ce cluster comporte neuf gènes, dont les plus connus sont respectivement *IL-1A*, *IL-1B* et *IL-1RN* codant pour l'IL-1 α , l'IL-1 β et l'IL-1RA (antagoniste de l'IL-1). Plusieurs études indépendantes ont montré une association des polymorphismes alléliques du gène *IL-1RN* à la SA^{188 189}, mais ces résultats n'ont pas été confirmés par les études d'association intrafamiliale réalisées sur SA ou SpA^{190 191}. Concernant l'*IL-1B*, une association très significative à la SA a été observée en 2004¹⁹¹ mais celle-ci n'a pas été retrouvée par la suite¹⁹². Enfin, d'autres équipes ont rapporté une association des polymorphismes du gène *IL-1A* à la SA¹⁹³⁻¹⁹⁵.

(2) L'interleukine 10

Le rôle de l'IL-10 dans l'inhibition de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF, l'IL-1 et l'IL-6, ainsi que son implication dans la voie Th17 ont justifié l'étude des polymorphismes de son gène, situé sur le bras long du chromosome 1. Une première étude cas-témoin finlandaise a montré un rôle protecteur des allèles IL-10.G10 et IL-10.G12 vis-à-vis du développement d'une Aré¹⁹⁶. Ce résultat n'a cependant pas été confirmé par une étude d'association intrafamiliale finlandaise menée sur 468 individus atteints de SA, y compris dans le sous-groupe des patients ayant une Aré¹⁹⁷. Néanmoins, cet effet protecteur a été retrouvé pour le phénotype SA dans une population allemande¹⁹⁸.

(3) Card15/Nod2

Le gène *Card15/Nod2* situé sur le chromosome 16q21.1 se trouve à proximité de la région présentant une liaison significative avec la SA dans le criblage génomique de l'équipe d'Oxford⁷⁸. De plus, des variants de ce gène sont connus pour être associés à la maladie de Crohn. C'était donc un candidat logique pour l'étude des SpA, d'autant qu'il code une protéine possédant un rôle anti-inflammatoire. Une association de ce gène à la SA a été rapportée en 2002 (Crane 2002), mais elle n'a pas été répliquée depuis, dans la SA comme dans la SpA^{199 129}.

(4) Le cytochrome P450 2D6 (CYP2D6)

Le gène *CYP2D6* situé sur le chromosome 22 produit une sous-unité du cytochrome p450 impliquée dans le métabolisme de détoxification des xénobiotiques. Des polymorphismes de ce gène, tels que *CYP2D6*4*, sont associés à un métabolisme diminué qui s'exprime par des réactions d'intolérance à certaines substances, telles que la codéine ou le dextropropoxyphène. Les variants de ce gène ont initialement été identifiés comme associés au lupus érythémateux disséminé. Par analogie entre les pathologies, il a alors été proposé comme gène candidat pour la SA. Deux études cas-témoins indépendantes, complétées par une étude d'association intrafamiliale ont montré une association de l'allèle *CYP2D6*4* homozygote à la SA^{200 201}. Il s'agit d'une association de faible amplitude dont le rôle physiopathologique reste inexplicé, et qui n'a pas été confirmée²⁰².

(5) Autres gènes étudiés

D'autres gènes ont été testés pour leur association à la SpA ou sa forme la plus fréquente, la SA. Il s'agit notamment d'*ANKH*²⁰³, de *TLR4*²⁰⁴, de *KIR*²⁰⁵ et de *TNAP*²⁰⁶. Aucune de ces associations n'a été répliquée à ce jour²⁰⁷⁻²¹⁰.

Enfin, d'autres gènes candidats ont été étudiés, tels que *TGFβ*²¹¹, *PTPN22*²¹², *MMP3*²¹³, *PDCD1*²¹⁴, *STAT3*²¹⁵, *ACE*²¹⁶, *MSX2*²¹⁷, *CTLA4*²¹⁸, *JARD1A*²¹⁹ et *IKBα*²²⁰. Les résultats suggèrent un effet faible voire inexistant dans la susceptibilité à la SA. Mais ces études ont généralement été réalisées sur de petits échantillons et manquaient donc de puissance.

Chapitre 4

IV. Transcriptomique de la SpA : un autre moyen d'identifier des gènes impliqués dans la maladie ?

Même si elles apportent des informations décisives, les études génétiques sont loin de pouvoir expliquer la physiopathologie des maladies multifactorielles comme la SpA²²¹. Elles peuvent être très utilement complétées par des études fonctionnelles qui s'attachent à mesurer le niveau d'expression des gènes et à rechercher des gènes différenciellement exprimés entre patients et sujets témoins. De telles approches permettent :

- d'identifier des voies de signalisation auxquelles les gènes différenciellement exprimés appartiennent, facilitant ainsi la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la maladie.
- de définir des bio-marqueurs de diagnostic précoce, de pronostic ou de réponse thérapeutique.

A ce jour, ces mesures d'expression génique, lorsqu'elles sont pangénomiques, se font le plus souvent à partir des transcrits (transcriptome), beaucoup plus rarement au niveau des métabolites (métabolome), et exceptionnellement au niveau des protéines (protéome). Pour le transcriptome, les puces d'expression offrent depuis quelques années une technologie éprouvée pour quantifier avec un coût raisonnable les transcrits, que ce soit dans les tissus cibles de la maladie ou dans le sang périphérique. Elles reposent sur l'hybridation des transcrits à mesurer, après synthèse de l'ADN complémentaire et marquage fluorescent, avec des sondes fixées sur la puce et représentatives de chacun des gènes (**Figure 15**).

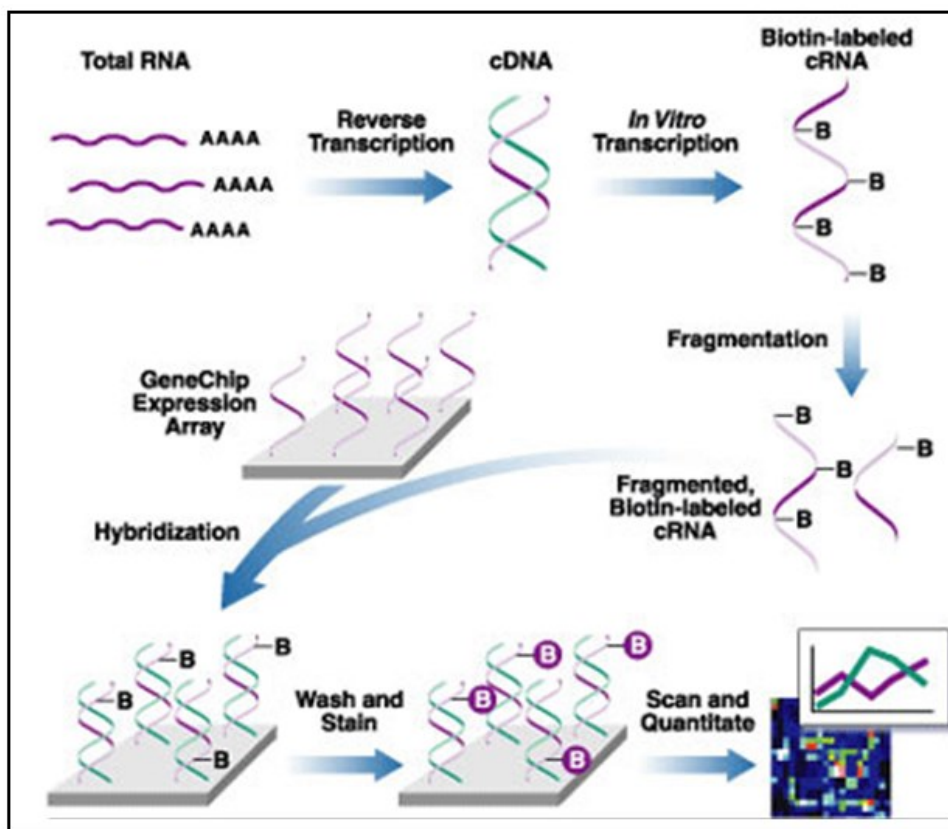


Figure 15. Schéma résumant les étapes d'une étude d'expression globale à l'aide de puces.

Les ARNs totaux extraits sont retro-transcrits en ADN complémentaire (ADNc) double brin. Une transcription *in vitro* permet ensuite la synthèse d'ARN complémentaire (ARNc) simple brin étiqueté par de la biotine ou un fluorochrome. Il y a alors fragmentation de l'ARNc, dépôt des fragments marqués sur la puce et hybridation des molécules marquées avec les sondes présentes sur la puce (les sondes sont des molécules d'ARN fixées immobilisées sur un support). Chaque spot est excité par un laser et l'intensité de la fluorescence émise est enregistrée. Il est ainsi possible de connaître le niveau d'expression de chaque gène de la cellule étudiée.

(D'après <http://www.cfghiotech.com/microarray/protocols>)

Comme les GWAS, les études d'expression « génome entier » conduisent à effectuer de nombreux tests statistiques et imposent donc des précautions pour limiter le nombre de faux-positifs. Les gènes identifiés doivent être impérativement validés par qPCR (**Figure 16**) à l'aide des échantillons utilisés pour les puces dans les études diagnostiques et pronostiques comme dans les études physiopathologiques. Idéalement la validation des résultats doit également être faite dans une cohorte indépendante²²².

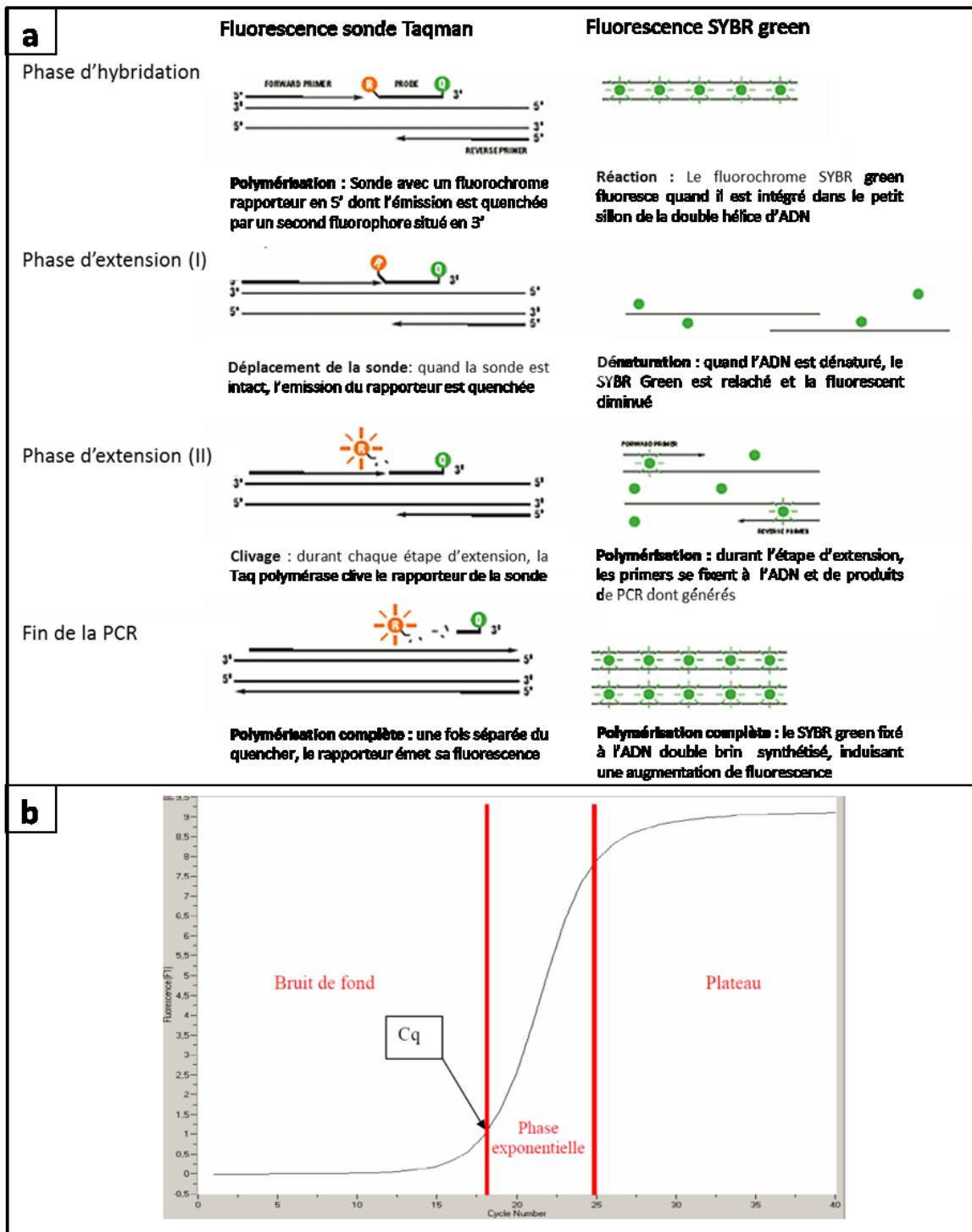


Figure 16. Schéma rassemblant les principales étapes de la PCR quantitative en temps réel (PCRq).

L'ARN total est rétro-transcrit en ADNc qui est ensuite amplifié par PCR. Cette technique mesure à chaque cycle la quantité d'amplicons synthétisés à l'aide de marqueurs fluorescents. (a) deux formats de fluorescence existent, le premier utilise une sonde interne fluorescente spécifique de la séquence nucléotidique du produit amplifié (sonde Taqman, par exemple), le second s'incorpore dans la double hélice d'ADN de façon non spécifique (le SYBR green). (b) plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faudra de cycles pour détecter le produit d'amplification. Comme mesure de la fluorescence

on utilise le Cq, qui est le nombre de cycles correspondant au début ou au point d'inflexion de la phase exponentielle de la courbe de croissance. Le bruit de fond défini par le Cq obtenu après PCR mais sans rétro-transcription est soustrait et les données sont normalisées en utilisant des gènes de ménage. Le plus souvent la quantité relative est calculée à l'aide d'un pool d'échantillons de références.

Lors du design d'une étude transcriptomique, plusieurs paramètres sont à prendre en considération. Tout d'abord, la taille de l'échantillon à rassembler afin d'avoir une puissance statistique nécessaire est à étudier. Ensuite, il est indispensable de s'attarder sur les critères de sélection des témoins et des patients (âge, sexe, antécédent familiaux, profil de malade, âge du début de la maladie et durée d'évolution, traitements reçus). Enfin, le type de puces d'expression et le nombre de gènes analysés sont à examiner.

Dans le cadre de la SpA, une dizaine d'études ayant pour objet d'identifier une signature transcriptomique de la maladie dans divers tissus ont été précédemment publiées et sont décrites ci-dessous (**Tableau 7**).

Auteurs	Date	Type de puce	Nombre de sondes / EST / transcrits	Nombre de patients SpA (P)	Nombre de témoins sains (T)	Tissus / cellules étudié(e)s	Nombre de gènes différentiellement exprimés entre P et T	Critères de sélection (P et F)*
Gu <i>et al.</i>	2002	Atlas Human Array 7740–1 Nylon	588 transcrits	7 SpA et 6 PsA	7	PBMCs	4 entre SpA et T 4 entre PsA et T 3 entre SpA et PsA	p<0,05
Rihl <i>et al.</i>	2004	Atlas Human 1.2 array Nylon Array	1185 EST	3 SpA	4	biopsies tissus synoviaux	18	F=1,5 et p<0,05
Laukens <i>et al.</i>	2006	Type VII silane-coated slides Array	74828 EST	15 SpA	10	biopsies colon	464	F≤ et ≥1,5 et p<0,05
Rihl <i>et al.</i>	2008	Atlas Human 1.2 array Nylon Array	1185 EST	3 SpA	4	fluide articulation SI	47	F≤ et ≥2
Smith <i>et al.</i>	2008	Affymetrix U133 Plus 2.0 GeneChip	47000 transcrits	8 SA	9	macrophages dérivés de monocytes	141	F≤ et ≥1,25 et p<0,01
Gu <i>et al.</i>	2009	Sentrix Human Ref-8_v2 Beadchips	20000 sondes	46 USpA et 44 SA	46	PBMCs	4 entre SA et CT 38 entre USpA et CT	F≤ et ≥2
Sharma <i>et al.</i>	2009	Affymetrix U133 Plus 2.0 GeneChip	47000 transcrits	18 SpA	25	sang total	107	F≤ et ≥1,5 et p<0,05
Duan <i>et al.</i>	2010	Illumina HT-12 BeadChips	48000 transcrits	18 SA	18	PBMCs	452	p<0,0005
Haroon <i>et al.</i>	2010	Affymetrix U133 Plus 2.0 GeneChip	47000 transcrits	16 SA	-	sang total	1428	p<0,05
Assassi <i>et al.</i>	2011	Illumina Human BeadChips	24000 sondes	16 SA	14	sang total	83	p<0,01
Pimentel-Santos <i>et al.</i>	2011	Illumina HT-12 BeadChips	48000 transcrits	18 SA	18	sang total	221	F≤ et ≥1,5 et p<0,05

Tableau 7. Principales études de puces à expression menées sur la SA ou la SpA.

SI correspond à l'abréviation de sacro-iliaque. *P correspond à P-value et F à Fold-change.

A. Tissus inflammatoires

Quand cela est possible, les études transcriptomiques sont effectuées sur les organes ou tissus cibles de la maladie qui, selon toute vraisemblance, reflètent au mieux l'expression des gènes impliqués dans le mécanisme pathologique. Dans le cas de la SA, toutefois, l'accès aux articulations inflammatoires ou ankylosées est extrêmement difficile. Quelques études s'y sont pourtant intéressées.

Ainsi, des biopsies de tissus synoviaux provenant de 3 patients atteints de SpA et 3 sujets témoins, qui étaient des patients atteints d'arthrose, ont fait l'objet d'une telle étude²²³. Des différences d'expression ont été observées entre SpA et arthrose, mais ces résultats n'ont pas été validés. Du fait de la très petite taille de son échantillon cette étude manquait de puissance. De plus, elle concernait des articulations périphériques, ce qui permettait une comparaison avec d'autres pathologies comme l'arthrose. L'articulation sacro-iliaque et le rachis sont pourtant davantage caractéristiques de la SA. Rihl *et al.* en 2008 ont d'ailleurs mené des travaux sur l'articulation sacro-iliaque, qui ont permis d'identifier la surexpression de l'*IL-7* chez des patients atteints de SpA comparés à ceux atteints d'arthrose²²⁴. Ces résultats ont cependant, là encore, été obtenus à partir d'un très petit échantillon et n'ont pas été confirmés.

D'autres tissus cibles de la SpA comme le colon ont également été analysés. Dans des travaux menés en 2006, comparant les profils d'expression de patients atteints de SpA avec ou sans MICI avec des patients atteints de maladie de Crohn ainsi que des individus sains²²⁵. Les patients atteints de SpA sans MICI possédaient un profil transcriptomique similaire à celui des témoins sains, alors que les patients avec MICI présentaient un profil proche de ceux atteints de maladie de Crohn, démontrant ainsi une similitude entre ces deux pathologies. En tout, 95 gènes différentiellement exprimés entre les différents groupes ont été identifiés, mais aucune voie de signalisation n'a cependant été mise en évidence.

La difficulté de prélever les tissus effectivement lésés dans la SpA ainsi que le rôle du système immunitaire ont conduit les chercheurs à étudier le sang total et les cellules circulantes.

B. Sang total

La première étude transcriptomique sur sang total, conduite sur 18 patients atteints de SpA et 25 personnes saines, et réalisée à l'aide de puces constituées de 54 000 sondes couvrant 47 000 transcrits, a été publiée par Sharma *et al.* en 2009²²⁶. Vingt transcrits jouant un rôle dans le système immunitaire ou l'inflammation ont été identifiés puis confirmés dans une deuxième cohorte d'individus, constituant une signature immune. En particulier, la surexpression des gènes codant pour deux récepteurs à l'IL-1 et la MAPK14 ainsi que la sous-expression du gène du récepteur des cellules NK NCR3, ont été observées chez les patients comparés aux témoins. De plus, les 4 transcrits de 4 gènes avec un rôle dans le remodelage osseux, dont BMP6 et osteonectin, étaient augmentés chez les malades.

Une étude plus récente comparant 16 patients avec une SA à 14 témoins sains, ainsi qu'à des patients atteints de lupus érythémateux ou de sclérodémie diffuse, a mis en évidence 83 gènes différentiellement exprimés entre SA et témoins sains, avec une dérégulation de plusieurs voies de signalisation telles que NF- κ B, TLR, TREM1, la maturation des cellules dendritiques et la réparation de l'ADN²²⁷. De plus, la surexpression des gènes codant pour les TLR4 et TLR5 a été notée et répliquée dans un second échantillon.

Pimentel-Santos *et al.* ont rapporté, dans des travaux comparant le profil d'expression 18 SA à 18 sujets sains, en utilisant des puces de 48 000 sondes, que 221 gènes étaient différentiellement exprimés²²⁸. Quatorze ont été validés dans une seconde cohorte, dont l'*osteonectin* et *EP300* qui jouent un rôle dans le métabolisme du cartilage et des os. Le gène *osteonectin* était également surexprimé dans les travaux de Sharma *et al.*

L'identification de marqueurs diagnostiques, pronostiques ou théranostiques est également réalisable à partir de profils d'expression pangénomique. Ces études cherchent davantage à discriminer des sous-groupes de patients selon leur signature transcriptomique associée à un pronostic ou à une réponse à un traitement, qu'une voie de signalisation impliquée dans la pathologie. Ceci implique un design d'étude quelque peu différent. Haroon *et al.* par exemple, ont comparé les transcrits de 16 patients atteints de SA avant et après avoir reçu des anti-TNF²²⁹. Sur 25 000 transcrits, 1 428 gènes étaient différentiellement exprimés en réponse au traitement. Parmi eux, 4 gènes confirmés par RT-

PCR quantitative, sont associés à l'inflammation et présentaient une diminution d'expression après la prise d'anti-TNF, incluant *LIGHT*, membre de la superfamille du TNF, l'« *interferon α receptor 1* » (*IFNAR1*), l'*IL17R* et l'« *erythropoietin receptor* » (*EPOR*). La quantité de protéine *LIGHT* était également corrélée avec des marqueurs de l'inflammation comme la CRP.

L'étude des ARNs obtenus à partir du sang total présente plusieurs difficultés. En effet, ces ARNs sont contaminés par les messagers très abondants de la globine. Il est désormais cependant possible de les soustraire de la préparation, ainsi que les ARNs ribosomiques, avant la synthèse des ADNc. Il reste que les leucocytes du sang total représentent un mélange hétérogène de cellules de différents types, en pourcentage très variable et avec des fonctions très diverses dans la réponse immune. L'analyse simultanée de leurs transcriptomes complique donc la quantification des transcrits pertinents s'ils sont exprimés dans un type cellulaire minoritaire ou sont régulés de façon distincte selon le type cellulaire. L'isolement des cellules mononucléées du sang périphérique (ou PBMC en anglais) par centrifugation sur un coussin de ficoll constitue donc une option simple pour éliminer les granulocytes, la population en général majoritaire, et focaliser l'analyse du transcriptome sur l'ensemble des lymphocytes (T ou B et leurs sous-populations), les cellules NK et les monocytes.

C. Leucocytes du sang circulant

Une première étude a ainsi comparé le profil d'expression des gènes obtenus à partir des PBMCs de témoins et de patients atteints de SpA, d'arthrite psoriasique et de PR ²³⁰. Une puce couvrant 588 gènes a été utilisée et a permis d'identifier une signature de gènes surexprimés dans les trois types d'arthrite, comme des molécules de signalisation, des marqueurs macrophagiques, ou des récepteurs. Un seul gène a été remarqué par les auteurs comme étant capable de différencier la SpA des autres conditions, le « *myeloid nuclear differentiation antigen* » (*MNDA*).

Gu *et al.* ont mené d'autres travaux à partir de PBMCs, provenant cette fois-ci de patients atteints de SA ou de SpA indifférenciée et d'individus sains, en utilisant des puces comprenant 20 000 sondes couvrant plus de 16 000 gènes ²³¹. Un gène surexprimé chez les

patients atteints de SpA indifférenciée, le « *Regulator of G protein signaling 1* » (*RGS1*), activé par le TNF- α et l'IL-17, a été identifié comme bio-marqueur potentiel pour distinguer cette pathologie.

Récemment, une étude a comparé le profil d'expression de PBMCs de 18 patients atteints de SA et 18 individus sains, appariés sur l'âge et le sexe, à partir d'une puce de 48 000 sondes²³². En tout, 452 gènes différentiellement exprimés ont été identifiés, dont 3 gènes candidats confirmés dans une seconde cohorte, présentaient une forte sous-expression chez les patients comparés aux témoins : « *nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2* » (*NR4A2*), « *TNF α -induced protein 3* » (*TNFAIP3*) et *CD69*. Le rôle établi de ces gènes dans l'inflammation ou l'immunité conforte l'hypothèse de l'altération d'un mécanisme immunitaire dans la SA.

Enfin, il est possible d'isoler à partir des PBMCs des populations de cellules d'intérêt particulier pour la pathologie étudiée. Smith *et al.* ont ainsi dérivé des macrophages à partir des monocytes isolés du sang de 8 patients atteints de SA et de 9 témoins sains et les ont stimulés en présence d'interféron (IFN)- γ et de LPS²³³. L'étude transcriptomique de ces cellules a été réalisée avec des puces contenant 40 000 sondes, et a permis l'identification de 141 gènes différentiellement exprimés entre patients et témoins. Parmi ces gènes, une signature IFN- γ inversée, avec une réduction des gènes induit par IFN- γ et de l'IFN- γ lui-même, a été mise en évidence. Le traitement de ces macrophages par de l'IFN- γ exogène a permis de supprimer cette différence d'expression. Sachant que l'IFN- γ favorise la différenciation des Th1 plutôt que celle des Th17, il a été proposé que la dérégulation de la voie de l'IFN- γ mise en évidence ici puisse être à l'origine d'une augmentation des TH17 dans la SA. Il est tout à fait remarquable que des résultats très similaires aient été obtenus dans les cellules dendritiques du modèle animal privilégié de la SpA, le rat transgénique pour HLA-B27²³⁴.

Les études décrites ci-dessus, menées dans des conditions extrêmement variables (type de tissu / cellule, type de puces, nombre de gènes et taille des échantillons), n'ont donc pas permis de définir un profil d'expression univoque, spécifique de la SA. Néanmoins, une dérégulation de la réponse immune semble ressortir clairement de ces travaux. La combinaison de ces différentes données dans une méta-analyse permettrait potentiellement

d'atteindre une puissance plus importante pour identifier une signature d'activité des gènes impliqués dans la SA. D'autre part, étudier le profil d'expression de cellules jouant directement un rôle dans la maladie, comme les DCs ou les LT CD4⁺, permettrait peut-être de refléter davantage les changements d'activité des gènes jouant un rôle dans la SA ou dans la SpA dans son ensemble.

Objectifs du travail de thèse

Mon travail de thèse s'inscrit dans un projet de recherche global visant à améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans la SpA. Pour se faire, nous avons utilisé différentes approches : une approche génétique focalisée sur le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) afin d'identifier de nouveaux facteurs de susceptibilité impliqués dans la SpA au sein de cette région et une approche de génomique fonctionnelle, reposant sur une stratégie transcriptomique pan-génomique. Nous avons opté pour la complémentarité de ces deux approches que nous avons conduites en parallèle.

Le premier objectif était de parvenir à l'identification de nouveaux variants significativement associés à la SpA situés dans la région du CMH et distincts de HLA-B27. Un criblage de cette région par une étude d'association portant sur une collection de 146 familles comprenant 1 068 individus, dont 439 atteints de SpA a été tout d'abord menée. Nous avons ensuite étendu le génotypage de certains marqueurs d'intérêt à deux autres cohortes composées, pour l'une de 142 trios et pour l'autre de 543 cas et de 394 témoins afin de tenter de répliquer nos premiers résultats.

Notre autre objectif était de comparer les capacités fonctionnelles des cellules dendritiques dérivées de monocytes et d'étudier les gènes différentiellement exprimés par ces cellules entre patients atteints de SpA et témoins sains. Nous nous sommes tout particulièrement intéressés aux DCs car ces cellules pourraient jouer un rôle important dans le développement de la maladie, comme cela a été précédemment mis en évidence dans le modèle animal du rat transgénique HLA-B27 qui développe une SpA. Ainsi, caractériser les altérations fonctionnelles éventuelles des MD-DCs de patients puis tenter de les corrélérer à un profil d'expression génique particulier nous paraissait une approche complémentaire de l'étude génétique ci-dessus, en vue d'améliorer la compréhension de la physiopathologie de cette maladie.

Deuxième partie
TRAVAUX ORIGINAUX

Article 1

Association of Major Histocompatibility Complex loci independently of HLA-B27 in French patients with spondyloarthritis

Alice Talpin, Maxime Breban, Henri-Jean Garchon

Article en préparation.

Association de locus du Complexe Majeur d'Histocompatibilité indépendamment de HLA-B27 chez des patients français atteints de Spondylarthrites

La région du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est très fortement associée à la SpA, et cela est généralement expliqué par l'allèle HLA-B27. Néanmoins, des études familiales suggèrent que la contribution de HLA-B27 est inférieure à 40% de l'ensemble du déterminisme génétique de la SpA, alors que l'effet global de la région du CMH serait de 50% (Brown 1997). Par ailleurs, le CMH est la région du génome la plus dense en gènes et la plus polymorphe du génome humain. Pour plusieurs pathologies inflammatoires et/ou auto-immunes associées au CMH, une analyse détaillée a permis de montrer que d'autres allèles que les allèles HLA classiques pouvaient être impliqués dans la prédisposition à ces maladies. Par analogie, il est donc plausible que le CMH contienne d'autres gènes distincts de B27 pouvant influencer la susceptibilité à la SpA. Pour tester cette hypothèse, nous avons entrepris des études d'association dans 3 cohortes représentant un échantillon total de 1198 patients atteints de SpA et 1067 témoins sains.

Avant mon arrivée au laboratoire, une étude de liaison génome entier à l'aide de puces à ADN pan-génomique Affymetrix® de 250 000 SNPs, portant sur 154 familles multiplex du GFEGS composées de 1068 individus (dont 439 patients atteints de SpA) avait été menée. La première étape de mon projet a été d'extraire les données du CMH et les régions adjacentes, correspondant à 10 Mb de chaque côté de HLA-B, pour effectuer une étude d'association,

prenant en compte l'effet de HLA-B27, avec les 1134 SNPs de cette région (densité moyenne de 20kb). Nous avons ainsi identifié 47 variants associés à la SpA distinct de HLA-B27 (p -value $< 0,01$), 30 situés sur le chromosome porteur de l'allèle HLA-B27, 17 par le chromosome alternatif.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à confirmer ces résultats dans une cohorte indépendante composée de 142 trios (216 patients/208 témoins). Pour cela, nous avons sélectionné et génotypé 38 SNPs taggant les 47 identifiés avec la collection familiale. Cinq variants ont atteint le seuil de significativité (p -value $< 0,05$) avec l'étude d'association conditionnée sur HLA-B27, qui a ensuite été menée. Une deuxième cohorte de réplique, composée de 543 patients atteints de SpA et 394 témoins indépendants, a ensuite été utilisée. Parmi les 3 SNPs sélectionnés pour cette étude de réplique, une seule association significative, indépendante de HLA-B27, a été observée pour le variant rs5025315 ($P= 0,0197$), situé à 24 kb du gène *MICA* et 18kb de *HLA-B*. Ce polymorphisme est fortement associé à deux autres SNPs inclus dans le même panel de génotypage et voisins de moins d'un Kbases. Un autre variant semble proche d'une association significative à la SpA, le rs7761118 qui se situe dans un intron du gène *MAPK14* et à 4,6 Mb de *HLA-B*.

Ce travail a mis en évidence cinq nouveaux loci de susceptibilité chez des patients atteints de SpA, dans la région du CMH et distincts de HLA-B27. Des investigations supplémentaires sont à entreprendre pour identifier, le ou les variant(s) causal(aux) et leur influence sur la fonction et la régulation des gènes situés à proximité.

Association of Major Histocompatibility Complex loci independently of HLA-B27 in French patients with spondyloarthritis

Alice Talpin, M S, ^{1,4} Maxime Breban M D Ph D, ^{1,2,4} Henri-Jean Garchon, M D PhD ^{1,3,4}.

- 1- *Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS (URM8104), Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cite, Laboratoire d'excellence INFLAMMEX, Paris, 75014 France;*
- 2- *Rheumatology Division, Ambroise Paré Hospital (AP-HP), and Versailles Saint Quentin en Yvelines University, Boulogne-Billancourt, 92100, France;*
- 3- *Genetics Division, Ambroise Paré Hospital (AP-HP), and Versailles Saint Quentin en Yvelines University, Boulogne-Billancourt, 92100, France;*
- 4- *UFR des Sciences de la Santé, Simone Veil, Versailles Saint Quentin en Yvelines University, Montigny-Le-Bretonneux, 78180, France;*

Address reprint requests and correspondence to:

Henri-Jean Garchon

2 Avenue de la source de la Bievre

78180 Montigny-le-Bretonneux

E-mail: henri-jean.garchon@inserm.fr

Keywords: SpA, HLA-B27, genetics, MHC, conditional approach

ABSTRACT

Objective. Spondyloarthritis (SpA) has a clear familial predisposition, the major histocompatibility complex (MHC) region being the strongest genetic factor. The aim of the current study is to examine the association between the MHC region and susceptibility to spondyloarthritis (SpA), independently of HLA-B27 allele.

Methods. We analysed 1198 SpA patients and 1067 healthy controls from 3 French cohorts, composed of multiplex families, trios and cases-controls respectively. Initially, 1134 SNPs were genotyped between 20 and 40 Mb from the telomere of chromosome 6p. Afterwards significantly associated SNPs were selected for replication. Association analyses were carried out with UNPHASED V.3.1.4, using the conditioning options. Linkage disequilibrium was estimated with Haploview V.4.2.

Results. A total of 47 SNP markers showed significant association to SpA ($P < 0.01$), independently of HLA-B27, in the discovery cohort. Five of them were replicated in the second cohort (rs10946676, rs1048443, rs5025315, rs7761118 and rs963835). Moreover, SNP rs5025315 was also replicated in the case-control cohort. It is located in the intergenic region between HLA-B and MICA.

Conclusion. The data suggest that MHC loci other than HLA-B27 play a role in SpA. Which fraction of the missing heredity is explained remains to be determined.

INTRODUCTION

Spondyloarthritis (SpA) is a major chronic inflammatory rheumatic disorder with a prevalence of 0.3% in the French adult population ¹. It is characterized by axial arthritis and enthesitis, which designates the inflammation at the attachment of tendons and ligaments to bones, frequently extending to the peripheral joints ². Extra-articular involvement (psoriasis, uveitis, inflammatory bowel disease) is also commonplace.

There is compelling evidence that genetic factors play a primary role in predisposition to SpA. Based on the rate of concordance among twin pairs, it is assumed that they contribute 90% of the whole SpA risk ³. The most important part comes from the HLA-B27 allele that is present in 80% of the Caucasian SpA patients vs. 7.5% of the population. This very tight association was first reported 40 years ago, but the underlying mechanism remains poorly understood ^{4 5}. Importantly, inheritance of HLA-B27 is neither mandatory nor sufficient for SpA to develop. In addition to HLA-B27, other loci have previously been associated with ankylosing spondylitis, most notably through recent genome-wide association studies ⁶⁻¹⁰. Nevertheless, such susceptibility factors currently account for a small part of SpA heritability in addition to B27 and much of the genetic component remains to be explained.

The HLA-B27 allele is encoded by the major histocompatibility complex (MHC); this region of 4 Mbases on chromosome 6p21 plays a key role in immunity and is remarkable by its density of genes and its polymorphism, the highest of the human genome ^{11 12}. In several inflammatory or autoimmune diseases associated with HLA alleles, the MHC component appears to be complex, involving genes other than classical HLA ¹³⁻¹⁵. Likewise, in SPA, even though HLA-B27 accounts for a large part of the MHC association, evidence suggests a role for other MHC genes ¹⁶. Indeed, other HLA genes such as HLA-DR and *MICA* and non-HLA loci such as *TNF α* and genes whose products are involved in antigen-presentation by HLA class I molecules (*LMP2*, *LMP7*, and *TAP*) have been considered ¹⁷⁻²³.

The major difficulty in searching for these additional MHC genes, however, has been the unique strength of the HLA-B27 association with SPA that masks more modest effects as a consequence of potential linkage disequilibrium. To address this issue, the present study uses a family-based design as it allows efficient phasing of alleles at closely linked loci and therefore assessing effects independently of B27. We also used microarray genotyping data that provide a less biased coverage of the MHC region those candidate loci. We also used two replication cohorts to minimize the risk of falsely positive findings.

MATERIALS AND METHODS

Patients and controls

An initial cohort composed of 136 multiplex Caucasian families consisting of one or several cases of SpA and their relatives recruited in France by the Groupe Français d'Etude Génétique des Spondylarthrites (GFEGS), representing 1068 individuals including 439 patients and 465 healthy controls.

For replication, we used a first cohort of 146 trios (each consisting of 1 patient and both parents), including 216 patients affected with SpA (the number of patients exceeded that of trios, because parents were frequently affected) and 208 healthy controls recruited through the GFEGS, as previously described. The second replication cohort was composed of 543 unrelated SpA cases and 394 healthy controls, all Caucasians, recruited through the GFEGS, as previously described.

The diagnosis of SpA was made according to the classification criteria of Amor *et al.* ²⁴ and/or the European Spondylarthropathy Study Group (ESSG) ²⁵. Within the group of SpA, AS was diagnosed according to the modified New York criteria ²⁶. The phenotypic description of patients from the three cohorts is given in **Supplementary Table 1**.

DNA isolation, HLA-B typing and SNP genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using standard methods. HLA-B typing was routinely performed by microcytotoxicity. For some subjects, HLA-B27 was also typed by a polymerase chain reaction (PCR)-based sequence-specific method ²⁷. High-throughput genotyping of the discovery cohort was performed on Affymetrix 250K NspI genotyping microarrays at the Centre National de Génotypage (CNG) following the manufacturer's protocol. For the replication datasets, genotyping was performed with customized Illumina BeadXpress Veracode bead arrays.

Statistical tests

Only SNPs that met the quality, based on sufficient genotyping rate (> 95%), conformity with Hardy-Weinberg genotypic proportions ($P > 0.001$) and minor allele frequency above 0.01, were selected for further association analysis.

Family-based association tests were performed with UNPHASED v3.14 ^{28 29}, using relevant options for conditioning analyses on the B27 allele or the alternate chromosome where necessary.

Computation of linkage disequilibrium parameters (D' and r^2) and their graphical representation were done with the Haploview programme v4.2 ³⁰.

RESULTS

A family-based association study was performed in an initial cohort of 136 SPA families to identify MHC SNPs modifying SpA predisposition independently of HLA-B27. The subjects had been genotyped using whole-genome genotyping microarrays. We extracted the data corresponding to a 20 Mb region surrounding the HLA-B locus, between chromosomal positions 20 Mb and 40 Mb. The HLA-B gene is located at 31.32 Mb, therefore at the center of the investigated region that included 1134 SNPs. We first performed a single-SNP association analysis that revealed 61 markers significantly associated to SpA (data not shown). Unsurprisingly, the most strongly associated allele was HLA-B27 itself ($P=6.97 \times 10^{-27}$).

To offset this major effect, we conditioned the association analysis on HLA-B27. We used the UNPHASED software that, for a test marker allele, allows to estimate the component of its association that is independent of the conditioning marker allele. Altogether, this approach uncovered 47 markers associated with SpA independently of HLA-B27 at the nominal significance threshold of 0.01 (**Figure 1, Supplementary Table 2 and Supplementary Table 3**). For 30 of these markers, the association was significant when the test allele was on the same chromosome as HLA-B27 whereas for the other 17 SNPs, the association occurred on the alternate chromosome. As seen on Figure 1, associated SNPs were scattered across the 20 Mb region even though some of them seemed to be clustered. On the telomeric side of the region, the most significantly associated SNP, rs10946676 ($P=4.1 \times 10^{-4}$), mapped in an intron of the neurensin (*NRSN1*) gene, at 24.25 Mb, i.e. 7 Mbases distant from HLA-B. On the centromeric side, the most significantly associated SNP, rs4713939 ($P=3.22 \times 10^{-4}$), mapped between the *BRPF3* (Bromo domain and PHD finger containing, 3) and *PNPLA1* (patatin-like phospholipase domain containing 1) genes, at 36.31 Mb. Nearby, rs7761118, mapping in an intron of the *MAPK14* gene at 36.17 Mb, also showed a significant association with SpA and was in linkage disequilibrium with rs4713939 (**Supplementary Figure 1**).

Conversely, the SNP associated with SpA independently of HLA-B27 and located the closest to it, was rs5025315 ($P=5.50 \times 10^{-3}$). It maps at only 18 kb from HLA-B, in the intergenic region between *HLA-B* and *MICA* (MHC class I chain-related gene A) that also includes three pseudogenes, *DHFRP2*, *FGFR3P* and *ZDHHC20P2*. This SNP is closely associated (pairwise $r^2 = 0.77$) with two others SNPs, rs5022119 and rs2523638, of the dataset (**Figure 2**) that also are associated with SpA independently of HLA-B27. The three SNPs lie in a segment of 669 base pairs.

Next, we selected 38 SNPs tagging the 47 SNPs identified in the discovery cohort and we tested them in a second independent cohort of 146 trios. Following conditional testing on B27, five SNPs emerged from this second round (**Table 1**). We tested them in a second cohort of unrelated cases ($n= 543$) and controls ($n= 394$). As shown in Table 1, only one SNP, rs5025315, was significantly associated with

SpA independently of B27 ($P=0.0197$). However, a second SNP, rs7761118 in *MAPK14*, showed a trend.

DISCUSSION

The genetics of SpA is largely dominated by its association with HLA-B27. However, this only partially explains the risk to develop the disease and other factors must be involved. Recent GWAS have been most successful in discovering new loci unlinked to the MHC but they still leave a substantial portion of missing heredity. Whether a part of this missing heredity lies in the MHC alongside B27 remains open to investigation. To address this issue, we used a family-based association design that is less sensitive to population stratification with conditioning on HLA-B27; we also targeted a large region of 20 Mb surrounding the HLA-B locus with genotyping microarray data that provide a reasonable coverage of one SNP per 18 Kb. We then attempted to replicate the initial findings using two independent cohorts.

On this basis, we identified one SNP, rs5025315 that satisfied the stringent requirement of three rounds of testing. It maps between *HLA-B*, at 18 Kbases, and *MICA*, at 25 Kbases. It might therefore modify expression of HLA-B or MICA or both. The *MICA* gene product belongs to the family of MHC class I-like proteins; it is expressed on the cell surface and is a ligand of the activating natural killer (NK) cell receptor NKG2D that is expressed on the surface of NK cells, $\gamma\delta$ T cells and $\alpha\beta$ CD8 T cells³¹. It has been convincingly argued that NK cells might play a role in SpA pathogenesis^{32 33}. Furthermore, association of *MICA* alleles with SpA has been reported^{18 34}. The *MICA* gene is therefore a candidate that might modify the main disease risk conferred by HLA-B27.

Apart from this SNP, association of four other SNPs was replicated in the trio cohort but not in the case-control one, perhaps because of the different design. They are nonetheless worth commenting. One of them, rs7761118, actually showed a trend in the association test of the case-control cohort. Furthermore, it maps in an intron of *MAPK14* (mitogen-activated protein kinase 14) whose product acts as an integration point for multiple biochemical signals and is involved in a wide variety of cellular processes such as proliferation, differentiation and transcription regulation, notably in innate immunity cells. Indeed, MAPK14 is strongly activated in joints of patients with rheumatoid arthritis (RA)^{35 36} and also appears to be dysregulated in relation with HLA-B27 expression³⁷.

SNP rs10946676 was highly associated to SpA in studies conditioned on the same chromosome as HLA-B27, in two cohorts. Located at 24.25 Mb, whereas HLA-B locus is situated at 31.32 Mb is within one intron of neurensin gene (*NRSN1*). *NRSN1* encodes a protein that plays a role in neural organelle transport and in transduction of nerve signal. A recent study revealed that *NRSN1* is differentially expressed in patients with Hirschsprung disease, a congenital gut motility disorder³⁸.

SNP rs10484431 is located in intronic within Solute Carrier Family 17 (Sodium Phosphate), Member 2 (SLC17A2) at 26.03 Mb. It is a poorly characterised gene and encodes a protein implicated in phosphate transport.

Finally, rs963835, situated at 37.34 Mb is intronic within Ring Finger Protein 8, E3 ubiquitin protein ligase (RNF8). This gene encodes a protein that may act as an ubiquitin ligase and play a role in the DNA damage response.

The biological significance of these genetic associations remains to be determined. A detailed characterization of the genomic variation around the associated markers and of the patterns of association alongside a functional analysis of gene expression will be necessary to pinpoint the causative variants and their mode of action in pathogenesis.

FIGURES AND TABLES

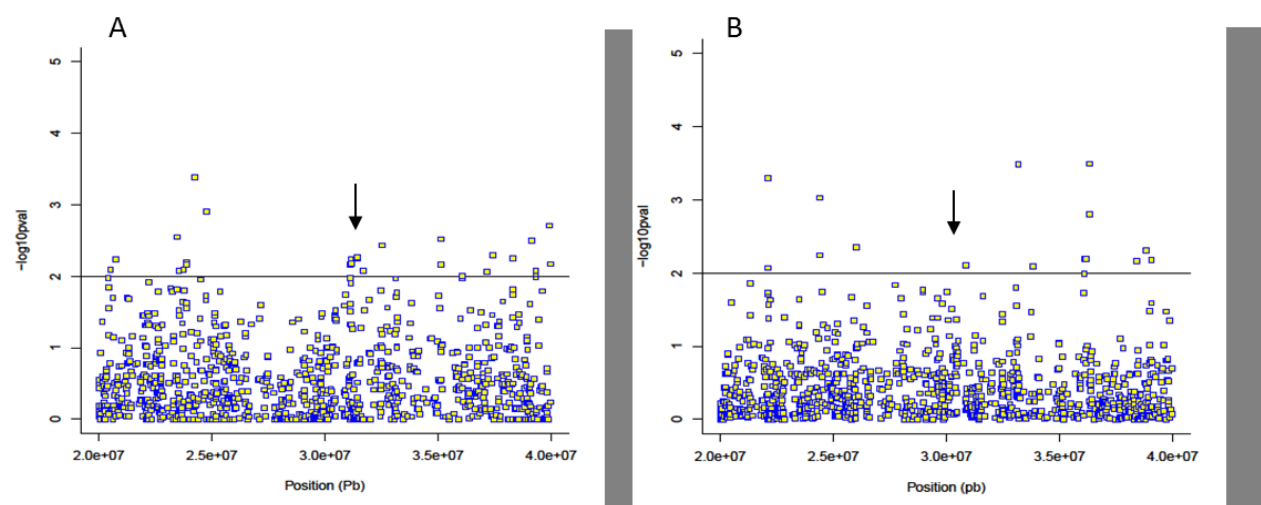


Figure 1. Single-marker association tests of 1,134 SNPs in a 20 Mbases interval flanking the MHC on chromosome 6p. The \log_{10} of the P values of the association tests conditioning on the presence (A) or absence (B) of HLA-B27 are plotted on the y axis against the chromosomal position on the x axis. The arrow points to the HLA-B locus.

Table 1. Association tests for the 5 SNPs that were replicated in the second cohort.

SNP	Position (pb)	Gene symbol	Location	Conditionnal on	Risk allele	Minor Allele Frequency		<i>P</i> cohort 1	<i>P</i> cohort 2	<i>P</i> cohort 3
						Patients	Controls			
rs10946676	24,144,867	<i>NRSNI</i>	Intron	HLA-B27+	C	0.058	0.057	0.0004	0.0085	1.0000
rs10484431	25,926,674	<i>SLC17A2</i>	Intron	HLA-B27-	G	0.27	0.23	0.0045	0.0489	-
rs5025315	31,343,604	<i>MICA</i>	Intergenic	HLA-B27+	G	0.67	0.51	0.0055	0.0039	0.0197
rs7761118	36,008,303	<i>MAPK14</i>	Intron	HLA-B27-	A	0.096	0.086	0.0064	0.0284	0.0918
rs963835	37,338,969	<i>RNF8</i>	Intron	HLA-B27+	G	0.45	0.45	0.0050	0.0186	-

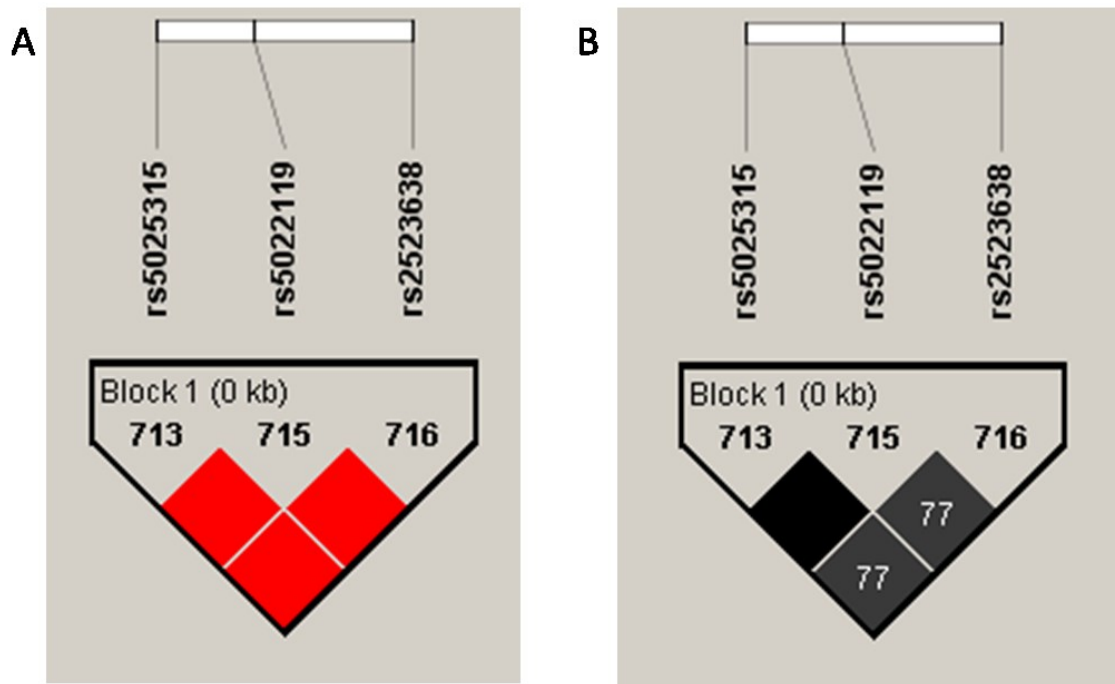


Figure 2. Pairwise linkage disequilibrium of rs50125315 with neighbor markers using (A) the D' and (B) the r^2 coefficients. The darker the hue, the stronger the LD. In (A), the D' is equal to 1. In (B) the numbers in the boxes correspond to the r^2 coefficient (x100).

SUPPLEMENTARY FIGURES AND TABLES

Supplementary Table 1. Clinical characteristics of patients with Spondyloarthritis included in the study.

Characteristics	1st cohort (n=439)	2nd cohort (n=216)	3rd cohort (n=543)
Age in years, mean \pm SD	41.13 \pm 13.83	41.09 \pm 15.35	45.63 \pm 13.15
Age at onset, in year, mean \pm SD	24.16 \pm 10.51	23.21 \pm 9.94	26.55 \pm 10.96
Sex ratio of men:women	229:210	133:83	267:276
HLA-B27 positivity (%)	94.97	90.23	76.79
Axial manifestations			
Back/buttock pain (%)	97.72	93.95	90.61
Sacroiliitis (radiography)* (%)	58.73	58.13	50.21
Peripheral manifestations			
Peripheral arthritis (%)	40.09	39.43	41.42
Peripheral enthesitis (%)	66.51	67.14	77.12
Extra-articular manifestations			
Uveitis (%)	28.47	25.82	23.47
Psoriasis (%)	23.23	31.46	26.81
Inflammatory bowel disease (%)	5.47	6.57	7.68
Spondyloarthritis subtype			
AS (%)	57.17	53.24	41.8
USpA (%)	32.12	32.41	37.01
PsA (%)	8.65	9.26	11.97
AIBD (%)	1.82	4.63	2.03

The registered manifestations correspond to those present at the time of examination, or retrieved from past medical history.

Inflammatory bowel disease: Crohn's disease or ulcerative colitis; AS, ankylosing spondylitis, uSpA, undifferentiated spondyloarthritis.

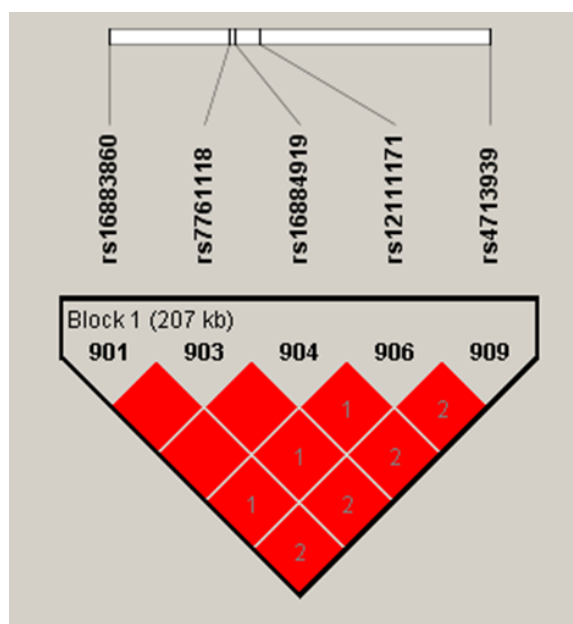
*Refers to radiographic sacroiliitis \geq grade II bilateral or grade III unilateral. AIBD, inflammatory bowel disease-associated arthritis;

Supplementary Table 2. Significant association tests for 30 SNPs after conditioning on HLA-B27 allele when the test allele was on the same chromosome as HLA-B27.

SNP	Position (pb)	Gene symbol	Location	Conditionnal on	Risk allele	Minor Allele Frequency		<i>P</i> cohort 1
						Patients	Controls	
rs9460501	20414686	<i>E2F3</i>	Intron	HLA-B27+	G	0.4226	0.4454	0.0081
rs9460546	20663632	<i>CDKAL1</i>	Intron	HLA-B27+	G	0.305	0.314	0.0059
rs1886703	23342714	-	Intergenic	HLA-B27+	C	0.3776	0.3722	0.0028
rs9358638	23439154	-	Intergenic	HLA-B27+	G	0.1893	0.2042	0.0085
rs791976	23642006	-	Intergenic	HLA-B27+	G	0.3447	0.31	0.0081
rs12200386	23781694	-	Intergenic	HLA-B27+	C	0.2517	0.245	0.0064
rs9393479	23790212	-	Intergenic	HLA-B27+	A	0.2506	0.245	0.0069
rs6456577	23792240	-	Intergenic	HLA-B27+	G	0.2489	0.2438	0.0069
rs9379588	23796178	-	Intergenic	HLA-B27+	G	0.2454	0.2383	0.0070
rs10946676	24144867	<i>NRSNI</i>	Intron	HLA-B27+	T	0.05782	0.05667	4.10E-04
rs2056999	24661511	<i>TTRAP</i>	Intron	HLA-B27+	T	0.3068	0.3144	0.0013
rs2517510	31030122	-	Intergenic	HLA-B27+	G	0.4955	0.4631	0.0069
rs2517489	31042306	-	Intergenic	HLA-B27+	A	0.4932	0.4542	0.0058
rs2523881	31042608	-	Intergenic	HLA-B27+	G	0.4932	0.4566	0.0067
rs2517471	31052098	-	Intergenic	HLA-B27+	G	0.4955	0.4622	0.0067
rs5025315	31343604	-	Intergenic	HLA-B27+	G	0.6712	0.5145	0.0055
rs5022119	31343862	-	Intergenic	HLA-B27+	T	0.6712	0.5133	0.0057
rs2523638	31344273	-	Intergenic	HLA-B27+	C	0.2732	0.4053	0.0055
rs9268877	32431147	-	Intergenic	HLA-B27+	A	0.4807	0.4811	0.0037
rs3800426	35009196	<i>ANKS1A</i>	Intron	HLA-B27+	G	0.3741	0.3744	0.0030
rs2820223	35009295	<i>ANKS1A</i>	Intron	HLA-B27+	C	0.5125	0.5045	0.0068
rs9296210	37063229	-	Intergenic	HLA-B27+	A	0.3425	0.3359	0.0087
rs963835	37338969	<i>RNF8</i>	Intron	HLA-B27+	G	0.4487	0.4456	0.0050
rs9296283	39034996	<i>GLP1R</i>	Intron	HLA-B27+	A	0.4499	0.4687	0.0032
rs7766275	39035836	<i>GLP1R</i>	Intron	HLA-B27+	C	0.449	0.4678	0.0032
rs1651110	38218008	-	Intergenic	HLA-B27+	A	0.2409	0.2339	0.0093
rs1744416	39221803	-	Intergenic	HLA-B27+	C	0.2415	0.2303	0.0085
rs9296313	39804451	<i>DAAM2</i>	Intron	HLA-B27+	G	0.04989	0.04889	0.0020
rs3008814	39860093	<i>DAAM2</i>	Intron	HLA-B27+	C	0.4761	0.5078	0.0067

Supplementary Table 3. Significant association tests for 17 SNPs after conditioning on HLA-B27 allele when the test allele was on the alternate chromosome.

SNP	Position (Mb)	Gene symbol	Location	Conditionnal on	A1	Minor Allele Frequency		<i>P</i> cohort 1
						SpA patients	Controls	
rs1928161	21996361	Pseudogen	Intron	HLA-B27-	T	0.3039	0.3222	0.0085
rs9358481	22012566	Pseudogen	Intron	HLA-B27-	G	0.1213	0.1122	0.0195
rs9368393	22022591	Pseudogen	Intron	HLA-B27-	G	0.4374	0.441	5.12E-04
rs11754278	24279076	<i>DCDC2</i>	Intron	HLA-B27-	A	0.1199	0.1269	9.41E-04
rs17302512	24281335	<i>DCDC2</i>	Intron	HLA-B27-	A	0.1241	0.1359	0.0057
rs10484431	25926674	<i>SLC17A2</i>	Intron	HLA-B27-	G	0.2727	0.2283	0.0045
rs4248148	30742134	-	Intergenic	HLA-B27-	A	0.1553	0.1166	0.0078
rs9380343	33079166	-	Intergenic	HLA-B27-	T	0.02727	0.03778	3.29E-04
rs4713674	33708169	<i>IP6K3</i>	Intron	HLA-B27-	A	0.3907	0.4388	0.0081
rs16883860	36002462	<i>MAPK14</i>	Intron	HLA-B27-	A	0.09567	0.08575	0.0064
rs7761118	36068303	<i>MAPK14</i>	Intron	HLA-B27-	A	0.09567	0.08575	0.0064
rs16884919	36071517	<i>MAPK14</i>	Intron	HLA-B27-	A	0.09567	0.08575	0.0064
rs9462165	36205440	-	Intergenic	HLA-B27-	T	0.1814	0.2022	0.0016
rs4713939	36209620	-	Intergenic	HLA-B27-	A	0.1633	0.1356	3.22E-04
rs16890577	38310891	<i>BTBD9</i>	Intron	HLA-B27-	C	0.03401	0.01222	0.0068
rs13209417	38719441	<i>DNAH8</i>	Intron	HLA-B27-	C	0.1059	0.09688	0.0049
rs1412267	38960677	<i>DNAH8</i>	Intron	HLA-B27-	T	0.4014	0.3822	0.0066



Supplementary Figure 1. Pairwise linkage disequilibrium (LD) between rs7761118 in an intron of *MAPK14*. The markers are in complete LD ($D' = 1$). The numbers in the boxes correspond to the pairwise r^2 (x100), unless the r^2 is equal to 1. It is the case of the three leftmost markers

REFERENCES

1. Saraux, A, Guillemin, F, Guggenbuhl, P, Roux, C H, Fardellone, P, Le Bihan, E *et al.* Prevalence of spondyloarthropathies in France: 2001. *Annals of the rheumatic diseases* **64**, 1431–1435 (2005).
2. D’Agostino MA, Said-Nahal R, Hacquard-Bouder C, Brasseur JL, Dougados M, Breban M, . Assessment of peripheral enthesitis in the spondyloarthropathies by ultrasonography combined with power Doppler: a cross-sectional study. *Arthritis and rheumatism* **48**, 523–33 (2003).
3. Brown, MA, Laval, SH, Brophy, S, Calin, A, . Recurrence risk modelling of the genetic susceptibility to ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases* **59**, 883–6 (2000).
4. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD, . Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet* **28**, 904–7 (1973).
5. Moll JM, Haslock I, Macrae IF, Wright V, . Associations between ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, Reiter’s disease, the intestinal arthropathies, and Behcet’s syndrome. *Medicine (Baltimore)* **53**, 343–64 (1974).
6. Burton, PR, Clayton, DG, Cardon, LR, Craddock, N, Deloukas, P, Duncanson, A. *et al.* Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nature genetics* **39**, 1329–37 (2007).
7. Reveille, JD, Sims, A, Danoy, P, Evans, DM, Leo, P, Pointon, J. *et al.* Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nature genetics* **42**, 123–7 (2010).
8. Evans, DM, Spencer, CC, Pointon, JJ, Su, Z, Harvey, D, Kochan, G. *et al.* Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nature genetics* **43**, 761–7 (2011).
9. Lin, Z, Bei, JX, Shen, M, Liao, Z, Zhang, Y, Lv, Q *et al.* A genome-wide association study in Han Chinese identifies new susceptibility loci for ankylosing spondylitis. *Nature genetics* **44**, 73–77 (2012).
10. Cortes, A, Hadler, J, Pointon, JP, Robinson, PC, Karaderi, T, Leo, P. *et al.* Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nature genetics* **45**, 730–8 (2013).
11. Horton, R, Wilming, L, Rand, V, Lovering, RC, Bruford, E, Khodiyar, V. *et al.* Gene map of the extended human MHC. *Nature Reviews Genetics* **5**, 889–899 (2004).
12. Vandiedonck, C, Knight, JC, . The human Major Histocompatibility Complex as a paradigm in genomics research. *Briefings in functional genomics & proteomics* **8**, 379–94 (2009).
13. Boulard, O, Damotte, D, Deruytter, N, Fluteau, G, Carnaud, C, Garchon, HJ, . An Interval Tightly Linked to but Distinct From the H2 in Nonobese Diabetic Mice. *DIABETES* **51**, 2141–2147 (2002).
14. Lie, BA, Thorsby, E, . Several genes in the extended human MHC contribute to predisposition to autoimmune diseases. *Current opinion in immunology* **17**, 526–31 (2005).
15. Fernando, MM, Stevens, CR, Walsh, EC, De Jager, PL, Goyette, P., Plenge, R., Vyse, T. J. & Rioux, J. D. Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis. *PLoS genetics* **4**, e1000024 (2008).

16. Brown, MA, Kennedy, LG, Macgregor, AJ, Darke, C, Duncan, E, Shatford, J., Taylor, A., Calin, A. & Wordsworth, P. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment. *Arthritis Rheum.* **30**, 1823–1828 (1997).
17. Robinson WP, van der Linden SM, Khan MA, Rentsch HU, Cats A, Russell A, Thomson G. HLA-Bw60 increases susceptibility to ankylosing spondylitis in HLA-B27+ patients. *Arthritis Rheum.* **32**, 1135–41 (1989).
18. Zhou, X, Wang, J, Zou, H, Ward, MM, Weisman, MH, Espitia, M. *et al.* MICA, a gene contributing strong susceptibility to ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases* (2013).
19. Brown MA, Kennedy LG, Darke C, Gibson K, Pile KD, Shatford JL, A, Taylor, A, Calin, Wordsworth BP . The effect of HLA-DR genes on susceptibility to and severity of ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* **41**, 460–5 (1998).
20. Höhler T, Schäper T, Schneider PM, Meyer zum Büschenfelde KH, Märker-Hermann E. Association of different tumor necrosis factor alpha promoter allele frequencies with ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. *Arthritis Rheum.* **41**, 1489–92 (1998).
21. Fraile, A., Nieto, A., Matarán, L. & Martín, J. HSP70 gene polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Tissue antigens* **51**, 382–5 (1998).
22. Vargas-Alarcón, G, Gamboa, R, Zuniga, J, Fragoso, JM, Hernández-Pacheco, G, Londoño, J, et al. Association study of LMP gene polymorphisms in Mexican patients with spondyloarthritis. *Human immunology* **65**, 1437–42 (2004).
23. Reveille, J. D. Major histocompatibility genes and ankylosing spondylitis. *Best practice & research. Clinical rheumatology* **20**, 601–9 (2006).
24. Amor B, Dougados M, Mijiyawa M, . Criteria of the classification of spondylarthropathies. *Rev Rhum Mal Osteoartic* **57**, 85–89 (1990).
25. Dougados M, van der Linden S, Juhlin R, Huitfeldt B, Amor B, Calin A, et al. The European Spondylarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of spondylarthropathy. *Arthritis Rheum.* **34**, 1218–27 (1991).
26. Van der Linden SM, Valkenburg HA, de Jongh BM, Cats A, . The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. A comparison of relatives of spondylitis patients with the general population. *Arthritis Rheum.* **27**, 241–9 (1984).
27. Yoshida M, Kimura A, Numano F, Sasazuki T, . Polymerase-chain-reaction-based analysis of polymorphism in the HLA-B gene. *Hum Immunol.* **34**, 257–66 (1992).
28. Dudbridge F, . Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet Epidemiol.* **25**, 115–21 (2003).
29. Dudbridge F, . Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data.pdf. *Hum Hered* **66**, 87–98 (2008).
30. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ, . Haploview analysis and visualization of LD and haplotype maps.pdf. *Bioinformatics* **21**, 263–5 (2005).

31. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T, . Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA.pdf. *Science (New York, N.Y.)* **285**, 727–9 (1999).
32. Azuz-Lieberman, N, Markel, G, Mizrahi, S, Gazit, R, Hanna, J, Achdout, H. *et al.* The involvement of NK cells in ankylosing spondylitis. *International immunology* **17**, 837–45 (2005).
33. Al-Mossawi, M., Ridley, A., Kiedel, S. & Bowness, P. The role of natural killer cells, gamma delta T-cells and other innate immune cells in spondyloarthritis. *Current opinion in rheumatology* **25**, 434–9 (2013).
34. Amroun, H, Djoudi, H, Busson, M, Allat, R, El Sherbini, SM, Sloma, I. *et al.* Early-onset ankylosing spondylitis is associated with a functional MICA polymorphism. *Human immunology* **66**, 1057–61 (2005).
35. Schett G, Tohidast-Akrad M, Smolen JS, Schmid BJ, Steiner CW, Bitzan P, Zenz, P., Redlich, K., Xu, Q. & Steiner, G. Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-JUN N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **43**, 2501–12 (2000).
36. Böhm, C, Hayer, S, Kilian, A, Zaiss, MM, Finger, S, Hess, A. *et al.* The alpha-isoform of p38 MAPK specifically regulates arthritic bone loss. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **183**, 5938–47 (2009).
37. Sahlberg, A. S. *et al.* Evidence that the p38 MAP kinase pathway is dysregulated in HLA-B27-expressing human monocytic cells: correlation with HLA-B27 misfolding. *Arthritis Rheum.* **56**, 2652–62 (2007).
38. Saeed, A, Barreto, L, Neogii, SG, Loos, A, McFarlane, I, Aslam, A. Identification of novel genes in Hirschsprung disease pathway using whole genome expression study. *Journal of pediatric surgery* **47**, 303–7 (2012).

Article 2

Life-time Prevalence of Spondyloarthritis in Reference to HLA-B27 in a French Worker Population: Results of the GAZEL Cohort

Alice Talpin* & Felicie Costantino*, Roula Said-Nahal, Marcel Goldberg, Joseph Henny, Gilles Chiocchia, Henri-Jean Garchon, Marie Zins, Maxime Breban

Poster présenté lors du congrès annuel de « The European Society of Human Genetics » (ESHG) (Paris) en juin 2013.

Article en révision à « Annals of the Rheumatic Diseases ».

Prévalence de la spondylarthrite en référence au HLA-B27 dans une cohorte française en population générale, la cohorte GAZEL.

L'allèle HLA-B27 est le facteur génétique majeur de susceptibilité à la SpA. Sa prévalence a déjà été estimée dans un grand nombre de pays^{33 235}. En effet, tester biologiquement HLA-B27 fait partie de la batterie de tests qui aide à diagnostiquer la SpA. Il est donc crucial de déterminer sa prévalence aussi précisément que possible afin de connaître la performance diagnostic de ce test et de planifier au mieux le nombre d'individus susceptibles de développer une SpA dans la population générale. L'objectif de ce travail a donc été d'estimer la prévalence cumulée de spondylarthrite (SpA) et de l'allèle HLA-B27 dans une cohorte en population générale, la cohorte GAZEL.

La cohorte GAZEL a été créée en 1989 grâce à la participation de 20 625 employés volontaires d'EDF-GDF, âgés de 35 à 50 ans et considérés comme issus de la population générale. En 2010, un questionnaire validé pour le dépistage de la SpA a été envoyé aux 18 757 participants restés captifs. Les sujets ayant répondu à ce questionnaire et pour lesquels un échantillon d'ADN pouvait être obtenu à partir de la bibliothèque adossée à la cohorte ont constitué la population cible de cette étude (6 556 personnes). Le ratio hommes/femmes était de 3,6/1 et l'âge moyen (\pm SD) de $65,5 \pm 3,3$ ans. Parmi les sujets ayant répondu négativement à l'ensemble des questions, 2 551 individus dont nous pouvions obtenir l'ADN ont été retenus pour constituer un échantillon de témoins sains.

Dans un premier temps, il était nécessaire d'identifier les individus atteints de SpA. Pour cela, tous les individus ayant déclaré un tel diagnostic ont été soumis à une radiographie du bassin, ainsi qu'à une consultation téléphonique par un rhumatologue qualifié pour vérifier le diagnostic. Une confirmation du diagnostic a été retenue chez 32 patients sur les 72 cas déclarés, conduisant à établir une prévalence cumulative de SpA, ajustée pour le sexe, à 0,43% (IC95% : 0,26 – 0,70%) dans la population française.

En deuxième lieu, nous avons déterminé le statut HLA-B27 par PCR spécifique d'allèle dans l'ensemble des échantillons provenant de témoins sains ainsi que chez les 32 patients atteints de SpA. De plus, nous avons génotypé le polymorphisme rs4349859, décrit comme un substitut du HLA-B27. C'est un marqueur biallélique spécifique qui permet de détecter facilement l'homozygotie de HLA-B27 et de tester un grand nombre d'échantillons d'ADN en peu de temps. Nous avons ainsi établi la fréquence de l'allèle HLA-B27 à 6,9% (95%CI: 5,9 to 7,9%) chez les témoins sains et 75% chez les sujets atteints de SpA. Ainsi, nous avons pu mesurer le risque relatif de développer une SpA chez les individus porteurs du HLA-B27 qui était de 39 en comparaison avec les individus B27 négatifs (IC95% : 17 – 86).

Notre étude est la première à avoir estimé simultanément la prévalence de la SpA et celle de l'allèle HLA-B27 dans une cohorte française de grande taille.

Prevalence of Spondyloarthritis in Reference to HLA-B27 in the French Population:

Results of the GAZEL Cohort

Félicie Costantino^{1,2*}, Alice Talpin^{1,2*}, Roula Said-Nahal³, Marcel Goldberg^{4,5}, Joseph Henny^{4,5}, Gilles Chiocchia^{1,2,5}, Henri-Jean Garchon^{1,2,5,6}, Marie Zins^{4,5}, Maxime Breban^{1,2,3,5}

1 – Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS (UMR 8104), Paris, 75014, France;

2 – INSERM U1016 - Paris, 75014, France;

3 – Rheumatology Division, Ambroise Paré Hospital (AP-HP), Boulogne-Billancourt, 92100, France;

4 – Population-Based Epidemiological Cohorts, Research Platform, UMRS 1018, Centre for Research in Epidemiology and Population Health, Villejuif, France;

5 – UFR des Sciences de la Santé, Simone Veil, Versailles Saint Quentin en Yvelines University, Montigny-Le-Bretonneux, 78180, France;

6 – Genetics Division, Ambroise Paré Hospital (AP-HP) Boulogne-Billancourt, 92100, France;

** The two first authors contributed equally to that work.*

Address reprint requests and correspondence to:

Maxime Breban, M.D., Ph.D., Rheumatology Division

Hôpital Ambroise Paré, 9 ave Charles de Gaulle, 92100, Boulogne, France

Ph: 33-(0)149 095 672; Fax: 33-(0)149 095 865

E-mail: maxime.breban@apr.aphp.fr

Keywords: ankylosing spondylitis; spondyloarthritis; prevalence; HLA-B27; rs4349859.

Word Count: 2,604

ABSTRACT

Objective: To estimate the prevalence of SpA in reference to HLA-B27 in the French population.

Methods: In 1989, 20,625 employees of the French national gas and electricity company aged 35-50 years were enrolled in the GAZEL cohort. In 2010, 18,757 still active participants were screened by a questionnaire validated for the detection of SpA. Responders with available DNA were retained for further studies. Pelvic radiograph and HLA-B27 typing were performed in all the self-reported cases of SpA or psoriatic arthritis. Self-reported diagnosis was verified by qualified rheumatologist. HLA-B27 determination was also performed in subjects without any SpA feature.

Results: The target population consisted of 6,556 responders with available DNA. Their male:female ratio was 3.6 and their mean age was 65.5 ± 3.3 years. A diagnosis of SpA was confirmed in 32 of the 72 self-reported cases, 75% of them being HLA-B27 positive. Estimated SpA prevalence adjusted for sex was 0.43% (95%CI: 0.26 to 0.70%). HLA-B27 positivity rate in 2,466 healthy controls was 6.9% (95%CI: 5.9 to 7.9%). The relative risk of SpA in HLA-B27+ individuals was 39 (95%CI: 17 to 86).

Conclusion: We estimated the prevalence of SpA in the French population in 2010 to 0.43%. With an estimated prevalence of 75.0% in SpA and 6.9% in healthy controls, HLA-B27 increased the disease-risk by 39 fold, as compared to HLA-B27 negative subjects.

INTRODUCTION

Spondyloarthritis (SpA) is a frequent chronic inflammatory disorder. Depending on its clinico-radiological presentation, it has classically been subdivided into the following subsets: ankylosing spondylitis (AS), psoriatic arthritis (PsA), arthritis associated with IBD (AIBD), reactive arthritis (ReA) and undifferentiated SpA (uSpA) [1]. More recently, the Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) developed new classification criteria based on the anatomic distribution of rheumatic manifestations, subdividing the disease entity into axial and peripheral SpA [2,3].

Until now, most epidemiological studies in the field of SpA have been focused on AS. Recently, several studies have embraced all the SpA subtypes together [4] but only one of them has taken into account the ASAS classification criteria [5]. One of the goals of these criteria was to allow the conduct of clinical trials for the treatment of non-radiographic SpA. Several studies using them have already been published and showed response rates to TNF blockers similar to those initially reported in AS [6,7]. Thus, it seems important to obtain prevalence data according to ASAS classification criteria with regard to public health.

HLA-B27 is a major genetic factor of susceptibility for SpA. Its population prevalence has been previously estimated in many countries, leading to infer the proportion of HLA-B27+ individuals expected to develop SpA [8,9], but to our best knowledge, such proportion has not been directly established in previous studies. HLA-B27 is one of few biologic tests that may help with SpA diagnosis and is a key component of internationally validated classification criteria for SpA [2,3]. Thus, it is important to determine its prevalence as precisely as possible to appreciate the diagnostic performance of the test [10].

The aim of the present work was to estimate the population prevalence of SpA in reference to HLA-B27 in a cohort of French workers, the GAZEL cohort.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

The GAZEL cohort is an ongoing general population-based cohort established among the employees of the French national electricity and gas company (EDF-GDF) [11]. This firm employs approximately 150,000 people of diversified socio-economic statuses throughout France. The epidemiologic profile of this population is very close to that of the French general population [12]. Noteworthy, the staff of this company is very stable because they benefit of protective social advantages. In particular, employees of the company usually start their career in the twenties and remain hired by the company, even if they become invalid or unable to work because of chronic illness. These conditions minimized the risk of left-censoring effect in the cohort (i.e. the risk of missing cases because their chronic illness would keep them away from workforce). In January 1989, 44,922 persons (31,411 male employees aged 40-50 years and 13,511 female employees aged 35-50 years) were invited to enroll in the cohort, of whom 20,625 accepted (15,011 men and 5,614 women). Each year, data on health, lifestyle, socio-economic and occupational factors were collected via a mail questionnaire. Blood samples or buccal cells were stored for approximately one third of the participants. In 2010, the 18,757 remaining participants were invited to answer to a medical questionnaire previously validated for the detection of SpA [13]. All the responders with stored biological sample available for DNA extraction were kept for further analysis. This subset of subjects with stored biological sample was representative of the whole cohort with regard to most determinants [14]. The study flow chart is shown in **Figure 1**.

The GAZEL protocol was approved by the French authority for data confidentiality (“Commission Nationale Informatique et Liberté”) and by the Ethics Evaluation Committee of the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)” (IRB0000388, FWA00005831). Informed consent for this specific study was obtained from each participant

and was approved by the local ethics committees of Ambroise Paré Hospital (Boulogne-Billancourt, France).

Screening and validation of SpA diagnosis

The screening questionnaire researched previous diagnosis of SpA or PsA as well as suggestive features of SpA as previously described [13]. Performance of self-reported diagnosis of SpA, as previously reported in the French population for an estimated prevalence of the disease of 0.5% was close to 100% for negative predictive value and low for positive predictive value (9%) [15].

This is why patients with self-reported diagnosis of SpA or PsA were interviewed by phone by a qualified rheumatologist (RSN) to verify clinical grounds of the diagnosis. For all the self-reported cases of SpA or PsA, antero-posterior radiograph of the pelvis and HLA-B27 typing were performed. Using available information, a diagnosis of SpA was confirmed or dismissed by RSN, in reference to ASAS classification criteria for axial and peripheral SpA. Peripheral PsA cases who did not fulfill ASAS classification criteria for peripheral SpA (i.e. patients suffering of peripheral joint arthritis of symmetric distribution and predominating in the upper limbs, in a context of psoriasis but without other feature of SpA) were classified separately.

All the subjects with available biological samples who had answered negatively to all the questionnaire's items were considered as definite healthy controls from the perspective of SpA. Subjects who did not report SpA or PsA but who had answered positively to at least one questionnaire's item were not investigated further.

Determination of HLA-B27 status

HLA-B27 status was determined in the suspected SpA cases and in the definite healthy controls. Two methods were used for this determination: allele-specific PCR and

genotyping of the single-nucleotide polymorphism (SNP) rs4349859, known to strongly tag HLA-B27 allele [16].

DNA extraction

DNA was extracted from stored buccal cells (n=927) or blood samples (n=1,694). Buccal cells had been collected with a sterile cytobrush (Histobrush, Hardwood Products Company, USA) by twirling it on the inner cheek. Blood sample had been obtained by venipuncture and buffy coat was then isolated and stored. DNA was extracted with QIAamp DNA Blood Midi and Mini kit (QIAGEN, Valencia, CA) from buffy coats and cytobrushes respectively.

HLA-B27 status determination

Exons 2 and 3 of the HLA-B locus were amplified with HLA-B27 specific primers (Forward: GGTCTCACACCCTCCAGAAT, Reverse: GCGTCTCCTTCCCGTTCTCA) together with GAPDH primers (Forward: ACCACAGTCCATGCCATCA, Reverse: CCACCACCCTGTTGCTGT) as internal control. Detection of the amplified products was carried out by mean of 2% agarose gel electrophoresis.

Genotyping of rs4349859 was performed using Taqman genotyping assay (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) according to manufacturer's recommendations.

Statistical methods

Continuous variables were expressed as mean \pm standard deviation. Crude and sex-adjusted prevalence were estimated. Adjusted prevalence was calculated based on the sex distribution in the source population as determined by the last national census (2010) [17]. The 95% confidence intervals (95%CI) were constructed using the logit transformation [18]. To evaluate SpA prevalence according to HLA-B27 status, we estimated the number of HLA-B27 positive subjects based on HLA-B27 typing in healthy controls and individuals having

reported SpA. Categorical variables were compared using the chi-square test and continuous variables using the Student's T test. The level of type I error used to determine statistical significance was 5%. Statistical analyses were performed with R for Windows, version 2.15.1.

RESULTS

Characteristics of the population

As shown in **Figure 1**, 18,757 subjects (91% of the initial cohort) were screened for participation by a dedicated questionnaire. The overall response rate was 74.5%. Among the responders, 6,556 had stored buccal cells or buffy coat sample available for DNA extraction, representing 34.9% of the screened cohort. They constituted the target population for the rest of the study. Participants included in this study were not different from the whole GAZEL cohort, except for being more often retired and having a higher socio-economical level.

SpA prevalence

Seventy-two subjects declared to have AS, SpA or PsA. As shown in **Figure 2**, a diagnosis of SpA was confirmed in 32 of them, a diagnosis of peripheral PsA in 7 of them, and another diagnosis in 28 of them. In 2 cases, diagnosis remained doubtful. Clinical characteristics of the confirmed cases are summarized in **Table 1** and presented in details in Supplementary table 1. All the confirmed cases fulfilled ASAS classification criteria for SpA and 75.0% of them were HLA-B27 positive (80% of the AS cases and 67% of the other SpA cases).

The overall sex-adjusted estimated prevalence of SpA was 0.43% (95%CI: 0.26 to 0.70%). **Table 2** shows the prevalence of SpA, according to age, sex and HLA-B27 status. There was no significant difference in prevalence according to age or sex.

HLA-B27 prevalence in healthy controls

Individuals having answered negatively to all items of the arthritis questionnaire (n = 2,551, i.e. 38.9% of the target population) were considered as definite healthy controls and used for HLA-B27 status determination, by allele-specific PCR.

Overall, 6.9% (95%CI: 5.9 to 7.9%) of the tested samples were HLA-B27 positive. There was no significant difference between males and females. However, a trend towards a lower rate of HLA-B27 was observed in subjects older than 70 years (5.1%; 95%CI: 3.4 to 7.4%), as compared to younger subjects (7.3%; 95%CI: 6.2 to 8.6%), that was close to significance ($p=0.06$) (**Table 3**). The relative risk of developing SpA in HLA-B27 positive individuals, as compared to HLA-B27 negative ones was 39 (95%CI: 17 to 86).

The minor allele frequency of rs4349859 (corresponding to allele A which tags HLA-B27) was 6.8% (95%CI: 5.9 to 7.9%). In comparison to HLA-B27 PCR results, rs4349859 showed high specificity (99.7%) and sensitivity (97.0%) for HLA-B27 detection.

DISCUSSION

Accurate public health planning requires reliable epidemiologic data to be effective. Although several recent studies have estimated the prevalence of SpA [4], as far as we know, the present study is the first to estimate both SpA and HLA-B27 prevalence in a single large-scale cohort. Moreover, to our knowledge, it is the first to report the prevalence of SpA in the general population, according to ASAS classification criteria, since *Strand et al.* studied SpA prevalence in US rheumatology practices [5]. By screening subjects from the French GAZEL cohort of more than 56 years old, we estimated SpA prevalence around 0.43% and that of HLA-B27 carriers around 6.9% in healthy controls and 75.0% in SpA patients.

Such SpA prevalence appears higher than the 0.3% value reported by *Saraux et al.* from a survey conducted in the French adult population, in 2001 [19], albeit the 95%CI of estimate overlaps between both studies. Such discrepancy can be explained by the fact that the age of subjects investigated here was ≥ 57 years. Given that a diagnosis of SpA is most of the time made before the age of 50 years [20], one can assume that the present study yielded a close approximate of the cumulative risk of developing SpA in the French population. Consistent with other recently published studies, we observed no significant variation in prevalence according to sex [19,21]. AS was by far the most common subtype of SpA in our study (69%), which may appear different from other studies, in which PsA and/or uSpA were found more frequent than AS [9,19,22]. Two major factors could explain such apparent discordance. First, pelvic radiograph was obtained in SpA cases in a systematic fashion only in our study. Secondly, subjects in the present study were older than in previous ones at the time of ascertainment and some of those presenting at first with uSpA or PsA could have progressed to AS over time [23,24].

To estimate SpA prevalence, it is important to target a general population sample and not only patients referred to rheumatologist. This is why we used the GAZEL cohort, which is

composed of subjects from of all French regions and of various socio-economic statuses. Several studies have shown that the epidemiologic profile of the cohort is close to that of the French general population in terms of distribution of disorders and of causes of death [25,26]. Nevertheless some bias could be seen as a limitation to generalization of those results to the entire French population. First, there was a high proportion of men in the cohort. Second, all the subjects were more than 55 years old. Third, GAZEL participants were volunteers, thus subject to a selection effect potentially associated with their health status [27]. Fourth, French nationality is required to be employed in EDF-GDF, thus ethnic variability in the cohort was lower than in the general population.

However, such potential biases should be very limited: the prevalence rate of SpA was similar between men and women and we calculated sex-adjusted prevalence. Although elderly onset of SpA is possible [28], we can consider that very few cases should occur later given the age of the population studied and that we have estimated here the cumulative prevalence of SpA. Thus we did not adjust prevalence for age. It is unlikely that having a SpA could introduce a selection bias in EDF-GDF recruitment. Indeed, mean age at recruitment in the company was around 20 years and once recruited, all the individuals remained in the company and were proposed to enter the cohort, even in case of work disability or long-term illness. Moreover, in previous studies having assessed confounding factors in the GAZEL cohort, rheumatic condition was not associated with initial participation nor with attrition during follow-up [12,29]. All these data support that the GAZEL cohort can be considered as representative of the French Caucasian population.

As another possible source of bias, our screening was based on self-reported diagnosis so that we might have missed some undiagnosed cases, in particular in those individuals who had declared some SpA features. Again, such bias should be minor, as previously reported negative predictive value of self-reported SpA being close to 100% [15]. Self-reported

diagnoses were validated by phone interview by a qualified rheumatologist. Previous reports suggested that telephone survey may represent a reliable alternative to face to face interview [15,19] with no major differences in the responses obtained with the two methods [30].

In the present study, the estimated HLA-B27 prevalence in the French population was 6.9% in controls, a result close to that of a recent study reporting a HLA-B27 prevalence of 7.5% in non-Hispanic white subjects, in US [31]. We inferred a 39-fold relative risk of developing SpA in HLA-B27 positive, as compared to B27 negative individuals. *Braun et al.* reported a lower relative risk in HLA-B27 individuals from the Berlin population (20.7) but the SpA prevalence used to estimate it (1.9%) was probably overrated in their initial study [32].

Interestingly, a trend towards lower rate of HLA-B27 positivity was found in subjects older than 70 years. In our study, the lowest rate of B27 was observed in persons born during the Second World War. Since many epidemics have occurred during this period in France, it may suggest a higher susceptibility of HLA-B27 positive individuals to tuberculosis or other unidentified infectious disease [33]. This observation is reminiscent of that recently reported in the US population by *Reveille et al* [31] in subjects aged 50-69 years. The shift observed in age range may reflect differences in pathogens exposure between France and USA.

We assessed the presence of HLA-B27 by direct PCR genotyping and also by genotyping rs4349859, a surrogate marker for B27 [16]. Our study showed good agreement between both methods. Thus, we confirmed that genotyping rs4349859 is a highly specific method to detect HLA-B27 that can be used to screen large population samples, in particular for epidemiological studies.

In conclusion, cumulative SpA prevalence in the French population in 2010 was slightly higher than that previously reported in France in 2001, with a high proportion of AS. Although less than 5% of HLA-B27 carriers have developed SpA, disease relative risk

conferred by this antigen was high with a 39-fold increase. The trend towards decreased HLA-B27 rate in older subjects could also suggest other role for this molecule with a possible higher childhood-related mortality in HLA-B27 carriers due to exposure to infectious peril having vanished since the 50s in France.

ACKNOWLEDGMENTS AND AFFILIATIONS

We thank Dr. Joëlle Benessiano and the Hospital Bichat-Claude Bernard Biological Resource Center (CRB-BCB, Paris, France) for DNA extraction and storage of GAZEL samples.

This work was supported by grant from Agence Nationale de la Recherche (grant ANR 2010 GEMISA). F elicie Costantino was supported by a grant from Soci et e Française de Rhumatologie (SFR). Alice Talpin was supported by a grant from Arthritis Fondation Courtin. The GAZEL Cohort Study was funded by EDF-GDF and INSERM, and received grants from the ‘Cohortes Santé TGIR Program’, Agence nationale de la recherché (ANR) and Agence française de sécurité sanitaire de l’environnement et du travail (AFSSET).

TABLES AND FIGURES

Table 1. Clinical characteristics of confirmed SpA cases

Characteristic	SpA (n=32)
Age in years, mean \pm SD	67.0 \pm 3.5
Disease duration in years, mean \pm SD	31.0 \pm 11.1
Sex distribution: cases/total under study	
- Men	27/5,140
- Women	5/1,416
HLA-B27 positivity, %	75.0
Axial manifestations	
- Inflammatory back pain, %	75.0
- Radiographic sacroiliitis [*] , %	66.7
Peripheral manifestations	
- Peripheral arthritis, %	50.0
- Peripheral enthesitis, %	59.4
Extra-articular manifestations	
- Uveitis, %	15.6
- Psoriasis, %	40.6
- Inflammatory bowel disease, %	12.5
ASAS classification criteria fulfillment	
- ASAS axial SpA, %	75.0
- ASAS peripheral SpA, %	25.0
SpA subtype**	
- AS, %	66.7
- uSpA, %	13.3
- PsA, %	16.7
- AIBD, %	3.3

The registered manifestations correspond to those present at the time of investigation, or retrieved from past-medical history.

Inflammatory bowel disease: Crohn's disease or ulcerative colitis; ASAS, Assessment of SpondyloArthritis international Society; AS, ankylosing spondylitis; uSpA, undifferentiated spondyloarthritis; PsA, psoriatic arthritis; AIBD, Inflammatory bowel disease-associated arthritis;

* Refers to radiographic sacroiliitis \geq grade II bilateral or grade III unilateral in 30 confirmed SpA cases with available pelvic X-ray.

** Subtype was determined in 30 confirmed SpA cases with available pelvic X-ray

Table 2. Prevalence of SpA in the GAZEL cohort in 2010.

Target population	Sample, n	SpA cases, n	Prevalence, % (95%CI)
All population			
- Crude	6,556	32	0.48 (0.34 - 0.69)
- Sex-adjusted			0.43 (0.26 - 0.70)
Age group			
- 57 - 64 years	2,797	9	0.32 (0.17 - 0.62)
- ≥ 65 years	3,759	23	0.61 (0.41 - 0.92)
Sex			
- Male	5,140	27	0.53 (0.36 - 0.77)
- Female	1,416	5	0.35 (0.11 - 0.85)
HLA-B27			
- Negative	6,084*	8	0.13 (0.07 - 0.26)
- Positive	472*	24	5.08 (3.43 - 7.47)
SpA subtype			
- AS	6,556	20	0.31 (0.20 - 0.47)
- PsA	6,556	5	0.08 (0.03 - 0.18)
- uSpA	6,556	4	0.06 (0.02 - 0.16)
- AIBD	6,556	1	0.02 (0.002-0.11)

* Estimation based on HLA-B27 typing in a sample of healthy controls (n = 2,466) and in individuals having reported SpA (n = 72)

Table 3. Prevalence of HLA-B27 in healthy controls of the GAZEL cohort in 2010.

Group	Sample, n	HLA-B27+ subjects, n	Prevalence, % (95% CI)
All	2,466	169	6.9 (5.9 - 7.9)
Age group			
- 57 – 64 years	731	55	7.5 (5.8 - 9.7)
- 65 – 69 years	1,202	87	7.2 (5.9 - 8.9)
- \geq 70 years	533	27	5.1 (3.5 - 7.3)
Sex			
- Male	2,040	134	6.6 (5.6 - 7.7)
- Female	426	35	8.2 (5.9 - 11.2)

Figure 1. Study flow chart

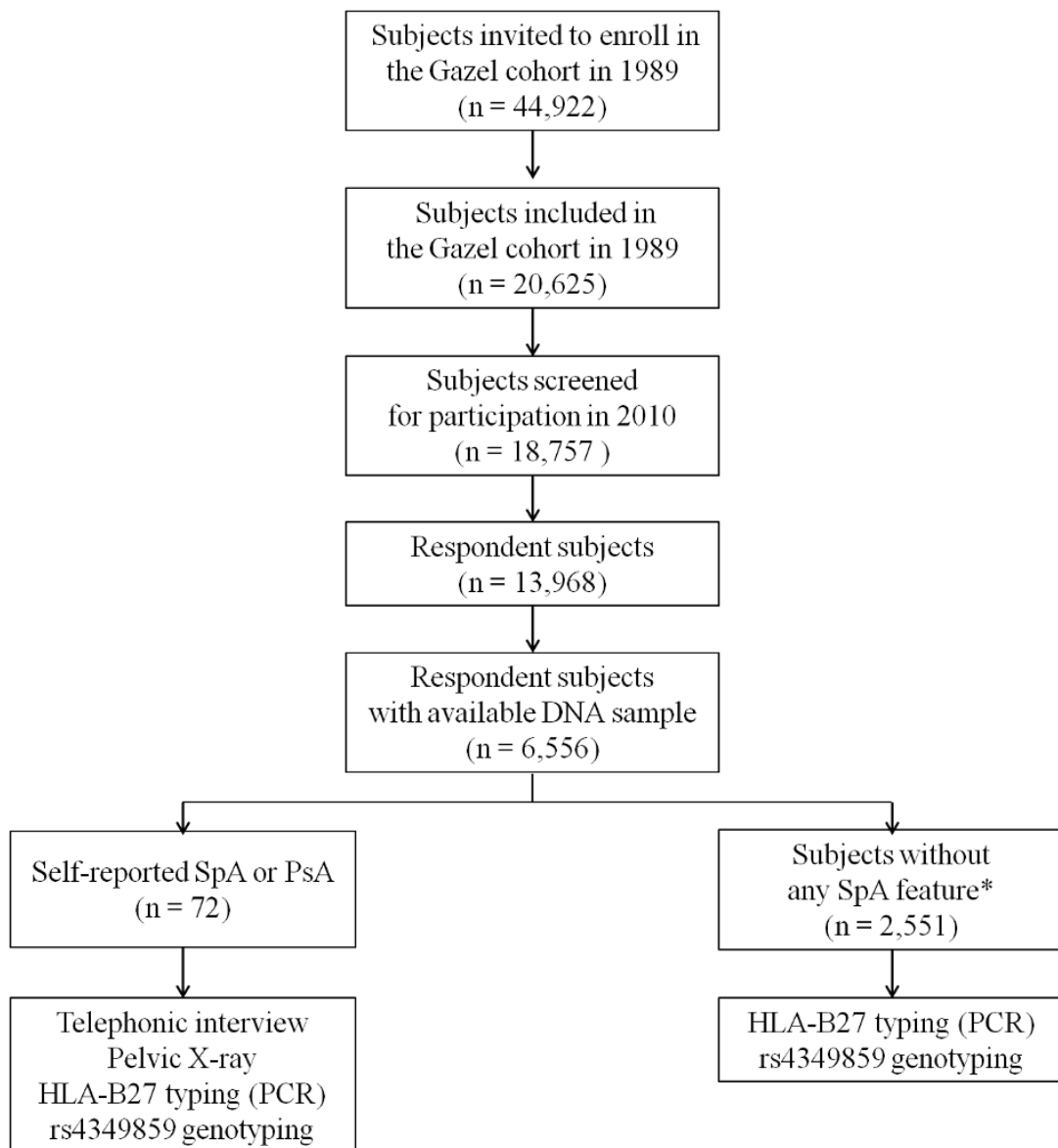
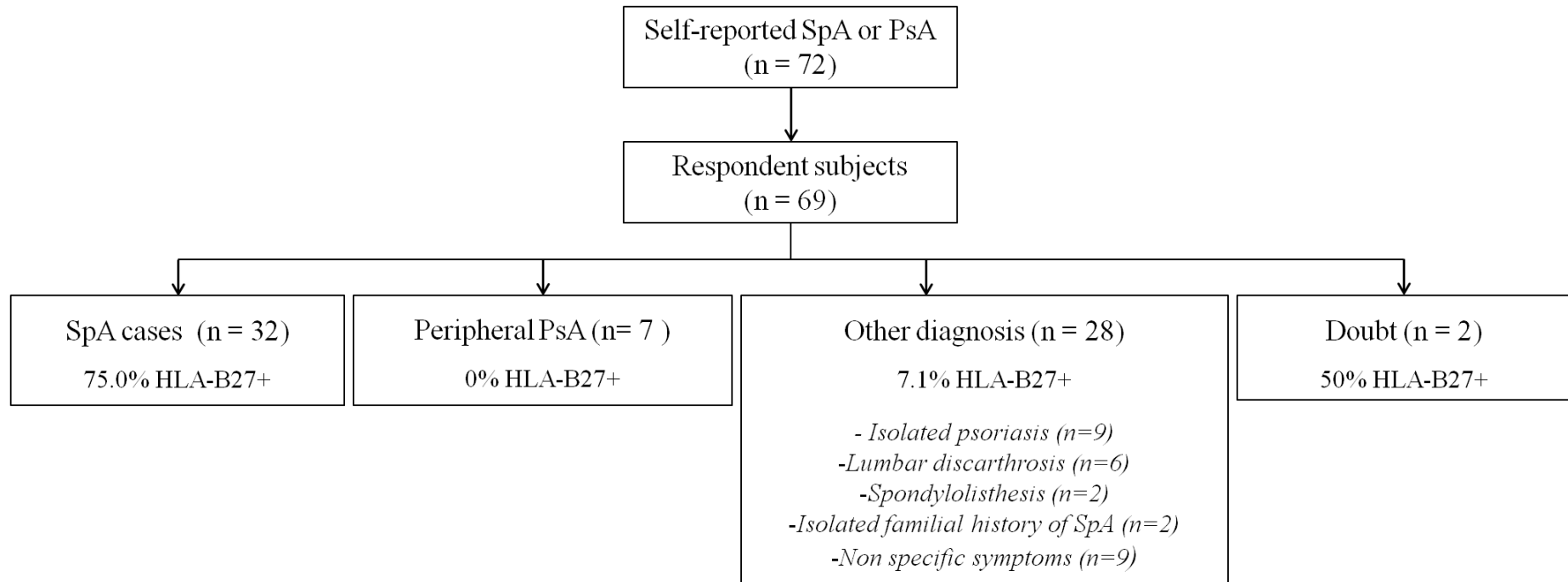


Figure 2. Diagnosis flow chart



Supplementary table 1. Detailed clinical characteristics of confirmed SpA and peripheral PsA cases

Patient	Sex	Age	Age at onset	IBP	Enthesitis	Arthritis	Uveitis	Psoriasis	IBD	Radiographic sacro-iliitis	HLA-B27	SpA subtype
<i>Axial SpA</i>												
1	Male	73	16	Yes	Yes	No	No	No	No	Grade IV	Positive	AS
2	Male	73	18	Yes	No	Yes	Yes	No	No	Grade IV	Positive	AS
3	Male	64	22	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Grade IV	Positive	AS
4	Male	64	29	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	Grade IV	Positive	AS
5	Female	70	32	Yes	No	No	Yes	No	No	Grade IV	Positive	AS
6	Male	64	25	Yes	Yes	No	No	No	No	Grade IV	Positive	AS
7	Male	70	32	Yes	No	No	No	No	No	Grade IV	Positive	AS
8	Male	67	30	Yes	Yes	No	No	No	No	Grade IV	Positive	AS
9	Male	69	25	Yes	Yes	No	No	No	No	Grade IIb	Positive	AS
10	Male	66	28	Yes	No	No	No	No	No	Grade IIb	Positive	AS
11	Male	70	25	Yes	No	No	No	No	No	Grade IV	Negative	AS
12	Male	72	30	Yes	Yes	No	No	Yes	No	Grade III	Positive	AS
13	Male	68	15	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Grade IV	Positive	AS
14	Male	65	25	Yes	Yes	No	No	Yes	No	Grade IV	Positive	AS
15	Male	70	43	Yes	No	Yes	No	Yes	Yes	Grade III	Positive	AS
16	Male	68	25	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Grade IV	Negative	AS
17	Male	65	52	Yes	No	No	No	No	Yes	Grade IIb	Negative	AS
18	Male	65	20	Yes	No	No	No	No	No	No sacro-iliitis	Positive	uSpA
19	Male	68	26	Yes	Yes	No	No	No	No	No sacro-iliitis	Positive	uSpA
20	Male	73	30	Yes	Yes	No	No	No	No	No sacro-iliitis	Positive	uSpA
21	Female	59	30	Yes	Yes	No	No	No	No	No sacro-iliitis	Positive	uSpA
22	Male	66	50	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	NR	Positive	ND
23	Male	64	40	Yes	No	Yes	No	Yes	No	No sacro-iliitis	Negative	PsA
24	Female	60	35	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No sacro-iliitis	Negative	AIBD
<i>Peripheral SpA</i>												
25	Male	67	40	No	No	Yes	No	Yes	No	Grade III	Positive	AS

26	Male	64	50	No	No	Yes	No	Yes	No	Grade IIb	Negative	AS
27	Female	70	61	No	Yes	Yes	No	No	No	Grade III	Positive	AS
28	Male	65	36	No	Yes	Yes	No	Yes	No	No sacro-iliitis	Positive	PsA
29	Male	64	30	No	No	Yes	No	Yes	No	No sacro-iliitis	Negative	PsA
30	Male	64	36	No	Yes	Yes	No	Yes	No	No sacro-iliitis	Negative	PsA
31	Female	70	20	No	Yes	Yes	No	No	No	NR	Positive	ND
32	Male	67	17	No	Yes	Yes	No	Yes	No	No sacro-iliitis	Positive	PsA
<i>Peripheral PsA</i>												
1	Male	64	50	No	No	Symmetric	No	Yes	No	No sacro-iliitis	Negative	Peripheral PsA
2	Male	69	55	No	No	Symmetric	No	Yes	No	NR	Negative	Peripheral PsA
3	Male	64	60	No	No	Symmetric	No	Yes	No	NR	Negative	Peripheral PsA
4	Male	68	32	No	No	Symmetric	No	Yes	No	No sacro-iliitis	Negative	Peripheral PsA
5	Male	72	45	No	No	Symmetric	No	Yes	No	NR	Negative	Peripheral PsA
6	Male	68	47	No	No	Symmetric	No	Yes	No	No sacro-iliitis	Negative	Peripheral PsA
7	Male	65	55	No	Yes	Symmetric	No	Yes	No	No sacro-iliitis	Negative	Peripheral PsA

The registered manifestations correspond to those present at the time of investigation, or retrieved from past-medical history.

IBP: inflammatory back pain; IBD: Inflammatory bowel disease; AS, ankylosing spondylitis; uSpA, undifferentiated spondyloarthritis; PsA, psoriatic arthritis; AIBD, Inflammatory bowel disease-associated arthritis; NR: not realized; ND: not determined

REFERENCES

- 1 Baeten D, Breban M, Lories R, *et al.* Are spondylarthritides related but distinct conditions or a single disease with a heterogeneous phenotype? *Arthritis Rheum* 2013;**65**:12–20.
- 2 Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewe R, *et al.* The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann Rheum Dis* 2009;**68**:777–83.
- 3 Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewe R, *et al.* The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann Rheum Dis* 2011;**70**:25–31.
- 4 Stolwijk C, Boonen A, van Tubergen A, *et al.* Epidemiology of spondyloarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2012;**38**:441–76.
- 5 Strand V, Rao SA, Shillington AC, *et al.* Prevalence of axial SpA in US rheumatology practices: Assessment of ASAS criteria vs. rheumatology expert clinical diagnosis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* Published Online First: 22 February 2013.
- 6 Sieper J, van der Heijde D, Dougados M, *et al.* Efficacy and safety of adalimumab in patients with non-radiographic axial spondyloarthritis: results of a randomised placebocontrolled trial (ABILITY-1). *Ann Rheum Dis* 2013;**72**:815–22.
- 7 Song I-H, Weis A, Hermann K-GA, *et al.* Similar response rates in patients with ankylosing spondylitis and non-radiographic axial spondyloarthritis after 1 year of treatment with etanercept: results from the ESTHER trial. *Ann Rheum Dis* 2013;**72**:823–5.
- 8 Van der Linden S, Valkenburg H, Cats A. The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals: a family and population study. *Br J Rheumatol* 1983;**22**:18–9.
- 9 Braun J, Bollow M, Remlinger G, *et al.* Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. *Arthritis Rheum* 1998;**41**:58–67.
- 10 Van den Bosch F, Elewaut D. Spondyloarthritis: A conundrum: classifying patients with SpA in daily practice. *Nat Rev Rheumatol* 2012;**8**:699–700.
- 11 Goldberg M, Leclerc A, Bonenfant S, *et al.* Cohort profile: the GAZEL Cohort Study. *Int J Epidemiol* 2007;**36**:32–9.
- 12 Goldberg M, Chastang JF, Leclerc A, *et al.* Socioeconomic, demographic, occupational, and health factors associated with participation in a long-term epidemiologic survey: a prospective study of the French GAZEL cohort and its target population. *Am J Epidemiol* 2001;**154**:373–84.
- 13 Said-Nahal R, Miceli-Richard C, D’Agostino MA, *et al.* Phenotypic diversity is not determined by independent genetic factors in familial spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 2001;**45**:478–84.
- 14 Zins M, Ozguler A, Bonenfant S, *et al.* [Constitution of a bank of biological material in the French Gazel cohort: logistical and practical aspects]. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2003;**51**:143–6.
- 15 Guillemin F, Saraux A, Fardellone P, *et al.* Detection of cases of inflammatory rheumatic disorders: performance of a telephone questionnaire designed for use by patient interviewers. *Ann Rheum Dis* 2003;**62**:957–63.

- 16 Evans DM, Spencer CCA, Pointon JJ, *et al.* Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nat Genet* 2011;**43**:761–7.
- 17 INSEE. <http://www.insee.fr/fr/> (accessed 8 Aug2013).
- 18 Newcombe R. Logit Confidence Intervals and the Inverse Sinh Transformation. *The American Statistician* 2001;**55**:200–2.
- 19 Saraux A, Guillemin F, Guggenbuhl P, *et al.* Prevalence of spondyloarthropathies in France: 2001. *Ann Rheum Dis* 2005;**64**:1431–5.
- 20 Feldtkeller E, Khan MA, van der Heijde D, *et al.* Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int* 2003;**23**:61–6.
- 21 Reveille JD, Witter JP, Weisman MH. Prevalence of axial spondylarthritis in the United States: estimates from a cross-sectional survey. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012;**64**:905–10.
- 22 Haglund E, Bremander AB, Petersson IF, *et al.* Prevalence of spondyloarthritis and its subtypes in southern Sweden. *Ann Rheum Dis* 2011;**70**:943–8.
- 23 Mau W, Zeidler H, Mau R, *et al.* Clinical features and prognosis of patients with possible ankylosing spondylitis. Results of a 10-year followup. *J Rheumatol* 1988;**15**:1109–14.
- 24 Hanly JG, Russell ML, Gladman DD. Psoriatic spondyloarthropathy: a long term prospective study. *Ann Rheum Dis* 1988;**47**:386–93.
- 25 Chevalier A, Leclerc A, Blanc C, *et al.* Disparites sociales et professionnelles de la mortalite des travailleurs d'Electricite de France-Gaz de France. *Population* 1987;**6**:863–79.
- 26 Chevalier A, Goldberg M, Godard C, *et al.* [Cancer incidence among active male workers at Electricite de France-Gaz de France]. *Rev Epidemiol Sante Publique* 1996;**44**:25–36.
- 27 Greenland S. Response and follow-up bias in cohort studies. *Am J Epidemiol* 1977;**106**:184–7.
- 28 Olivieri I, D'Angelo S, Palazzi C, *et al.* Late-onset spondyloarthritis: subset that should not be forgotten. *J Rheumatol* 2012;**39**:1110–2.
- 29 Goldberg M, Chastang JF, Zins M, *et al.* Health problems were the strongest predictors of attrition during follow-up of the GAZEL cohort. *J Clin Epidemiol* 2006;**59**:1213–21.
- 30 Siemiatycki J. A comparison of mail, telephone, and home interview strategies for household health surveys. *Am J Public Health* 1979;**69**:238–45.
- 31 Reveille JD, Hirsch R, Dillon CF, *et al.* The prevalence of HLA-B27 in the US: data from the US National Health and Nutrition Examination Survey, 2009. *Arthritis Rheum* 2012;**64**:1407–11.
- 32 Akkoc N, Khan MA. Overestimation of the prevalence of ankylosing spondylitis in the Berlin study: comment on the article by Braun *et al.* *Arthritis Rheum* 2005;**52**:4048–4049; author reply 4049–4050.
- 33 Zervas J, Constantopoulos C, Toubis M, *et al.* HLA-A and B antigens and pulmonary tuberculosis in Greeks. *Br J Dis Chest* 1987;**81**:147–9.

Article 3

Monocyte-Derived Dendritic Cells from HLA-B27⁺ Axial Spondyloarthritis Patients Display Altered Functional Capacity and Deregulated Gene Expression

Talpin Alice, Costantino Felicie, Bonilla Nelly, Leboime Ariane, Letourneur Franck, Jacques Sébastien, Dumont Florent, Amraoui Sonia, Dutertre Charles-Antoine, Garchon Henri-Jean, Breban Maxime, Chiocchia Gilles.

Poster présenté lors du 24ème congrès de la société française de rhumatologie (SFR), en décembre 2011.

Présentation orale lors du meeting annuel de l'ACR/ARHP (Chicago, USA), en novembre 2011.

Présentation orale lors du congrès annuel de la Fondation Arthritis-Courtin, en novembre 2012 et novembre 2013.

Présentation orale lors du « Congress on Spondyloarthropathies » (Gand, Belgique), en décembre 2012.

Article soumis à « Annals of the Rheumatic Diseases ».

Capacités fonctionnelles altérées et dérégulation transcriptomique des cellules dendritiques dérivées de monocytes de patients HLA-B27⁺ atteints de spondylarthrite

Le rôle essentiel de la cellule dendritique (DC) dans la pathogénèse de la SpA a été mis en exergue par plusieurs études. Ces cellules ont été tout particulièrement étudiées chez le rat transgénique HLA-B27, modèle animal de la maladie⁵⁵. Dans ce modèle, des expériences de transfert cellulaire ont conduit à penser que l'expression du HLA-B27 dans les cellules présentatrices d'antigène pouvait être au cœur de la pathologie. De fait, des anomalies fonctionnelles de ces cellules y ont été observées. Les DCs des rats transgéniques HLA-B27 ont une capacité altérée à stimuler la prolifération de lymphocyte T (LT) allogéniques ou syngéniques⁵¹. En outre, la proportion des conjugués formés entre les DCs HLA-B27 et les LT

CD4⁺ est réduite. Enfin, les molécules HLA-B27 exprimées par les DCs semblent endommager la formation de la synapse immune avec les LT CD4⁺ en interférant dans l'engagement des molécules de co-stimulation⁵². Partant de ces résultats, nous nous sommes intéressés au rôle que les DCs pourraient également jouer dans la pathologie humaine.

Les DCs isolées du sang périphérique ne représentent qu'une fraction très minoritaire (0,5%) des leucocytes circulants, et sont soumises à l'influence directe d'un environnement systémique inflammatoire et/ou des traitements médicamenteux. Ainsi, pour pouvoir étudier les DCs de patients de façon plus aisée, tout en nous affranchissant au maximum de facteurs confondants systémiques, nous avons choisi une approche *ex vivo*, en partant des monocytes circulants triés sur l'expression du CD14 et cultivés durant six jours en présence de GM-CSF et d'IL-4, afin de les faire différencier en DCs. Ces DCs dérivées de monocytes (MD-DCs) ont ensuite été laissées au repos ou activées par du LPS pour obtenir des MD-DCs matures.

Le but de ce travail était donc d'étudier les capacités fonctionnelles et le profil d'expression des gènes de MD-DCs provenant de patients atteints de SpA en comparaison avec celles de témoins sains.

Nous avons tout d'abord comparé entre elles les capacités des MD-DCs de patients et de témoins, à stimuler une réponse proliférative de LT CD4⁺ hétérologues. Pour cela, des LT CD4⁺ isolés de témoins sains ont été mis en culture durant 6 jours en présence des MD-DCs, stimulées ou non par le LPS. La prolifération des LT CD4⁺ a été estimée par la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée ajoutée au terme de la culture. La comparaison des données de 18 patients et de 24 témoins nous a permis de mettre en évidence une diminution significative de la prolifération des LT CD4⁺ hétérologues stimulée par les MD-DCs de patients atteints de SpA qu'elles aient ou non été activées par du LPS pendant 6h.

En parallèle, nous avons mené une étude transcriptomique pangénomique afin de caractériser des gènes différentiellement exprimés, entre les MD-DCs de patients et celles de témoins. Des puces Affymetrix pangénomiques ont été utilisées afin de mesurer le niveau d'expression des gènes des MD-DCs laissées immatures ou stimulées par du LPS pendant 6 ou 24 heures, provenant de 9 patients et de 10 témoins. Cette étude nous a permis d'identifier 81 gènes différentiellement exprimés entre patients et témoins, avec une p-value nominale inférieure à 0,01 et un fold-change inférieur ou supérieur à 1,5. Quatre de

ces gènes ont été sélectionnés en fonction de l'importance du différentiel d'expression, du niveau de significativité statistique aussi bien que de leur relevance biologique pour une validation par RT-PCR quantitative. Nous avons alors confirmé la surexpression d'*ADAMTS15*, de *F13A1* et de *SELL* et la diminution d'expression de *CITED2* chez les patients en comparaison avec les témoins.

De plus, l'analyse approfondie du profil d'expression des 81 gènes différentiellement exprimés a permis d'observer une corrélation négative entre l'expression d'*ADAMTS15* et celle de *CITED2*, lors de la stimulation des MD-DCs par le LPS pendant 6 heures ($\rho = -0,75$; $P = 0,0003$). Considérant alors la fonction de co-activateur transcriptionnel de *CITED2*, nous nous sommes demandés si d'autres gènes que *ADAMTS15* pourraient partager une co-régulation avec *CITED2*. Pour cela, nous avons recherché s'il existait une corrélation entre l'expression de chaque gène analysé et celle de *CITED2*, ce qui nous a permis de mettre en évidence 222 gènes significativement corrélés à *CITED2* chez les patients ($p < 0,01$). Une analyse informatique des voies de signalisation, à l'aide du logiciel Genomatix, a été conduite et a permis de mettre en évidence plusieurs gènes de la voie Wnt corrélés à *CITED2*, chez les patients (*WNT1*, *WNT10B*, *FZD4* and *ROR2* ; $p = 2,48 \times 10^{-4}$) mais pas chez les témoins. Ce profil de co-régulation suggère une implication possible de la voie de signalisation Wnt dans physiopathologie la SpA.

Ce travail a mis en évidence, une réduction de la capacité des MD-DCs provenant de patients atteints de SpA à stimuler des LT CD4⁺ hétérologues, en parallèle d'un profil d'expression génique significativement dérégulé, en comparaison avec les DCs de témoins. Il confirme de ce fait qu'une anomalie fonctionnelle des DCs pourrait être impliquée dans les mécanismes de la maladie, comme cela avait précédemment été montré dans le modèle du rat transgénique HLA-B27.

**Monocyte-derived dendritic cells from HLA-B27⁺ axial spondyloarthritis patients
display altered functional capacity and deregulated gene expression**

Talpin Alice M S,¹ Costantino Félicie, M D,¹ Bonilla Nelly, M S,¹ Leboime Ariane, M D,²
Letourneur Franck, M S,³ Jacques Sébastien, M S,³ Dumont Florent, M S,³ Amraoui Sonia,
M S,⁴ Dutertre Charles-Antoine, Ph D,⁴ Garchon Henri-Jean, M D, Ph D,^{1,5} Breban
Maxime, M D, Ph D,^{1,2} Chiocchia Gilles, Ph D^{1,6}

1 – Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS (UMR 8104), Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cite, Laboratoire d'excellence INFLAMEX, Paris, 75014, France;

2 – Rheumatology Division, Ambroise Paré Hospital (AP-HP), and Versailles Saint Quentin en Yvelines University, Boulogne-Billancourt, 92100, France;

3 – Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS (UMR 8104), Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cite, Genomics platform, Paris, 75014, France;

4 – Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS (UMR 8104), Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cite, Antigen Presentation by Dendritic Cell Team, Paris, France;

5 – Genetics Division, Ambroise Paré Hospital (AP-HP), and Versailles Saint Quentin en Yvelines University, Boulogne-Billancourt, 92100, France;

6 – UFR des Sciences de la Santé, Simone Veil, Versailles Saint Quentin en Yvelines University, Montigny-Le-Bretonneux, 78180, France;

Address reprint requests and correspondence to:

Gilles Chiocchia, Ph.D, UFR des sciences de la santé Simone Veil, UVSQ

2 Avenue de la source de la Bièvre

78180 Montigny-le-Bretonneux

Ph: 33-(0)170 429 375; Fax: 33-(0)140 516 641

E-mail: gilles.chiocchia@inserm.fr

Keywords: spondyloarthritis, ankylosing spondylitis, transcriptomics, monocyte-derived dendritic cells

Word Count: 2 932

ABSTRACT

Objectives: To compare the functional capacity and gene expression profile of monocyte-derived dendritic cells (MD-DCs) in HLA-B27⁺ axial spondyloarthritis (SpA) patients and healthy controls.

Methods: MD-DCs were differentiated with IL-4 and GM-CSF for 7 days, starting from purified CD14⁺ monocytes and stimulated with LPS for 6 and 24 hours. Their capacity to stimulate allogeneic CD4⁺ T cells from unrelated healthy donor was tested in 18 patients and 24 controls. Transcriptomic study was performed with Affymetrix HuGene 1.0 ST microarrays in 9 SpA subjects and 10 controls. Gene expression levels were compared between patients and controls using a multivariate design under a linear model (LIMMA). Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was performed for validation of the most striking gene expression differences.

Results: The stimulatory capacity of allogeneic CD4⁺ T cells by MD-DCs from SpA patients was decreased. Transcriptomic analysis revealed 81 genes differentially expressed in MD-DCs between SpA patients and controls ($p < 0.01$ and fold-change < 0.66 or > 1.5). Four selected genes were validated by qRT-PCR: *ADAMTS15*, *CITED2*, *F13A1* and *SELL*. Expression levels of *ADAMTS15* and *CITED2*, encoding a metallopeptidase and a transcription factor, respectively, were inversely correlated with each other ($r = 0.75$, $p = 0.0003$). Furthermore, *in silico* analysis identified several genes of the Wnt signaling pathway having expression co-regulated with *CITED2*.

Conclusion: This study revealed altered function and gene expression pattern in MD-DCs from HLA-B27⁺ axial SpA. Co-expression study showed an inverse correlation between *ADAMTS15* and *CITED2*. Moreover, the Wnt signaling pathway appeared as deregulated in SpA MD-DCs, a finding which may be connected to Th17-driven inflammatory responses.

INTRODUCTION

Spondyloarthritis (SpA) is a chronic inflammatory rheumatic disorder, with a prevalence around 1% in Caucasian population [1]. Joint inflammation is responsible for pain and stiffness but long-term outcome is mainly determined by new bone formation, which can lead to complete ankylosis. Effective treatments such as TNF blockers can temporarily suppress inflammation, but none has yet proven to affect long-term disease outcome. Therefore, there is a need to better understand pathological mechanisms controlling both initiation and progression of SpA.

Genome-wide gene expression analysis is a powerful approach to identify molecular mechanisms responsible for a disease. Microarray studies have already been conducted in SpA, most of them focusing on the ankylosing spondylitis (AS) subtype [2–7]. Each of those studies identified several genes differentially expressed between patients and controls but there was very little overlap between their results, maybe due to the variety of protocols.

Several studies support an important role of dendritic cells (DC) in the pathogenesis of SpA. Indeed, aberrant functions of DC have been demonstrated in an HLA-B27/human β 2-microglobulin transgenic rat model of SpA [8]. First, DCs from these rats have a decreased capacity to stimulate primary allogeneic or syngeneic T cell responses [9]. Furthermore, the proportion of conjugates formed between HLA-B27 DCs and naïve CD4⁺ T cells is reduced. Moreover, mature HLA-B27 molecules expressed by DCs appear to impair the formation of an antigen-independent immunologic synapse with naïve CD4⁺ T cells by interfering with the engagement of costimulatory molecules [10]. Finally, B27 transgenic rat DCs were shown to favor Th17 expansion [11,12] and to alter regulatory T cells function, resulting in decreased IL-10 and enhanced IL-17 production [13].

On this basis, we hypothesized that DCs also play an important role in human disease, as proposed in the HLA-B27 transgenic rat model. The aim of the current study was to compare functional capacity and gene expression profile of monocyte-derived dendritic cells (MD- DCs) in HLA-B27⁺ axial spondyloarthritis (SpA) patients and healthy controls.

PATIENTS AND METHODS

Patients and controls

We studied three different groups of patients and controls: 10 patients and 5 controls for monocyte subsets characterization by flow cytometry, 18 patients and 24 controls for mixed lymphocyte reaction and 9 patients and 10 controls for the MD-DCs transcriptomic study (6 patients and 4 controls were investigated for both the latter). All the patients were HLA-B27⁺ and fulfilled the Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial SpA [14]. Controls were healthy blood donors.

Patient characteristics are summarized in **Supplementary table 1**. All participants to the study gave written informed consent and the study was approved by local ethics committee of Ile-de-France XI (Saint-Germain-en-Laye France).

Cell isolation, culture and stimulation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from 50 mL of blood by gradient separation on Ficoll density gradient centrifugation (STEMCELL Technologies).

Monocytes used to generate MD-DCs were purified by magnetic cell sorting using anti-CD14 monoclonal antibody (mAb)-coated beads (BD IMag). Sorted monocytes were morphologically homogeneous with 99% of CD14⁺ cells, as determined by flow cytometry.

Monocytes were further cultured for 6 days in 24-well plates (400,000 cells/500 μ L) in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 500 U/mL recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF) and 500 U/mL rhIL-4 (AbCys S.A., France). Then, the MD-DCs were stimulated or not with lipopolysaccharide from E. Coli (LPS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at a concentration of 100 ng/mL for the last 6 or 24 hours of culture (further referred to as time-points H0, H6 and H24).

CD4⁺ T cells were purified from two unrelated healthy donor PBMCs by magnetic cell sorting using anti-CD4 monoclonal antibody (mAb)-coated beads (BD IMag), and stored frozen until being used for mixed lymphocyte reaction (MLR).

Flow cytometry

To characterize monocyte subsets, freshly purified PBMCs were analyzed by 6-color flow cytometry on a FACS LSRII apparatus. The gating strategy was based on a previous report [15]. Monocytes were subdivided into three major subsets: classical CD14⁺⁺CD16⁻, intermediate CD14⁺⁺CD16⁺ and non-classical CD14⁺CD16⁺⁺ monocytes. The following anti-human mAbs were used: CD45-Amcyan (BD Biosciences), HLA-DR-PerCP (BD Biosciences), CD19-ECD (Beckman Coulter), CD14-QDot655 (Invitrogen), CD16-APC-H7 (BD Biosciences). The Live/Dead blue Dye (Invitrogen) was used to exclude dead cells.

Samples of the purified monocytes used to generate MD-DCs and of the resulting MD-DCs were routinely stained with the following anti-human mAbs: CD14-FITC, CD11c-APC, CD40-PE, HLA-I-FITC, HLA-DR-PerCP, CD80-PE, CD83-APC and CD86-FITC, (all from BD Bioscience) and analyzed by flow cytometry on a FACS canto II apparatus (BD Biosciences).

Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)

Purified allogeneic CD4⁺ T cells (10⁵ cells per well) from healthy donor were cultured with unstimulated (H0) or LPS-stimulated (H6, H24) MD-DCs (10⁴ cells per well), in 96-well flat-bottomed culture dishes in a final volume of 200 µL. Proliferation of T cells was assayed by measuring incorporation of ³H-deoxythymidine added (0.5 µCi per well) after 6 days of culture, using a Microbeta scintillation counter (Wallac, Turku, Finland). Data are expressed as the mean counts per minute (CPM) in triplicate wells. An MLR index (ratio of CPM of MLR on CPM of CD4⁺ T cells only) was used to represent CD4⁺ T cells proliferation. Two CD4⁺ T cell batches stored from different healthy donors were sequentially used for MLR in

two sets of experiments, each including equivalent numbers of patient and control MD-DC samples. Since there was no statistically significant difference in the results between both sets of experiments, we pooled them.

Wilcoxon test was used to compare MLR indices between patients and controls at each stimulation time-point.

Transcriptomic study

RNA isolation

MD-DCs were disrupted and homogenized using RLT buffer (Qiagen, Valencia, CA). Total RNA was isolated using RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). RNA quantity and quality were assessed using Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA). Only samples with an RNA integrity number (RIN) above 8 were further processed.

Microarray hybridization

RNA was reverse transcribed, converted to biotinylated complementary RNA using standard Affymetrix protocol (Affymetrix, Santa Clara, CA) and hybridized to the Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0 ST Array, following a routine protocol established by the genomic platform of Cochin Institute.

Differential gene expression validation by qRT-PCR

For validation, the relative gene expression levels of candidate genes identified through the foregoing microarray study were further quantified using qRT-PCR. Briefly, RNA treated with DNase I (Invitrogen) was reverse transcribed using SuperscriptII (Invitrogen) and then quantified using the SYBR green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Primers were purchased from Eurofins MWG

(nucleotide sequence of the PCR primers are available in **supplementary table 2**). The design experiment was based on three technical replicates.

Statistical analysis

Raw Affymetrix data (.cel files) from 57 arrays (corresponding to H0, H6 and H24 time-points of stimulation by LPS for 19 subjects) were transformed by Robust Multichip Analysis (RMA) method using Bioconductor in R software (library Affy) [16]. This transformation included background correction, normalization and summarization of expression values using Brainarray version 15 custom chip definition (cdf) files generated with the Ensembl annotation set [17]. Before analysis, genes were filtered on annotation and expression level mean with a cut-off at 6.11 (corresponding to the mean of expression level of both anti-genomic and intronic probes of housekeeping genes). Gene expression levels were then fitted to a bivariate linear model including disease status and time-point after stimulation, using the Linear Models for Microarray data (LIMMA) package of Bioconductor in R environment to determine differentially expressed genes [18]. The threshold for differential gene expression between patients and controls was set to a global fold change of more or less than 1.5 with a nominal p-value less than 0.01.

For qRT-PCR validation, gene expression data were computed with the $\Delta\Delta Cq$ method, using three housekeeping genes: *RPL30*, *β -ACT* and *GAPDH*. Then, 2-way analysis of variance (ANOVA) was used to test differential gene expression among samples from SpA and controls without (baseline; no treatment) and with LPS treatment for 6 and 24 hours. In case of statistical significance ($p < 0.05$), post-hoc *t* tests with Bonferroni correction allowed to perform pairwise comparisons.

Paired genes co-expression study and molecular pathway analysis

Pairwise correlations between gene expression levels were tested using the nonparametric Spearman test. We used the commercial software Genomatix Pathway System (<http://www.genomatix.de/>) to identify significantly enriched pathways and functional themes, among the list of the best correlated genes with genes of interest.

RESULTS

Functional impairment of MD-DCs from SpA patients

To verify that MD-DCs were differentiated from similar monocyte populations between SpA patients and controls, we analyzed monocytes subsets in both groups. As shown in **Supplementary figure 1**, the distribution of the classical, intermediate and non-classical circulating subsets among CD45⁺ PBMCs was similar in patients and controls.

The cells obtained after 7 days of differentiation in culture in patients and controls were uniformly CD14⁻, CD11c⁺, CD40⁺, HLA-DR⁺, CD83^{dim} and CD86⁺, consistent with an MD-DC phenotype. Moreover, HLA-DR, CD80 and CD86 expression increased and CD83 was induced on MD-DCs after LPS stimulation for 24 h (**Supplementary figure 2**).

In rat model of SpA, HLA-B27 transgenic DCs have a decreased capacity to stimulate allogeneic T cells. Thus, we tested the capacity of MD-DCs from HLA-B27⁺ SpA patients to prime allogeneic CD4⁺ T cells using *in vitro* proliferation assay. A significantly decreased proliferation of CD4⁺ T cells was observed in SpA MD-DCs before and after 6 hours of LPS exposure, as compared to controls ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively; **Figure 1**).

Identification of differentially expressed genes in MD-DCs between patients and controls

To investigate the underlying mechanisms of their functional defect, we then compared gene expression levels between MD-DCs from SpA patients and healthy donors upon stimulation with LPS.

After filtering on gene expression level and gene annotation, 13,021 genes (57.3% of the genes present in microarray) were kept for further analysis. Expression data for MD-DCs either left unstimulated or stimulated with LPS for 6 or 24 hours were first globally compared between SpA patients and healthy subjects. Unsupervised hierarchical clustering showed that samples were perfectly grouped according to LPS stimulation time-points (**Supplementary figure 3**) but not to the disease status. Linear modeling nevertheless identified 81 genes

differentially expressed between patients and controls at any time-point, with a nominal p-value <0.01 and a fold-change greater or lesser than 1.5 (**Supplementary table 3**). Of this set of genes, 61 were down-regulated and 20 were up-regulated in patients.

Using the extraction of the dataset corresponding to these 81 genes, LPS stimulation time-points were perfectly separated by unsupervised hierarchical clustering. Furthermore, patients and controls were now clearly discriminated, with only four misclassifications (one at H0, two at H6 and one at H24) (**Figure 2**).

Four candidate genes were chosen for validation study on the basis of their p-value, fold-change and biological relevance: *ADAMTS15*, *CITED2*, *F13A1* and *SELL*. For all 4 genes, the qRT-PCR data produced with the RNA samples used for the microarray study confirmed the significant differences in expression and the direction of changes between SpA patients and controls (**Table 1, Figure 3**): *ADAMTS15*, *F13A1* and *SELL* were significantly up-regulated in SpA samples whereas *CITED2* was down-regulated.

Table 1. qRT-PCR expression analysis of four selected genes in MD-DCs from SpA patients, as compared to controls. P-value is reported considering the global effect, the effect of the disease status only or the effect of the disease status adjusted for time.

Gene	Microarray	qRT-PCR				
	P-value	P-value		Fold-change		
		Disease	Disease/time	H0	H6	H24
ADAMTS15	0.0003	0.0005	0.04	2.2	5.63	2.2
CITED2	0.0007	0.21	0.031	0.94	0.51	0.99
F13A1	0.00006	0.019	0.001	1.32	1.25	5.05
SELL	0.006	0.012	0.8	3.57	3.47	2.97

Co-regulated genes in SpA patients

Examination of gene expression data indicated that some of them displayed similarity in their expression profile suggesting co-regulation. Indeed, we found a highly significant negative correlation between *ADAMTS15* and *CITED2* expression levels at H6 ($\rho=-0.75$; $p=0.0003$; **Figure 4**).

Considering the transcriptional coactivator function of *CITED2* and its down-regulation in SpA MD-DCs, we sought whether other genes than *ADAMTS15* shared a similarly co-regulated expression pattern in the patients. We tested the correlation of genome-wide expression matrix of patients MD-DCs with *CITED2* in a pairwise fashion. A set of 222 genes was found to be significantly correlated ($p<0.01$). They were analyzed with the Genomatix web platform in order to interrogate their biological relevance. This revealed a significant enrichment of genes belonging to the Wnt signaling pathway ($p=2.48\times 10^{-4}$). In the controls, there was no significant correlation between expression levels of *CITED2* and of the four genes identified in the Wnt pathway (i.e. *WNT1*, *WNT10B*, *FZD4* and *ROR2*) (**Figure 5**). This co-regulation pattern involving five genes of the Wnt signaling pathway is therefore specifically associated with the disease.

DISCUSSION

In this study, we showed for the first time that the capacity of MD-DCs to stimulate naive allogeneic CD4⁺ T cell responses was impaired in SpA patients compared to controls. The genome-wide transcriptome of these MD-DCs elicited by LPS stimulation revealed 81 genes differentially expressed of whom 4 have been validated by RT-qPCR. Finally, we identified the Wnt signaling pathway as dysregulated in patients.

We decided to favor the *in vitro* approach with cultured DCs instead of *ex vivo* approach with peripheral blood DCs for several reasons. First, we wanted to remove cells from *in vivo* influences, such as non-specific acute inflammation and drug therapy. Moreover, sorting cells represent less than 0.5% of circulating leukocytes which is too low to obtain sufficient amount of RNA to perform microarray analysis in optimal conditions.

First, we demonstrated that MD-DCs differentiated from similar monocyte populations in both groups. Then, we observed that the ability of SpA MD-DCs to stimulate allogeneic CD4⁺ T cell proliferation was markedly defective, as compared to controls, as previously shown in SpA-prone HLA-B27 transgenic rats. The molecular basis for this impaired DC function has yet to be elucidated.

To investigate this impairment, we have studied the time-dependent global transcriptome of MD-DCs in response to LPS stimulation. A number of microarray-based studies have previously been undertaken in AS, on whole blood cells [3–5], PBMCs [6,7] or macrophages [2]. But no transcriptomic analysis had been conducted on DCs. Of note, as we worked on a homogeneous cell population rather than on cell mixtures, our results were not confounded by variations in the composition of the cell population [19]. The time-dependency of our gene profiling is also a novel aspect, rarely investigated in humans.

Our analysis revealed 81 genes differentially expressed in resting and/or LPS-stimulated MD-DCs between SpA and controls. Based on the magnitude of their variation

between patients and controls, the level of statistical significance, and their biological relevance, we selected four of these genes that we validated using qRT-PCR.

We found an increased expression of *ADAMTS15* (A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motif) in SpA. Although ADAMTS family has not yet been implicated in this disorder, numerous studies have identified a role for metalloproteinases (MMP) in SpA susceptibility and severity [20–22]. Noteworthy, *ADAMTS15* was shown to be expressed in the cartilage, with decreased expression in osteoarthritis [23]. Thus, *ADAMTS15* could be implicated in the cartilage and/or bone turnover that takes place during joint inflammation, such as in SpA.

CITED2 functions as a context-dependent transcriptional modulator to up- or down-regulate the expression of specific genes [24–26]. Here, the expression of *CITED2* was down-regulated in SpA MD-DCs. We further showed an inverse correlation between *CITED2* and *ADAMTS15* expression after six hours of LPS treatment. Interestingly, similar inverse correlation has previously been reported between *CITED2* and several MMP family members [27,28]. MMPs constitute a very important group of proteolytic enzymes in joint tissues. Thus, it has been suggested that *CITED2* exerted chondroprotective effects through MMPs down-regulation [29]. The down-regulation of *CITED2* and the inverse correlation between *CITED2* and *ADAMTS15* expression that we observed here suggest that DCs or other phagocytic mononuclear cells, such as macrophages and osteoclasts, could be implicated in SpA joint resorption through heightened metalloproteinases activity.

In silico pathway analysis conducted on *CITED2* co-expressed genes highlighted a down-regulation of several factors belonging to the canonical (i.e. *WNT1*, *WNT10B* and *FRZL4*) and non-canonical (*ROR2*) Wnt signaling pathways, of potential relevance for SpA pathogenesis. First, factors of the canonical Wnt pathway were shown to play a crucial role either in bone formation or destruction in inflammatory arthritis [30,31], such as *WNT10b*

[32,33]. On the other hand, activation of canonical Wnt- β -catenin signaling in DCs was shown to concur to regulatory T cells differentiation and conversely to inhibit Th17 differentiation [34]. Moreover, ROR2 is a signaling component of the non-canonical Wnt pathway acting on actin cytoskeleton to stimulate cell migration [35,36]. Interestingly, altered T cell stimulation was linked to defective cytoskeleton dynamics in HLA-B27 transgenic rat DCs [37].

F13A1 encodes the coagulation factor XIII A subunit, a transglutaminase enzyme. It has multiple extra- and intra-cellular functions, including a role in cartilage and bone development. Hence, increased factor XIII A expression has previously been associated with cartilage aging and degeneration [38]. Fibrin crosslinking by factor XIII is of crucial importance not only for haemostasis, but also for inflammation. For instance, factor XIII A-subunit genotype was shown to influence C-reactive protein levels during inflammation in rheumatoid arthritis (RA) [39].

Finally, *SELL* encodes the lymphocyte homing receptor L-selectin/CD62L, one of the major adhesion molecules, which regulates entry of neutrophils and monocytes into inflamed tissues and contributes to the severity of joint inflammation in experimental arthritis [40]. Thus, up-regulation of *SELL*, as shown here in DCs could well participate to joint inflammation in SpA.

In conclusion, results of the present study reveal the defective functional capacity of DCs in SpA patients, as compared to controls. Furthermore, our results demonstrate significant changes in MD-DCs gene expression upon LPS stimulation that may be inherent to SpA patients. Some of them (i.e. decreased Wnt signaling) could account for the altered DC function that provided a rationale for the present study. Others (i.e. up-regulation of *ADAMTS15*, *F13A1* and *SELL*) would concur to reinforce tissue inflammation and/or damage.

Finally, the co-expression of *CITED2* co-transcriptional factor with several of the foregoing genes (i.e. Wnt signaling pathway and *ADAMTS15*) supports the hypothesis that a coordinate deregulation taking place in DCs plays an important role in SpA pathogenesis.

COMPETING INTERESTS

None

CONTRIBUTORSHIP

The corresponding author confirms that all the individuals listed as authors fulfill the uniform authorship credit requirements for manuscripts submitted to medical journals, that is, that they all contributed to the manuscript based on (1) substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and (3) final approval of the version to be published.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge the contribution of Pr A. Hosmalin (Director of Antigen presentation by Dendritic cell team), for fruitful scientific discussions and providing antibodies for monocyte subset characterization.

FUNDINGS

This work was supported by a grant from Agence Nationale de la Recherche (grant ANR 2010 GEMISA) and Laboratoire d'excellence INFLAMEX. Alice Talpin was supported by a grant from Arthritis Fondation Courtin. Félicie Costantino was supported by a grant from the Société Française de Rhumatologie (SFR). Charles-Antoine Dutertre was supported by the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS). Sonia Amraoui had a fellowship from Paris-Diderot University.

FIGURES

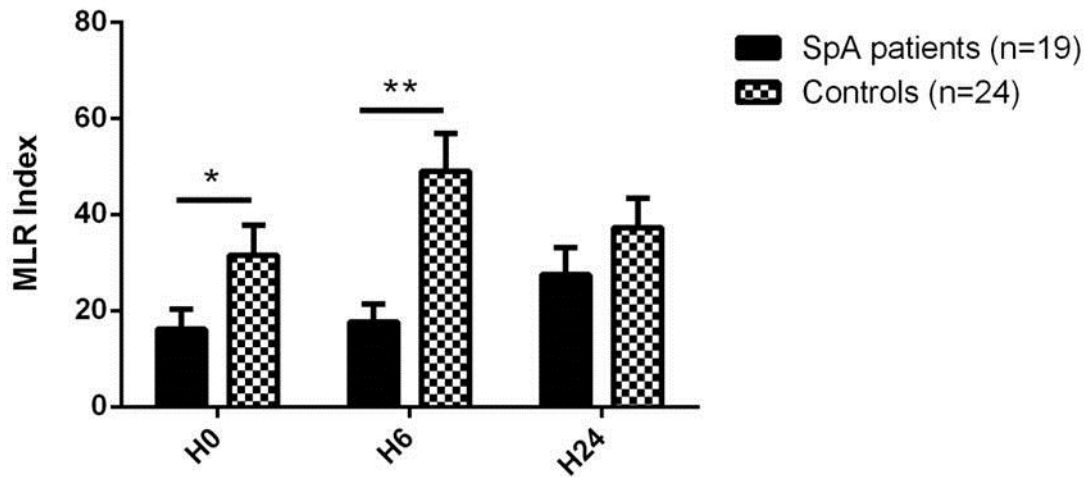


Figure 1. Impaired allogeneic T cell stimulatory capacity of MD-DCs from SpA patients.

MD-DCs from SpA patients and healthy controls that were left unstimulated (H0), or were stimulated with LPS for 6h or 24h (H6 and H24, respectively) were tested for their capacity to stimulate *in vitro* allogeneic CD4⁺ T cells. Results are expressed as ³H-deoxythymidine incorporation after 6 days of mixed lymphocyte reaction, in CPM ratio. Bars represent the mean proliferation index and standard error of the mean induced by MD-DCs from 19 SpA patients and 24 healthy controls. Wilcoxon tests showed significant differences at H0 (* p < 0.05) and H6 (** p < 0.01).

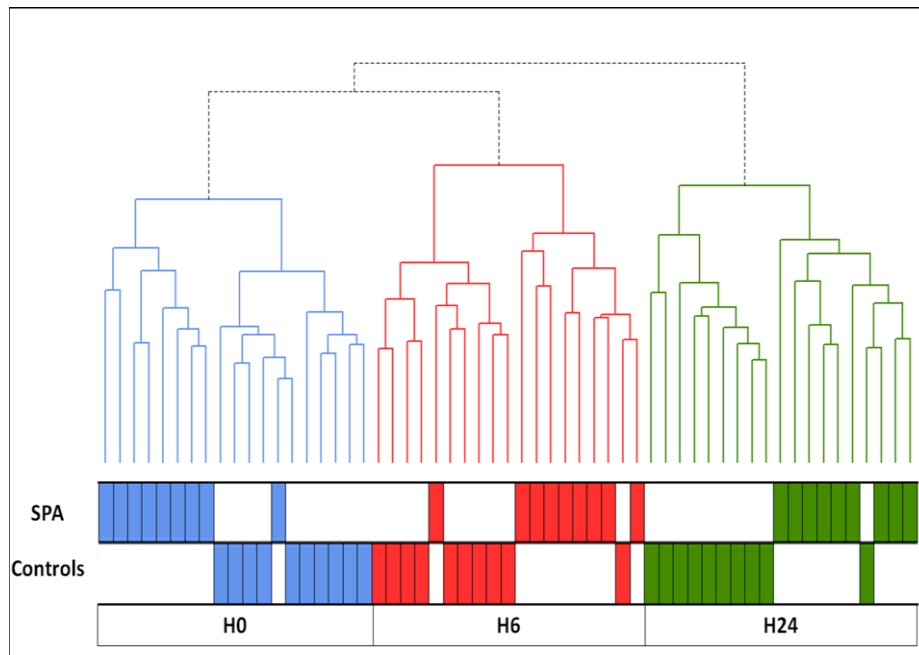


Figure 2. Unsupervised hierarchical clustering of 57 samples based on microarray expression levels of the 81 differentially expressed genes between SpA patients and controls. Each time-point is color-coded (H0: blue, H6: red, H24: green). Samples are clustered on the horizontal axis (top row: SpA patients, bottom row: healthy controls), with the length on the vertical axis representing the degree of correlation between samples.

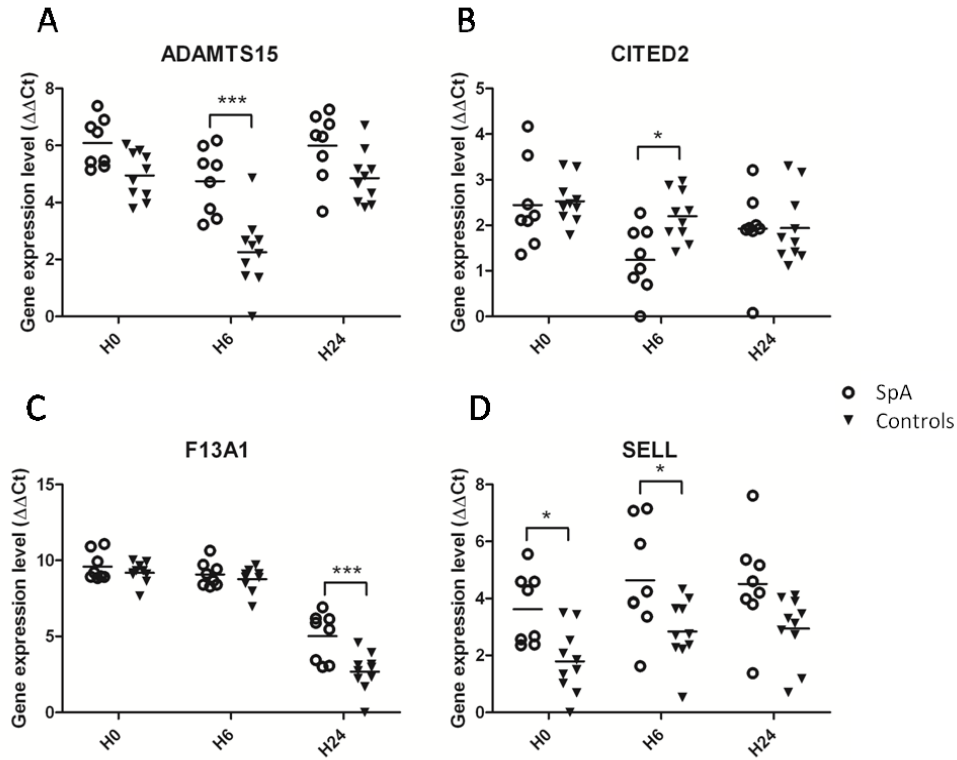


Figure 3. Scatter plots showing qRT-PCR expression levels in SpA and controls of the 4 selected genes: *ADAMTS15* (A), *CITED2* (B), *F13A1* (C) and *SELL* (D). The x axis of the plots represents the three LPS-stimulation time-points (H0, H6 and H24) and the y axis shows the \log_2 of gene expression level normalized with housekeeping genes ($\Delta\Delta Ct$). * $P < 0.05$, *** $P < 0.0005$, SpA *versus* controls.

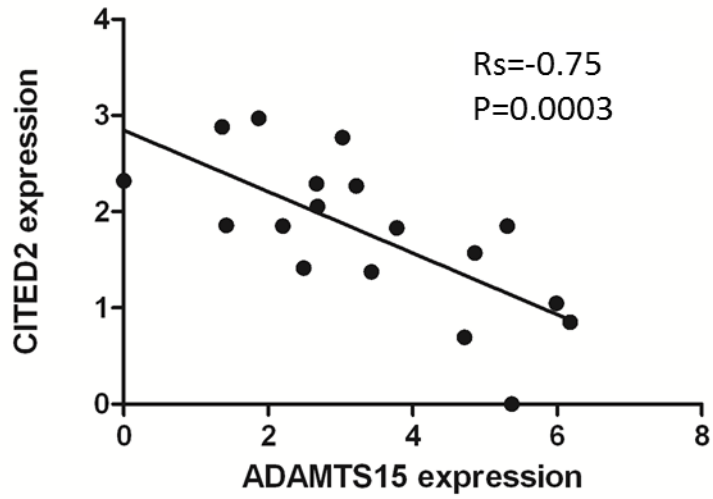


Figure 4. Correlation of qRT-PCR expression levels between *CITED2* and *ADAMTS15*. Expression is shown for H6 time-point in mixed SpA and control samples. P-value (P) and nonparametric Spearman correlation coefficient value (rho) are shown.

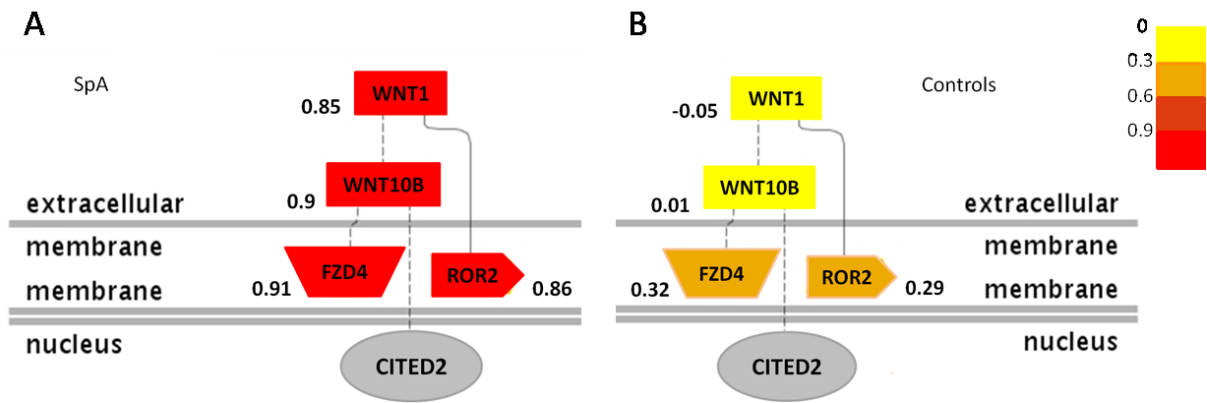


Figure 5. Coexpression of the Wnt signaling pathway with *CITED2* in SpA.

Graphical view of the Wnt pathway identified by studying genes coexpressed at H6 with *CITED2* in the whole microarray dataset in patients (A) and in controls (B). Numbers and color code (scale on the right side) indicate nonparametric Spearman correlation coefficient of the network's gene with *CITED2*.

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary table 1: Characteristics of the study patients*

Feature	Flow cytometry (n = 10)	Proliferation assay (n = 19)***	Transcriptomic study (n = 9)***
Male gender, n (%)	3 (30)	12 (63)	5 (67)
Age, mean (SD), yrs	43.9 (10.2)	46.4 (9.9)	48.1 (7.9)
HLA-B27, n (%)	10 (100)	18 (94.7)	9 (100)
Disease duration, mean (SD), yrs	23.0 (9.2)	23.2 (10.2)	15.1 (5.2)
BASDAI, mean (SD)	2.9 (1.8)	3.4 (2.2)	3.9 (2.0)
CRP, mean (SD), mg/L	ND	10.6 (14.7)****	7.1 (8.5)
Axial manifestations			
- Inflammatory back pain, n (%)	10 (100)	12 (100)	9 (100)
- Radiographic sacroiliitis**, n (%)	7 (70)	11 (95)	8 (89)
Peripheral manifestations			
- Peripheral arthritis, n (%)	3 (30)	6 (32)	2 (22)
- Enthesitis, n (%)	4 (40)	11 (58)	6 (67)
Extra-articular manifestations			
Uveitis, n (%)	0 (0)	5 (26)	3 (33)
Psoriasis, n (%)	2 (20)	4 (21)	3 (33)
Inflammatory bowel disease, n (%)	0 (0)	2 (10)	0 (0)
Current treatment			
- NSAID, n (%)	3 (30)	14 (74)	5 (56)
- Anti-TNF therapy, n (%)	3 (30)	3 (16)	2 (22)
- None, n (%)	4 (40)	4 (21)	2 (22)

SpA = spondyloarthritis; BASDAI = Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; NSAID = non-steroidal anti-inflammatory drug; TNF = tumor necrosis factor. SD = standard deviation; ND = not done.

* The registered manifestations correspond to those present at the time of examination, or retrieved from past-medical history.

** Refers to radiographic sacroiliitis \geq grade II bilateral or grade III unilateral.

*** 6 patients are common to both studies.

**** Data available for 9 patients.

Supplementary table 2: nucleotide sequence of the PCR primers

Gene name	Forward primer	Reverse primer
Candidate genes		
<i>ADAMTS15</i>	GACTCTTCACCAAGCCCATGC	AGCCAGGTAGTTGTCATCCCC
<i>CITED2</i>	TGGTGATAGAAATGGGTTTGG	GTTTCGATCGAGTCAACAGC
<i>F13A1</i>	GTGAAGATGATGCTGTGTATCTG	ATGCCATCTTCAAACCTGACC
<i>SELL</i>	CAGTCTACCTGCAGCACAGC	TGGGTGCTCTGACATTTTC
Housekeeping genes		
<i>ACTB</i>	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG
<i>GAPDH</i>	CCTCAACGACCACTTTGTCA	GAGGGTCTCTCTCTTCCTCTTGT
<i>RPL30</i>	CCTAAGGCAGGAAGATGGTG	AATGACCAATTTTCGCTTTGC

Supplementary table 3. List of the genes differentially expressed in MD-DCs between SpA and controls, ranked by fold-change.*

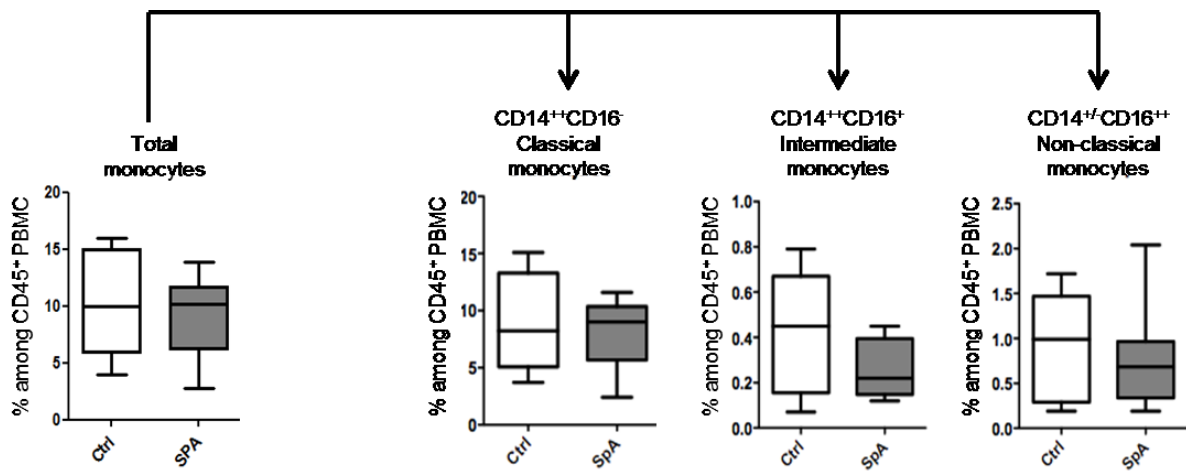
Gene name	Ensembl ID	P-Value	Global Fold change
<i>Up-regulated genes</i>			
<i>TRBC2</i>	ENSG00000211772	9.67E-03	2.96
<i>SELL</i>	ENSG00000188404	6.06E-03	2.96
<i>F13A1</i>	ENSG00000124491	6.12E-05	2.63
<i>ADAMTS15</i>	ENSG00000166106	3.02E-04	2.38
<i>RND3</i>	ENSG00000115963	8.84E-03	2.36
<i>SIGLEC15</i>	ENSG00000197046	7.98E-04	2.12
<i>HSPA1A</i>	ENSG00000204389	6.03E-03	2.01
<i>TBCK</i>	ENSG00000145348	1.05E-03	1.99
<i>BACE2</i>	ENSG00000182240	8.46E-03	1.85
<i>FBXL4</i>	ENSG00000112234	5.74E-03	1.85
<i>PIAS2</i>	ENSG00000078043	5.35E-03	1.82
<i>KIAA0907</i>	ENSG00000132680	2.26E-03	1.78
<i>SEMA3C</i>	ENSG00000075223	7.04E-03	1.74
<i>HSPH1</i>	ENSG00000120694	5.82E-03	1.74
<i>EDEM3</i>	ENSG00000116406	5.89E-03	1.71
<i>USP40</i>	ENSG00000085982	8.55E-03	1.65
<i>P4HA1</i>	ENSG00000122884	6.44E-03	1.64
<i>DNAJA4</i>	ENSG00000140403	1.92E-03	1.63
<i>FBXO18</i>	ENSG00000134452	2.96E-03	1.54
<i>PTPLA</i>	ENSG00000165996	5.83E-03	1.52
<i>Down-regulated genes</i>			
<i>NDP</i>	ENSG00000124479	3.21E-03	0.13
<i>OLR1</i>	ENSG00000173391	3.36E-03	0.14
<i>FAIM2</i>	ENSG00000135472	6.58E-04	0.14
<i>ZNF804A</i>	ENSG00000170396	8.11E-03	0.23
<i>PLP2</i>	ENSG00000102007	3.42E-03	0.29
<i>CSF3R</i>	ENSG00000119535	5.64E-04	0.32
<i>EIF4H</i>	ENSG00000106682	1.11E-04	0.34
<i>BCKDHA</i>	ENSG00000248098	2.30E-03	0.35
<i>SGMS2</i>	ENSG00000164023	4.13E-05	0.36
<i>GTSF1</i>	ENSG00000170627	6.81E-03	0.36
<i>CITED2</i>	ENSG00000164442	7.29E-04	0.40
<i>COX7B</i>	ENSG00000131174	5.87E-03	0.40
<i>LRRC4</i>	ENSG00000128594	8.03E-05	0.42
<i>MNDA</i>	ENSG00000163563	3.75E-03	0.44
<i>ANKRD36BPI</i>	ENSG00000214262	8.41E-03	0.44
<i>HAUS1</i>	ENSG00000152240	9.11E-04	0.44
<i>TSPYL5</i>	ENSG00000180543	4.77E-04	0.45
<i>RPL26</i>	ENSG00000161970	3.94E-03	0.46

<i>PIGB</i>	ENSG00000069943	1.58E-03	0.47
<i>RPS15AP1</i>	ENSG00000214535	4.65E-03	0.48
<i>CKAP2</i>	ENSG00000136108	6.45E-03	0.50
<i>ALG10B</i>	ENSG00000175548	4.90E-03	0.51
<i>RBBP9</i>	ENSG00000089050	2.01E-03	0.51
<i>PARVG</i>	ENSG00000138964	9.96E-03	0.52
<i>P2RX1</i>	ENSG00000108405	8.45E-06	0.52
<i>RPL10A</i>	ENSG00000198755	7.17E-03	0.53
<i>SPATA20</i>	ENSG00000006282	7.41E-03	0.53
<i>GPR180</i>	ENSG00000152749	9.34E-03	0.54
<i>TTC39C</i>	ENSG00000168234	2.79E-04	0.54
<i>RPS4X</i>	ENSG00000198034	6.85E-03	0.54
<i>ENY2</i>	ENSG00000120533	5.10E-03	0.54
<i>ANAPC15</i>	ENSG00000110200	1.39E-03	0.55
<i>FHL3</i>	ENSG00000183386	7.01E-03	0.55
<i>WDR25</i>	ENSG00000176473	4.45E-05	0.56
<i>FAU</i>	ENSG00000149806	6.03E-04	0.56
<i>TRIM24</i>	ENSG00000122779	1.29E-03	0.57
<i>RFC3</i>	ENSG00000133119	1.03E-03	0.57
<i>TMEM205</i>	ENSG00000105518	4.43E-04	0.57
<i>ITPRIP</i>	ENSG00000148841	7.55E-03	0.58
<i>PORCN</i>	ENSG00000102312	8.47E-03	0.58
<i>BLOC1S1</i>	ENSG00000135441	3.99E-03	0.58
<i>CRTAP</i>	ENSG00000170275	4.34E-03	0.59
<i>ELMO1</i>	ENSG00000155849	6.58E-03	0.59
<i>NUDT3</i>	ENSG00000112664	4.60E-06	0.60
<i>USP30</i>	ENSG00000135093	3.20E-03	0.60
<i>COX20</i>	ENSG00000203667	4.08E-03	0.61
<i>CTBP1-AS1</i>	ENSG00000196810	5.98E-03	0.61
<i>TNFSF13B</i>	ENSG00000102524	3.15E-04	0.61
<i>IFT52</i>	ENSG00000101052	3.79E-03	0.61
<i>RPS15</i>	ENSG00000115268	4.69E-03	0.62
<i>ACADM</i>	ENSG00000117054	9.23E-03	0.62
<i>TFAM</i>	ENSG00000108064	6.40E-04	0.63
<i>MBIP</i>	ENSG00000151332	8.04E-04	0.63
<i>POU5F1B</i>	ENSG00000212993	1.55E-04	0.63
<i>MUT</i>	ENSG00000146085	2.72E-03	0.63
<i>SLU7</i>	ENSG00000164609	1.50E-04	0.63
<i>BAK1P1</i>	ENSG00000175730	4.24E-03	0.64
<i>ZFP36L2</i>	ENSG00000152518	9.55E-03	0.65
<i>SAP130</i>	ENSG00000136715	1.15E-04	0.65
<i>POLR1D</i>	ENSG00000186184	2.24E-04	0.65
<i>FAM204A</i>	ENSG00000165669	7.35E-05	0.66

* The criteria for the inclusion of genes in this table are described in Patients and Methods.

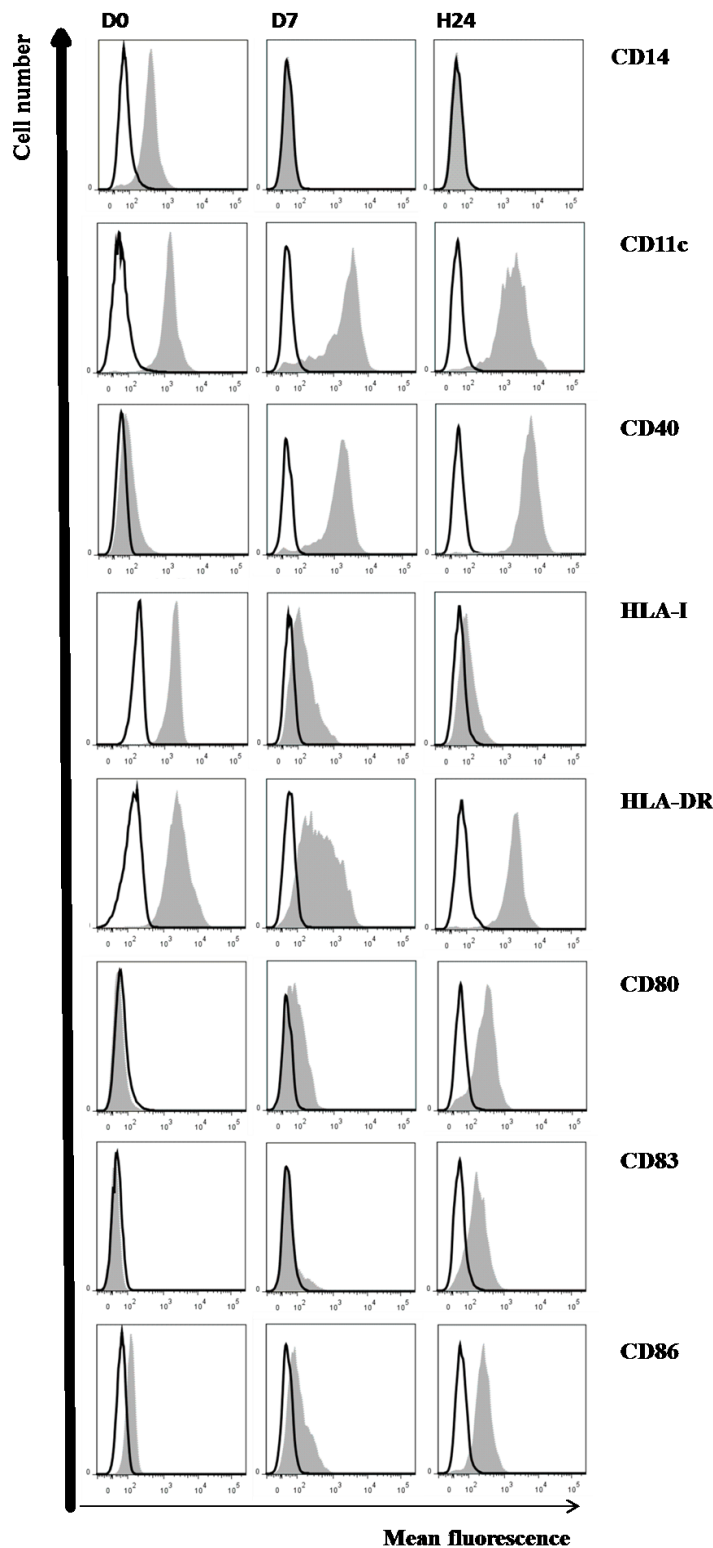
Global values are limma values. The 4 genes selected for qRT-PCR validation appear bolded.

SUPPLEMENTARY FIGURES

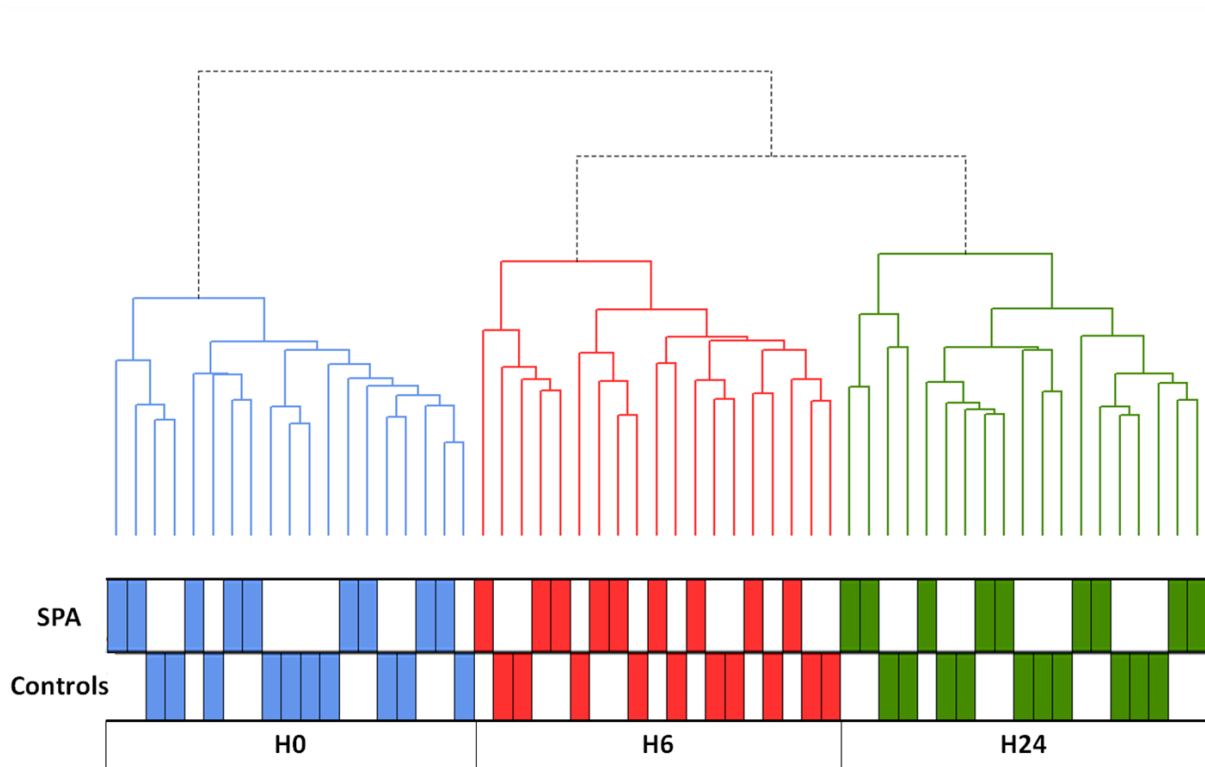


Supplementary figure 1. Comparison of monocyte subset distribution among PBMCs between SpA patients and healthy controls (Ctrl) by 6-color flow cytometry.

Distribution of monocyte subsets among CD45⁺ PBMC was studied in 5 healthy donors (clear boxes) and 10 HLA-B27⁺ SpA patients (grey boxes). Results are represented as boxes, bars indicate medians. The mean age of healthy donors was 42 years at the time of the study and 40% of them were men. Characteristics of the patients are shown in Supplementary table 1.



Supplementary figure 2. Phenotypic characterization of purified monocytes and MD-DCs. by flow cytometry. Results of one healthy donor representative of study subjects are shown. Monocytes (D0) were CD14⁺, CD11c⁺, CD40⁻, HLA-I⁻, HLA-DR⁺, CD80⁻, CD83⁻ and CD86⁻. MD-DCs (D7) were CD14⁻, CD11c⁺, CD40⁺, HLA-I⁺, HLA-DR⁺, CD80⁻, CD83^{dim}, and CD86⁺. HLA-DR, CD83 and CD86 expression increased, and CD80 was induced on MD-DCs after LPS stimulation for 24 h (H24). Clear plot representing control isotype and grey plot tested antibody.



Supplementary figure 3. Unsupervised hierarchical clustering of 57 samples based on whole-genome gene expression levels. Each time point is represented by a color (H0: blue, H6: red, H24: green). Samples are clustered on the horizontal axis (top row: SpA patients, bottom row: healthy controls).

REFERENCES

- 1 Baeten D, Breban M, Lories R, et al. Are spondylarthritides related but distinct conditions or a single disease with a heterogeneous phenotype? *Arthritis Rheum* 2013;**65**:12–20.
- 2 Smith JA, Barnes MD, Hong D, et al. Gene expression analysis of macrophages derived from ankylosing spondylitis patients reveals interferon-gamma dysregulation. *Arthritis Rheum* 2008;**58**:1640–9.
- 3 Gu J, Wei Y-L, Wei JCC, et al. Identification of RGS1 as a candidate biomarker for undifferentiated spondylarthritis by genome-wide expression profiling and real-time polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* 2009;**60**:3269–79.
- 4 Duan R, Leo P, Bradbury L, et al. Gene expression profiling reveals a downregulation in immune-associated genes in patients with AS. *Ann Rheum Dis* 2010;**69**:1724–9.
- 5 Assassi S, Reveille JD, Arnett FC, et al. Whole-blood gene expression profiling in ankylosing spondylitis shows upregulation of toll-like receptor 4 and 5. *J Rheumatol* 2011;**38**:87–98.
- 6 Pimentel-Santos FM, Ligeiro D, Matos M, et al. Whole blood transcriptional profiling in ankylosing spondylitis identifies novel candidate genes that might contribute to the inflammatory and tissue-destructive disease aspects. *Arthritis Res Ther* 2011;**13**:R57.
- 7 Sharma SM, Choi D, Planck SR, et al. Insights in to the pathogenesis of axial spondyloarthritis based on gene expression profiles. *Arthritis Res Ther* 2009;**11**:R168.
- 8 Breban M, Hacquard-Bouder C, Falgarone G. Animal models of HLA-B27-associated diseases. *Curr Mol Med* 2004;**4**:31–40.
- 9 Hacquard-Bouder C, Falgarone G, Bosquet A, et al. Defective costimulatory function is a striking feature of antigen-presenting cells in an HLA-B27-transgenic rat model of spondyloarthritis. *Arthritis Rheum* 2004;**50**:1624–35.
- 10 Hacquard-Bouder C, Chimenti M-S, Giquel B, et al. Alteration of antigen-independent immunologic synapse formation between dendritic cells from HLA-B27-transgenic rats and CD4+ T cells: selective impairment of costimulatory molecule engagement by mature HLA-B27. *Arthritis Rheum* 2007;**56**:1478–89.
- 11 Glatigny S, Fert I, Blaton MA, et al. Proinflammatory Th17 cells are expanded and induced by dendritic cells in spondylarthritis-prone HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis Rheum* 2012;**64**:110–20.
- 12 Utriainen L, Firmin D, Wright P, et al. Expression of HLA-B27 causes loss of migratory dendritic cells in a rat model of spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 2012;**64**:3199–209.
- 13 Krause L, Fert I, Labroquère K, et al. Regulatory T Cells in Spondyloarthritis (SpA) Animal Model and Modulatory Role of Inducible Costimulator (ICOS). *Arthritis Rheum* 2012;**64**:S260–261.

- 14 Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann Rheum Dis* 2009;**68**:777–83.
- 15 Dutertre C-A, Amraoui S, DeRosa A, et al. Pivotal role of M-DC8+ monocytes from viremic HIV-infected patients in TNF α overproduction in response to microbial products. *Blood* 2012;**120**:2259–68.
- 16 Gautier L, Cope L, Bolstad BM, et al. affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* 2004;**20**:307–15.
- 17 Dai M, Wang P, Boyd AD, et al. Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of GeneChip data. *Nucl Acids Res* 2005;**33**:e175–e175.
- 18 Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004;**3**:Article3.
- 19 Plessy C, Desbois L, Fujii T, et al. Population transcriptomics with single-cell resolution: A new field made possible by microfluidics: A technology for high throughput transcript counting and data-driven definition of cell types. *Bioessays* Published Online First: 27 December 2012. doi:10.1002/bies.201200093
- 20 Zhu J, Yu DTY. Matrix metalloproteinase expression in the spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol* 2006;**18**:364–8.
- 21 Maksymowych WP, Landewé R, Conner-Spady B, et al. Serum matrix metalloproteinase 3 is an independent predictor of structural damage progression in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2007;**56**:1846–53.
- 22 Matthey DL, Packham JC, Nixon NB, et al. Association of cytokine and matrix metalloproteinase profiles with disease activity and function in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther* 2012;**14**:R127.
- 23 Kevorkian L, Young DA, Darrah C, et al. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis Rheum* 2004;**50**:131–41.
- 24 Bragança J, Swingler T, Marques FIR, et al. Human CREB-binding protein/p300-interacting transactivator with ED-rich tail (CITED) 4, a new member of the CITED family, functions as a co-activator for transcription factor AP-2. *J Biol Chem* 2002;**277**:8559–65.
- 25 Lou X, Sun S, Chen W, et al. Negative feedback regulation of NF- κ B action by CITED2 in the nucleus. *J Immunol* 2011;**186**:539–48.
- 26 Goodman RH, Smolik S. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* 2000;**14**:1553–77.
- 27 Bai L, Merchant JL. A role for CITED2, a CBP/p300 interacting protein, in colon cancer cell invasion. *FEBS Lett* 2007;**581**:5904–10.

- 28 Lee JY, Taub PJ, Wang L, et al. Identification of CITED2 as a negative regulator of fracture healing. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;**387**:641–5.
- 29 Leong DJ, Li YH, Gu XI, et al. Physiological loading of joints prevents cartilage degradation through CITED2. *FASEB J* 2011;**25**:182–91.
- 30 Goldring SR, Goldring MB. Eating bone or adding it: the Wnt pathway decides. *Nat Med* 2007;**13**:133–4.
- 31 Laine CM, Joeng KS, Campeau PM, et al. WNT1 mutations in early-onset osteoporosis and osteogenesis imperfecta. *N Engl J Med* 2013;**368**:1809–16.
- 32 Bennett CN, Longo KA, Wright WS, et al. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;**102**:3324–9.
- 33 Franck H, Meurer T, Hofbauer LC. Evaluation of bone mineral density, hormones, biochemical markers of bone metabolism, and osteoprotegerin serum levels in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 2004;**31**:2236–41.
- 34 Manicassamy S, Reizis B, Ravindran R, et al. Activation of beta-catenin in dendritic cells regulates immunity versus tolerance in the intestine. *Science* 2010;**329**:849–53.
- 35 Nishita M, Yoo SK, Nomachi A, et al. Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase Ror2 is required for Wnt5a-induced cell migration. *J Cell Biol* 2006;**175**:555–62.
- 36 Nomachi A, Nishita M, Inaba D, et al. Receptor tyrosine kinase Ror2 mediates Wnt5a-induced polarized cell migration by activating c-Jun N-terminal kinase via actin-binding protein filamin A. *J Biol Chem* 2008;**283**:27973–81.
- 37 Dhaenens M, Fert I, Glatigny S, et al. Dendritic cells from spondylarthritis-prone HLA-B27-transgenic rats display altered cytoskeletal dynamics, class II major histocompatibility complex expression, and viability. *Arthritis Rheum* 2009;**60**:2622–32.
- 38 Johnson K, Hashimoto S, Lotz M, et al. Interleukin-1 induces pro-mineralizing activity of cartilage tissue transglutaminase and factor XIIIa. *Am J Pathol* 2001;**159**:149–63.
- 39 Hoppe B, Häupl T, Skapenko A, et al. Fibrinogen and factor XIII A-subunit genotypes interactively influence C-reactive protein levels during inflammation. *Ann Rheum Dis* 2012;**71**:1163–9.
- 40 Sarraj B, Ludányi K, Glant TT, et al. Expression of CD44 and L-selectin in the innate immune system is required for severe joint inflammation in the proteoglycan-induced murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2006;**177**:1932–40.

Article 4

SpA-Associated polymorphisms of ERAP1 are correlated with gene expression and protein level of the amino-peptidase

A Talpin* & F Costantino*, I Evnouchidou, A Kadi, R Said-Nahal, A Leboime, N Bonilla, F Letourneur, T Leturcq, Z Ka, P ven Endert, HJ Garchon, G Chiocchia, M Breban

Article en préparation.

Les polymorphismes d'ERAP1 prédisposant à la spondylarthrite (SpA) sont associés à une plus forte expression génique et protéique de cette aminopeptidase

ERAP1 est un gène codant pour une aminopeptidase du réticulum endoplasmique (RE) qui joue un rôle central dans l'immunité. En effet, cette enzyme a pour fonction principale de cliver des peptides de façon à ce qu'ils atteignent une longueur optimale pour leur présentation par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. Des polymorphismes codants d'*ERAP1* ont été associés à la SA pour la première fois en 2007¹⁵². Cette association a ensuite été confirmée par plusieurs études concordantes pour montrer que le polymorphisme rs30187 semble être le principal responsable du signal d'association^{161 162 166 167}. Toutefois, le fort déséquilibre de liaison (DL) existant dans la région génétique environnant *ERAP1* rend difficile l'identification formelle du ou des polymorphisme(s) causal(aux).

L'étude combinatoire de plusieurs polymorphismes codants (rs17482078/rs10050860/rs30187) appartenant à ce gène, a permis de définir un haplotype de susceptibilité à la SpA (CCT), un haplotype neutre (CCC) et un haplotype protecteur (TTC)¹⁶⁸. Des études fonctionnelles de l'enzyme, réalisées à l'aide de peptides synthétiques et de mutants transfectés dans des lignées cellulaires ont mis en évidence que les mutations d'*ERAP1* associées au risque accru de SpA correspondaient à une augmentation de son activité enzymatique^{170 173 174}.

L'objectif de notre travail a été de déterminer dans quelle mesure les polymorphismes d'*ERAP1* associés au risque de SpA pouvaient affecter le taux d'expression du gène et de la protéine dans les cellules de patients et de témoins.

Nous avons tout d'abord recherché s'il existait une association du variant rs30187 avec l'expression du gène *ERAP1* dans les cellules dendritiques dérivées de monocytes (MD-DCs). En effet, nous avons à notre disposition les données des puces d'expression pangénomiques menées sur ces cellules présentatrices d'antigène potentiellement impliquées dans la SpA, chez 9 patients et 10 témoins. Nous avons ainsi mis en évidence une association significative entre le génotype de rs30187 et l'expression d'*ERAP1* dans les MD-DCs restées au repos ou stimulées par du LPS pendant 6 et 24 heures. Nous avons aussi observé que l'expression d'*ERAP1* augmentait avec le nombre d'allèle T porté par l'individu. Cette observation concerne aussi bien les patients que les témoins. L'analyse d'une cohorte de réplication, composée de 13 couples de patients et témoins appariés HLA-B27 positifs et de 18 témoins sains indépendants, provenant d'une deuxième étude transcriptomique sur les MD-DCs a permis de confirmer ces résultats.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés au DL dans la région d'*ERAP1* afin d'identifier le(s) SNPs potentiellement en cause dans l'effet transcriptionnel observé. En effet, le variant rs30187 se situe dans un exon du gène, et induit la substitution d'une lysine en arginine. Pour expliquer l'association de ce variant avec une variation du niveau d'expression transcriptionnelle du gène, il paraissait plausible qu'il soit en DL avec un ou plusieurs polymorphisme(s) situé(s) au sein d'éléments régulateurs. Pour cela, nous avons reconstruit les haplotypes de 354 patients atteints de SA et de 436 témoins à partir de *tag*-SNPs couvrant *ERAP1* et la région des gènes avoisinants. Nous avons identifié une région en fort DL, séparée en deux blocs, l'un incluant *ERAP1*, l'autre *ERAP2* et *LNPEP*. Les SNPs rs17482078 et rs10050860, rapportés précédemment comme responsables d'un signal secondaire dans l'association à la SpA¹⁰⁷, étaient en fort DL avec rs30187.

Par la suite, nous avons donc étudié l'association des trois SNPs, formant l'haplotype rs17482078/rs10050860/rs30187 prédisposant à la SpA, avec l'expression d'*ERAP1*. Pour cela, il a fallu prendre en considération la distribution de ces haplotypes, non équitable entre patients et témoins, puisque l'haplotype CCT paraissait plus fréquent chez les patients et le TTC plus fréquent chez les témoins. Nous avons donc utilisé un score attribué à chaque

haplotype reflétant leur association à la SpA. L'utilisation de ce score a permis d'observer une association très significative, à tous les temps de stimulation, entre le score d'association haplotypique à la SpA et le taux d'ARNm, indépendamment de la maladie et du statut HLA-B27. Nous avons également identifié une forte corrélation de l'expression d'*ERAP1* entre les individus appariés de la cohorte de réplique porteurs des mêmes haplotypes ($p = 2,2 \times 10^{-6}$; $\rho = 0.86$), alors qu'elle était absente entre ceux ne partageant pas les mêmes haplotypes ($p = 0,94$; $\rho = -0.01$).

Afin de connaître l'impact des haplotypes sur l'expression de la protéine ERAP1, nous avons étudié des lignées EBV immortalisées provenant de patients homozygotes pour les haplotypes protecteurs, neutres ou de susceptibilité vis à vis de la SpA. Nous avons tout d'abord vérifié qu'il existait bien une corrélation entre les haplotypes portés et le niveau d'expression des ARNm d'*ERAP1*. Nous avons alors cherché à savoir si la quantité de protéines produites dépendait de l'haplotype détenu. En effet, ERAP1 était produite en plus grande quantité dans les lignées porteuses de l'haplotype à risque que dans celles ayant les haplotypes protecteurs ou neutres.

Enfin, une exploration des conséquences fonctionnelles potentielles des changements d'expression d'*ERAP1*, a été menée. Nous avons mesuré l'expression des molécules du CMH de classe I et du HLA-B27 à la surface des MD-DCs et des lignées EBV. Aucune corrélation n'a été observée entre l'expression de ces molécules et celle d'*ERAP1*, dans les deux types cellulaires.

L'ensemble de ces données démontre qu'il existe une forte association entre l'haplotype d'*ERAP1* prédisposant à la SpA, une expression accrue des ARNm de ce gène et une production augmentée de sa protéine. Il reste cependant à comprendre en quoi ces modifications peuvent influencer la susceptibilité à la SpA.

SpA-Associated Polymorphisms of ERAP1 are Correlated with Gene Expression and Protein Level of the Amino-peptidase

A Talpin^{1*} & F Costantino^{1*}, I Evnouchidou², A Kadi¹, R Said-Nahal³, A Leboime³, N Bonilla¹, F Letourneur¹, T Leturcq¹, Z Ka¹, P ven Endert², HJ Garchon^{1,4,5}, G Chiochia^{4,5}, M Breban^{1,3,5}

¹*Institut Cochin, Université Paris Descartes, INSERM U1016, CNRS (UMR 8104), Paris, France.*

²*Hôpital Necker, INSERM U1013, Paris, France.*

³*Rheumatology Division, Ambroise Paré Hospital (AP-HP), Boulogne-Billancourt, France.*

⁴*Genetics Division, Ambroise Paré Hospital (AP-HP), Boulogne-Billancourt, France.*

⁵*UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, Versailles Saint Quentin en Yvelines University, Montigny-le-Bretonneux, France*

Address reprint requests and correspondence to:

Maxime Breban, M.D., Ph.D., Rheumatology Division

Hopital Ambroise Pare, 9 ave Charles de Gaulle, 92100, Boulogne, France

Ph: 33-(0)149 095 672; Fax: 33-(0)149 095 865

E-mail: maxime.breban@apr.aphp.fr

Keywords: ankylosing spondylitis, spondyloarthritis, ERAP1

INTRODUCTION

Spondyloarthritis (SpA) is a frequent form of chronic inflammatory arthritis with an estimated life-time risk around 0.5% in adult Caucasian population (1). It comprises several closely related disorders which share clinical and imaging features as well as genetic predisposition (2,3). Familiality and heritability of SpA are high and involve multiple genetic factors among which HLA-B27 allele plays a prominent role (4).

The first genome-wide association study (GWAS) performed in ankylosing spondylitis (AS), the prototypical form of SpA, revealed a significant association of several single-nucleotide polymorphisms (SNPs) situated in the endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 gene (*ERAPI*) with the disease (5). Such association were subsequently confirmed in independent Caucasian and Asian cohorts of AS (6–8) as well as with the whole group of SpA, beyond AS (9,10). Interestingly, the association between *ERAPI* polymorphisms and SpA seems to be restricted to HLA-B27 positive disease (10–12). More recently, new associations have been described between AS and three other aminopeptidases (*LNPEPP*, *ERAP2* and *NPEPPS*) (12).

The *ERAPI* gene located on chromosome 5q15 encodes an aminopeptidase expressed in the endoplasmic reticulum (ER). Its main function is to trim peptides to the optimal length for binding to major histocompatibility class I (MHC-I) molecules (13,14). It has also been involved in the shedding of cell surface pro-inflammatory cytokine receptors (TNF-R1, IL6-R, IL1-R2) (15–17). However this sheddase activity remains debated, since *erap1* knock-out mice exhibit similar levels of soluble TNF-R and IL6-R than wild-type animals (11). Moreover AS-associated *ERAPI* polymorphisms seem not to influence the serum levels of soluble cytokine receptors among patients with AS (18). These results together with a restriction of the association of *ERAPI* with HLA-B27-positive disease suggest that the

pathological effects of *ERAPI* in AS could be related to its trimming peptides function in the ER with potential consequences on antigen presentation by MHC class I molecules.

Due to an extensive linkage disequilibrium (LD) existing within and surrounding the *ERAPI* gene locus, it appears difficult to identify with certainty causal polymorphism(s) (19). A two-mutation model has been proposed by *Evans et al.* with a primary effect due to rs30187 and a secondary effect due to either rs10050860 or rs17482078 (11). This model is fully consistent with studies showing a strongly significant association of an haplotype combining these 3 polymorphisms, with AS in Canada and with SpA in France and Belgium (6,9). However functional consequences of this haplotype and their relevance for SpA susceptibility remain to be elucidated.

Several studies using recombinant ERAP1 mutants and synthetic peptides showed a decreased enzymatic activity of ERAP1 in the presence of AS-protective alleles of rs30187 and rs17482078 (11,20–24). It has been suggested that the reduced activity observed with rs30187 protective allele was linked to modifications of ERAP1 structure (20,25). Another hypothesis is that *ERAPI* polymorphisms could affect gene expression level (19). The aim of the present work was to investigate *in vivo* the consequences of the SpA-associated polymorphisms on ERAP1 transcript expression, protein level and enzymatic activity, in monocytes-derived dendritic cells (MD-DCs), key antigen-presenting cells potentially involved in SpA pathogenesis (26–30).

PATIENTS & METHODS

Patients and control cohorts

All participants of the study gave written informed consent and the study has been approved by the local ethic committee of Ile-de-France XI, Poissy-Saint-Germain Hospital (Saint-Germain-en-Laye, France). Diagnosis was made according to the following internationally validated classification criteria: Amor's and/or European Spondylarthropathy Study Group criteria for SpA (31,32) and modified New York criteria for AS (33). Even if they were not developed at the time of recruitment, the Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial and peripheral SpA were applied *a posteriori* whenever possible (34,35). Detailed clinical characteristics of all the enrolled patients are provided in **Supplementary table 1**.

ERAP1 expression study

ERAP1 expression was evaluated in two independent case-controls cohorts. The “discovery cohort” included 9 HLA-B27 positive patients with axial SpA and 10 healthy blood donors. The “replication cohort” consisted of 13 SpA-discordant HLA-B27 positive sib-pairs (one HLA-B27+ affected sibling and one HLA-B27+ healthy sibling) and 18 additional independent healthy controls (10 HLA-B27+ and 11 HLA-B27-).

Epstein-Barr virus (EBV) immortalized B lymphoblastoid cell lines

For EBV lymphoblastoid immortalization, we used cells from 7 SpA patients selected on the basis of homozygosity for rs17482078/rs10050860/rs30187 haplotype.

Haplotype reconstruction

Haplotype reconstruction in and around *ERAP1* was performed with genotype data from French samples included in the IGAS ImmunoChip Study (12), representing 354 AS patients and 346 controls.

Cell isolation and culture

Blood sample and monocyte isolation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from 50 mL of blood by gradient separation on Ficoll density gradient centrifugation (STEMCELL Technologies). Monocytes were obtained by magnetic cell sorting using anti-CD14 monoclonal antibody coated beads (BD Imag). Sorted monocytes were morphologically homogeneous with 99% of CD14⁺ cells, as determined by flow cytometry.

MD-DCs generation and stimulation

To obtain MD-DCs, monocytes were further cultured for 6 days in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 500 U/mL recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF) and 500 U/mL rhIL-4 (AbCys S.A., France).

Then, the MD-DCs were stimulated or not with lipopolysaccharide from *E. coli* (LPS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at a concentration of 100 ng/mL for the last 6 or 24 hours of culture (further referred to as time-points H0, H6 and H24).

EBV-cell lines generation

B lymphoblastoid cell lines were established from EBV-transformed lymphocytes according to standard protocol, and grown at 37°C in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin.

Genotyping and haplotypes reconstruction

Genotyping of rs30187, rs17482078 and rs10050860

Rs30187, rs17482078 and rs10050860 genotypes were obtained through sequencing. Briefly, we amplified the three amplicons (one for each SNP) from 200 ng of genomic DNA. Approximately 10 to 30 ng of purified products was sequenced on ABI3730xl capillary

sequencers (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) and analyzed using SeqScape software version 2.5 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

Haplotypes reconstruction

Genotype data were obtained through Immunochip custom array (Illumina, San Diego, California, USA), as part of the International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium study (12). Haplotypes were reconstructed with FastPHASE (36) with a subset of 126 SNPs selected on the following criteria: located from 95.999 to 96.387 Mb of the p-telomere of the chromosome 5 (including *CAST*, *ERAP1*, *ERAP2* and *LNPEP*); minor allelic frequency (MAF) >0.2 and pairwise $r^2 > 0.8$. Linkage disequilibrium for reconstructed haplotypes were determined using Haploview programme V4.2 (37).

ERAP1 mRNA expression

Total RNA was isolated with RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. *ERAP1* mRNA expression level was then evaluated with microarray hybridization. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was also performed in the discovery Cohort's MD-DCs for technical validation.

Gene expression microarray

For microarray hybridization, RNA was reverse transcribed, converted to biotinylated complementary RNA using standard Affymetrix protocol (Affymetrix, Santa Clara, CA) and hybridized to the Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0 ST Array, following a routine protocol established by the genomic platform of Cochin Institute. Raw data were then transformed by Robust Multichip Analysis (RMA) (38). *ERAP1* global gene expression data were then extracted from the whole expression dataset.

qRT-PCR

For qRT-PCR, RNA was retrotranscribed using Superscript II (Invitrogen). A 147 bp region comprised in all the known protein coding ERAP1 transcripts was amplified with the following primers (Forward (F): TTTGAACTTGGCTCATCTTCC; Reverse (R): AATTGTCTGTTGGACACAACG) and then quantified using the SYBR green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) and the 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Gene expression data were computed with the $\Delta\Delta Cq$ method, using three housekeeping genes: *RPL30* (F: CCTAAGGCAGGAAGATGGTG; R: AATGACCAATTTTCGCTTTGC), *β -ACT* (F: GGACTTCGAGCAAGAGATGG; R: AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG) and *GAPDH* (F: CCTCAACGACCACTTTGTCA; R: GAGGGTCTCTCTTCCTCTTGT).

ERAP1 protein expression

Cells were lysed on ice in lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.8, 1% Nonidet P-40) containing 1 tablet of protease inhibitor and 1 of phosphatase inhibitors (Complete and PhosSTOP, Roche). Proteins (28 μ g equally diluted in a reducing Laemli Buffer and heated at 95° for 5 minutes) were separated by 7.5% SDS PAGE (7.5% mini-PROTEAN[®] TGX[™] precast polyacrylamide gels, Biorad) and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. After 1 hour of blocking with PST-T (PBS 1X, 0.01% Tween 20) containing 5% dry milk, membranes were incubated with the monoclonal antibody (mAb) directed against ERAP1 (Abcam) diluted at 1:2000 for 2 hours at RT and with HRP-conjugated secondary antibody (goat anti-rabbit IgG, Dako) diluted at 1:10000 for 1 hour at RT. Immunostainings of the blots with an anti-beta-actin mAb (Santa Cruz Biotechnology) served as loading controls. Labeled proteins were detected using enhanced chemiluminescence (ECL) reagents (Amersham Biosciences) and the signals read with the Fusion FX7 system[®] (Vilber

Lourmat). Band intensities were quantified by densitometry analysis using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

MHC class I and HLA-B27 surface expression

For assessment of MHC class I and HLA-B27 proteins expression at the cell surface, MD-DCs were incubated for 20 minutes with FITC-labelled anti-human mAbs IgG, HLA-I and HLA-B27 (BD Bioscience), at 4°C. Then, cells were washed with PBS 1X and fixed with 4% formaldehyde. The analyses were performed by flow cytometry on a FACS canto II apparatus (BD Biosciences).

Statistical analysis

Multivariate analysis of variance (MANOVA) was used to test association between ERAP1 gene expression in samples and genotypes / haplotypes, disease status and HLA-B27 (only in the replication cohort) at all stimulation time-points. In case of statistical significance ($p < 0.05$), post-hoc one-way analyses of variance (ANOVA) were performed at each stimulation time-point.

Pairwise correlations between ERAP1 expression levels in sib-pairs were tested using the non-parametric Spearman test.

One-way ANOVA was used to test differential expression level of ERAP1 gene or protein in EBV cell lines according to rs17482078/rs10050860/rs30187 haplotypes.

RESULTS

Association between rs30187 genotype and *ERAP1* gene expression

The primary association signal of *ERAP1* with AS susceptibility is assumed to be borne by rs30187. Thus, we first studied the influence of this SNP on *ERAP1* gene expression. In the discovery cohort, rs30187 genotypes were significantly associated with *ERAP1* expression in MD-DCs, at each stimulation time-point, as determined by micro-arrays with an additive effect ($p = 9.8 \times 10^{-5}$). Indeed, expression levels increased with the number of AS-susceptibility T alleles carried (**Figure 1**). This result was confirmed by RT-qPCR on the same samples ($p = 3.1 \times 10^{-5}$; **Supplementary figure 1**) and further replicated in a second cohort ($p = 6.8 \times 10^{-11}$; **Figure 1**). Such association was independent of disease or HLA-B27 statuses. Such association with rs30187 genotypes was neither observed for *ERAP2* nor *LNPEP* expression levels ($p = 0.54$ and $p = 0.24$, respectively; **Supplementary figure 2**). Moreover, we did not find any association between other *ERAP1* SpA-associated polymorphisms, i.e. rs17482078 (**Supplementary figure 3**) or rs10050860 (data not shown) and *ERAP1* transcription levels ($p = 0.26$ for both SNPs) that were in complete LD, in the discovery cohort.

LD determination and haplotypes reconstruction around *ERAP1* locus

The major protective non-ancestral allele of rs30187 results in the substitution of a lysine for an arginine (K528R). As regulatory variants are rarely located in coding regions, rs30187 may be in LD with one or several other variants located in regulatory elements. To examine this hypothesis, we reconstructed phased haplotypes in a collection of 354 AS patients and 346 controls, by using a dense set of tag-SNPs covering the region surrounding *ERAP1*, from *CAST* to *LNPEP* genes. A high LD was observed throughout this region with two major blocks, one including *ERAP1* and the other including *ERAP2* and *LNPEP* (**Figure 2**). Consequently, numerous variants could be responsible of *ERAP1* gene expression variation.

ERAPI genetic studies have suggested that there is a secondary association signal with AS, due either to rs10050860 or to rs17482078. A high LD was observed between rs30187 and these two SNPs (**Figure 2**) combining in 3 major rs17482078/rs10050860/rs30187 haplotypes: T/T/C (20.1%), C/C/C (40.1%) and C/C/T (39.0%). Haplotypes extending beyond these markers were highly conserved with marked differences between each other (**Supplementary figure 4**). Thus studying rs17482078/rs10050860/rs30187 haplotypes rather than rs30187 alone could improve the detection of gene expression variations dependent on genetic sequence.

Association between rs17482078/rs10050860/rs30187 haplotypes and *ERAPI* gene expression

We have previously reported (9) that rs17482078/rs10050860/rs30187 haplotypes were not equally distributed between patients and controls: C/C/T haplotype was more frequent in patients, T/T/C was overrepresented in controls, whereas C/C/C was evenly distributed. Accordingly, we attributed a score to each haplotype corresponding to its level of association with AS (“protective” T/T/C=1; “neutral” C/C/C=2 and “susceptibility” C/C/T=3). Assuming additive effect, we inferred a “risk score” for each subject, for whom *ERAPI* expression level was evaluated, corresponding to the sum of its 2 haplotypes scores. In both cohorts, we observed a highly significant positive correlation between the risk score and *ERAPI* expression levels in monocytes and in MD-DCs either stimulated or not ($p = 0.001$ and $p = 3.4 \times 10^{-8}$ in discovery and replication cohorts, respectively; **Figure 3**) without any detectable influence of disease or HLA-B27 statuses ($p < 0.05$).

Transcript abundances are known to be largely heritable (39). In the 13 sib-pairs included in the replication cohort, we observed a significant correlation of *ERAPI* expression between siblings ($p = 7.2 \times 10^{-4}$; $\rho = 0.45$). Interestingly, in the 6 sib-pairs haplo-identical for

rs17482078/rs10050860/rs30187, this correlation was dramatically high ($p = 2.2 \times 10^{-6}$; $\rho = 0.86$) whereas there was no correlation in the 7 sib-pairs carrying divergent haplotypes ($p = 0.94$; $\rho = -0.01$) (**Figure 4**).

***ERAP1* mRNA level and protein level are associated with rs17482078/rs10050860/rs30187 haplotype in EBV cell lines**

To further investigate the functional role of *ERAP1* haplotypes at the transcription and protein levels, we studied HLA-B27⁺ patients homozygous for each haplotype: 3 carrying the C/C/T susceptibility haplotype, 3 carrying the C/C/C neutral one and 1 carrying the T/T/C protective one. Lymphoblastoid cells from these patients were immortalized with EBV.

In these cell lines, we observed correlation between rs17482078/rs10050860/rs30187 haplotype and *ERAP1* gene expression, as in the foregoing studies on monocytes and MD-DCs. In addition, *ERAP1* protein level in EBV cell lines harboring the risk haplotype was 2 and 1.5-folds higher than in those harboring the protective and the neutral ones, respectively. All these results are summarized in **Figure 5**.

Consequences of *ERAP1* expression on MHC class I surface expression.

To investigate putative consequences of *ERAP1* expression changes on antigen-presentation, we measured MHC class I and HLA-B27 expression at the MD-DCs surface. No correlation was observed between *ERAP1* expression level and MHC class I or HLA-B27 expression, whatever the stimulation time-point.

DISCUSSION

Genetic association studies have highlighted the importance of *ERAPI* in SpA susceptibility. However, few mechanisms have been hypothesized to explain the consequences of SpA-associated polymorphisms of this gene. We report here for the first time that ERAP1 mRNA and protein expression was increased in subjects harboring SpA-susceptibility polymorphisms, with consequences on ERAP1 aminopeptidase activity.

Except for one study (23), all others have investigated functional consequences of SpA-associated SNPs of ERAP1 one by one, the most often by using *in vitro* models based on transfection on the mutated allele in cell lines (11,20,22). Reconstruction of haplotypes surrounding *ERAPI* in a large case-control cohort allowed us to identify a high linkage disequilibrium in this region as already described by *Harvey et al.* (19). Moreover *Evans et al.* have suggested that the pattern of association is not sufficiently characterized by a single SNP (11), as confirmed by several studies demonstrating associations between *ERAPI* haplotypes and SpA (6,7,9). In particular, *Kadi et al.* have identified three rs17482078/rs10050860/rs30187 haplotypes differentially associated with SpA: -TTC haplotype was associated with a lower disease risk, -CCC with a neutral risk and -CCT with an increased risk (9). Thus, we decided to study haplotype effects to better understand polymorphisms consequences on disease susceptibility.

Our results demonstrated that *ERAPI* corresponded to an expression quantitative trait locus (eQTL) under the cis-regulatory control of the rs17482078/rs10050860/rs30187 haplotype. Such control has already been suggested for several *ERAPI* SNPs in cell lines but never in primary cells (40). Recently, *Seregin et al.* obtained different results with no difference in *ERAPI* gene expression between two rs17482078/rs10050860/rs30187 (-TTC and -CCT) (24). However these results were obtained in transfected cell lines with overexpression of *ERAPI* and thus could not be generalized to normal cell conditions.

Furthermore, we found that *ERAP1* haplotypes affected protein abundance. Thus *ERAP1* can also be considered as a protein quantitative trait locus (pQTL). One study has previously reported an increased expression of ERAP1 protein in AS patients, as compared to controls (41). It could be related to a non-equivalent distribution of *ERAP1* haplotypes between cases and controls in that particular study, as we did not show any independent effect of disease status on *ERAP1* expression.

Interestingly, *ERAP1* gene expression seemed to be well correlated to SpA predisposition in our study. Indeed, expression was low in low risk haplotype carriers and high in high risk ones. Noteworthy, a higher aminopeptidase activity of ERAP1 has also previously been observed as associated with AS predisposing alleles. Indeed, *Evans et al.* showed a higher trimming activity of susceptibility alleles of rs30187 and rs17482078 (11). This effect was confirmed for rs30187 by *Evnouchidou et al.* who also hypothesized that the catalytic activity variation depends on a specific substrate and its concentration (22). Lys528Arg polymorphism (rs30187) may also affect enzymatic activity through modification of the tridimensional structure of ERAP1 with an altered transition from the open (inactive) to the closed (active) form of the enzyme (20). The increased enzymatic activity observed with *ERAP1* susceptibility haplotypes may also be the consequence of an increased expression of the transcripts and thereby of the protein. Thus it would be very interesting to assess simultaneously ERAP1 transcript levels, protein levels and enzymatic activity in cells harbouring rs17482078/rs10050860/rs30187 haplotypes differentially associated with SpA.

Contrary to *Frucci et al.*, we did not find any correlation between HLA class I nor HLA-B27 cell surface levels and *ERAP1* expression (42). Inversely, *Seregin et al.* showed recently a decreased HLA-B27 cell surface expression in cells transfected with SpA-associated polymorphisms of ERAP1 (24). *Garcia-Medel et al.* demonstrated that ERAP1

polymorphisms may also affect HLA-B27 peptidome (43). However functional consequences of ERAP1 polymorphisms must be studied in *in vivo* conditions.

In conclusion, our results demonstrate a strong correlation between SpA susceptibility conferred by rs17482078/rs10050860/rs30187 haplotype and *ERAP1* expression level. Increased gene expression observed in high risk haplotype carriers led to increased protein expression. Consequences of this higher ERAP1 protein expression remain to be elucidated, especially further studies assessing enzymatic activity are needed.

TABLES AND FIGURES

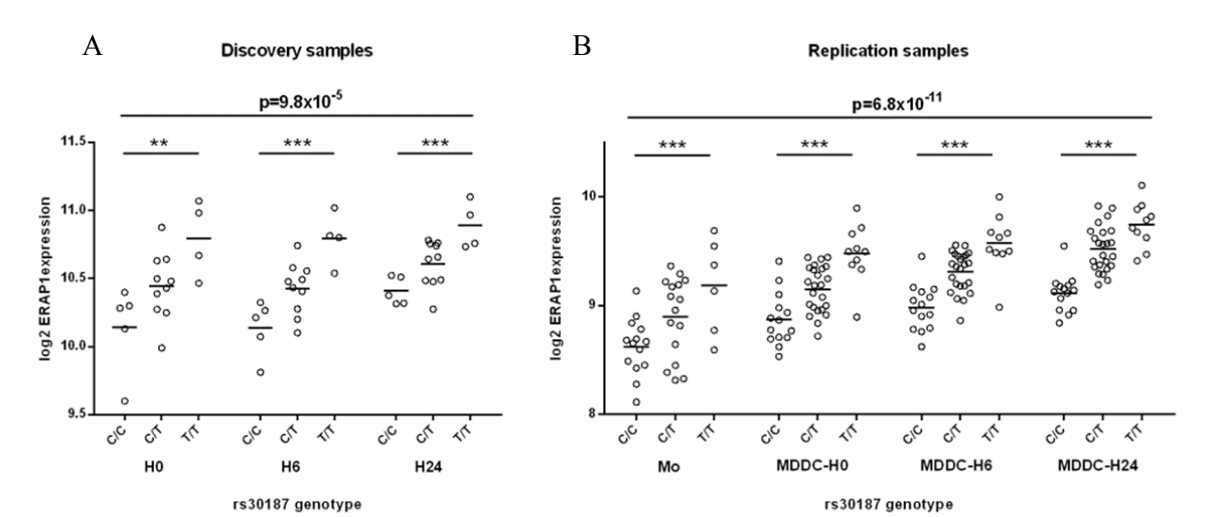


Figure 1. ERAP1 gene expression according to rs30187 genotype assessed by micro-arrays in the discovery (A) and replication (B) samples. The x axis of the plots represents cell type (monocytes or MD-DCs) and stimulation time-points (H0, H6, H24) and the y axis shows the log2 of gene expression. * P <0.05, ** P <0.01, *** P<0.001.

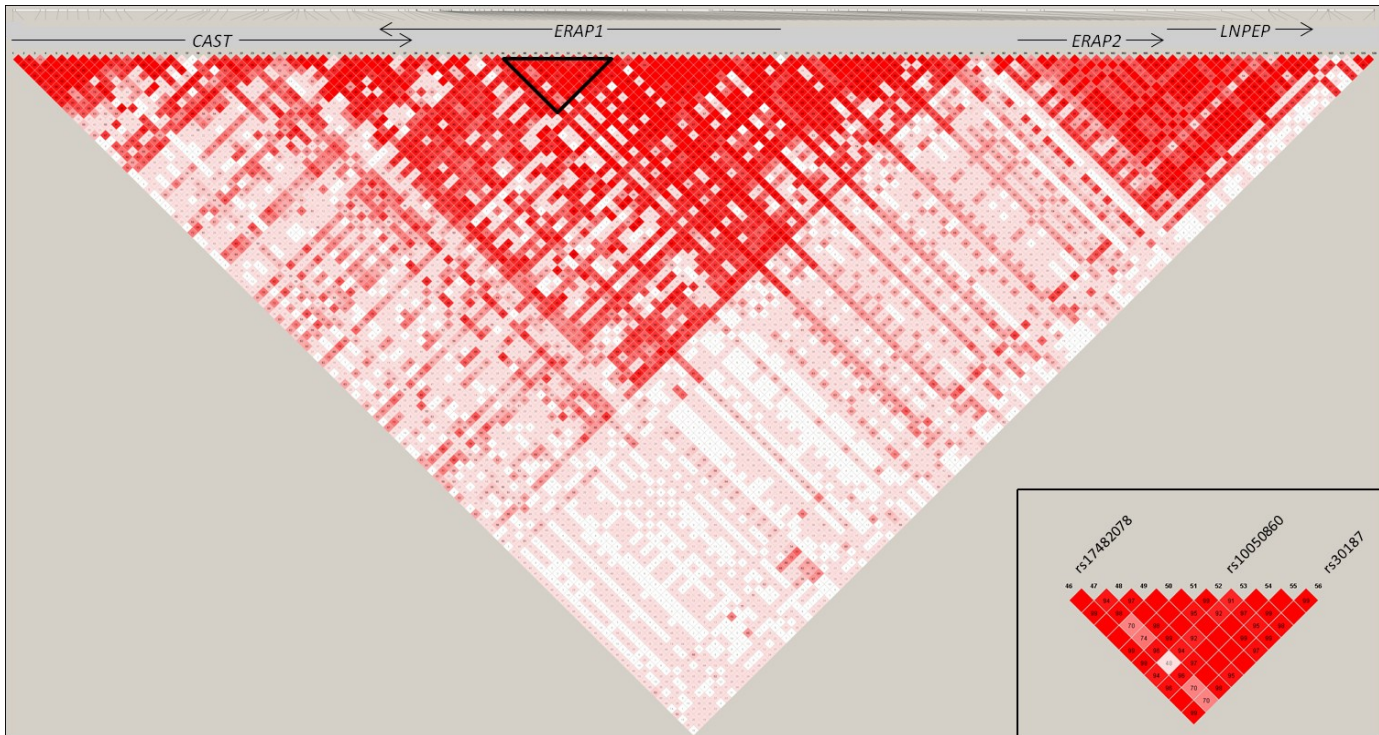


Figure 2. Linkage disequilibrium (LD) plot covering the region surrounding *ERAP1*, and the rs17492078/rs10050860/rs30187 haplotype in the lower right corner. The darker the boxes, the stronger the LD. The numbers in the box represent D' values.

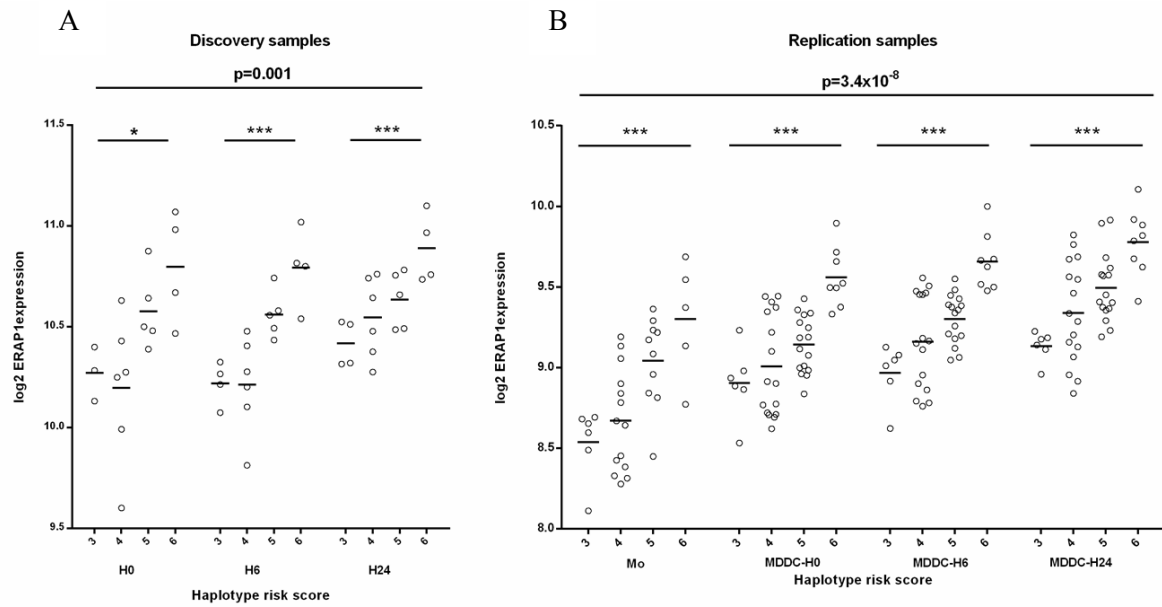


Figure 3. *ERAP1* gene expression assessed by micro-arrays, according to haplotype risk score in discovery (A) and replication (B) cohorts. The x axis of the plots represents haplotype risk scores (3 to 6) according to cell type (monocytes or MD-DCs) and stimulation time-point (H0, H6, H24) and the y axis shows the log₂ of gene expression. * P <0.05, ** P <0.01, *** P<0.001.

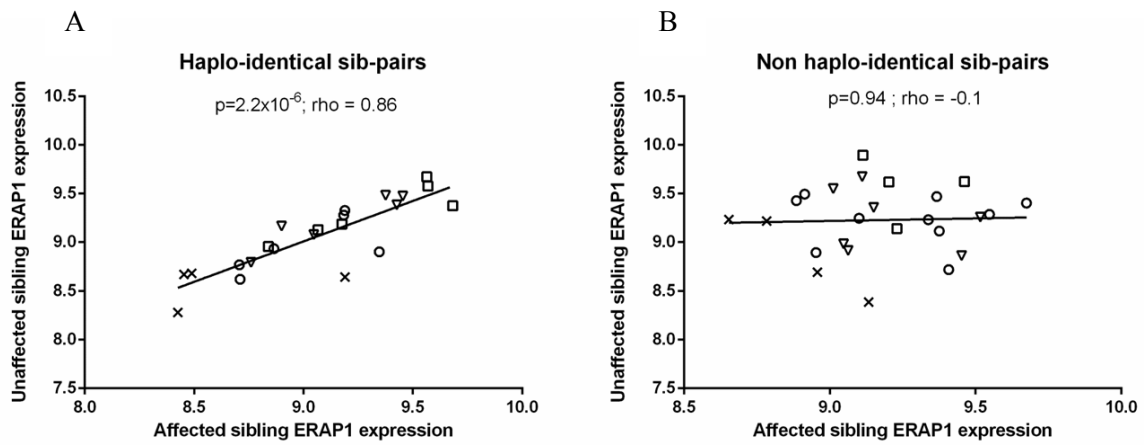


Figure 4. Correlation of *ERAP1* expression levels between affected siblings and unaffected siblings in haplo-identical (A) or haplo-divergent (B) pairs. Each point represents a sib-pair at one stimulation time-point (cross=J0; circle=H0; triangle=H6 and square=H24).

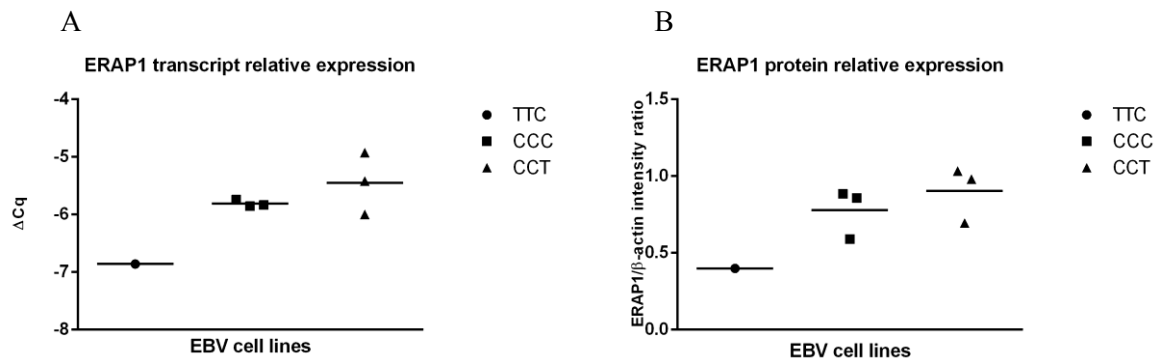
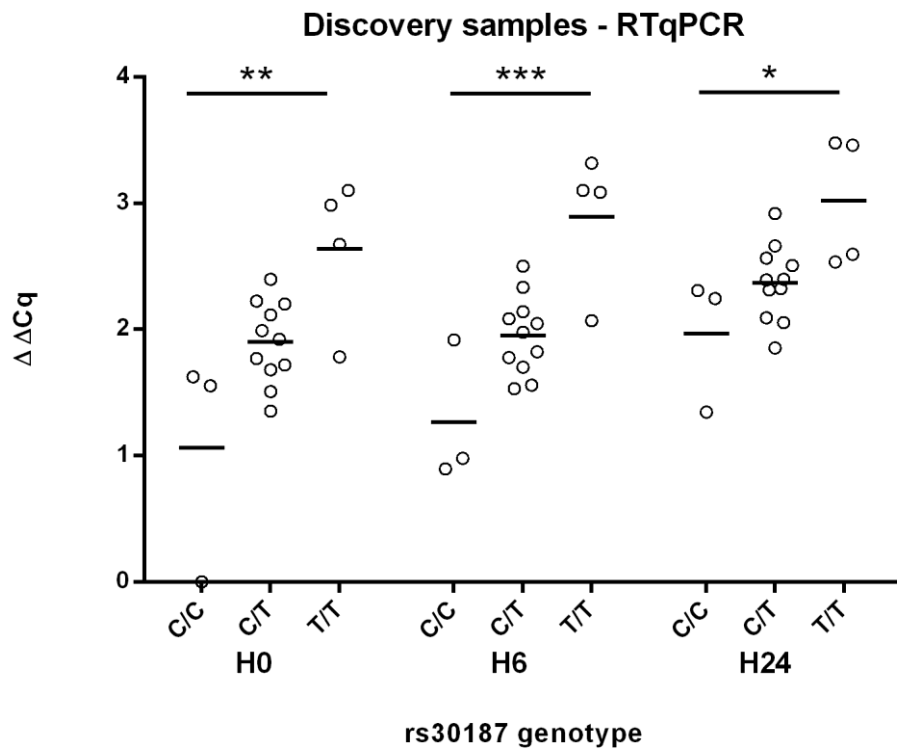


Figure 5. ERAP1 transcript (A) and protein (B) relative expression in EBV cell lines harbouring rs17482078/rs10050860/rs30187 haplotypes: 3 carrying the C/C/T susceptibility haplotype, 3 carrying the C/C/C neutral one and 1 carrying the T/T/C protective one. The x axis of the plots represents EBV cell types and the y axis shows the $\Delta\Delta Cq$ for ERAP1 transcript relative expression and ERAP1/ β actin intensity ratio for ERAP1 protein relative expression.

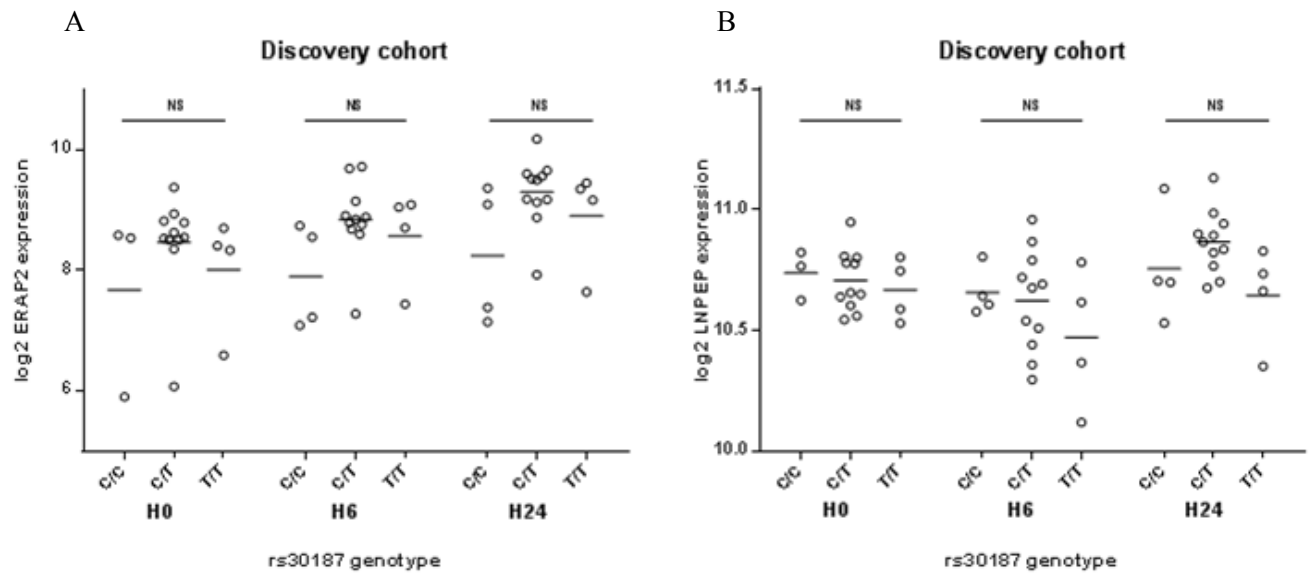
Supplementary table 1. Clinical characteristics of SpA patients in the study

Characteristic	Discovery cohort (n = 9)	Replication cohort (n = 13)	EBV cell line (n = 7)	AS Immunochip (n = 354)
Age in years, mean ± SD	48.1 ± 7.9	47.0 ± 7.6	48.1 ± 16.2	48.1 ± 14.2
Disease duration in years, mean ± SD	15.1 ± 5.2	22.5 ± 7.6	21.2 ± 15.0	24.5 ± 13.2
Sex ratio, men:women (%)	5:4 (55.6/44.4)	7:6 (53.8/46.2)	4:3 (57.1/42.9)	219:135 (61.9/38.1)
<i>HLA-B27</i> positivity, %	100	100	100	91.2
Axial manifestations				
- Inflammatory back pain, %	100	100	100	100
- Radiographic sacroiliitis, %*	88.9	61.5	100	100
Peripheral manifestations				
- Peripheral arthritis, %	22.2	38.5	67	45.3
- Peripheral enthesitis, %	66.7	84.6	50	73.7
Extra-articular manifestations				
- Uveitis, %	33.3	23.1	67	41.1
- Psoriasis, %	33.3	7.7	0	26.0
- Inflammatory bowel disease, %	0	0	0	8.6
Current treatment				
- NSAID, %	55.6	66.7**	NA	NA
- Anti-TNF therapy, %	22.2	0**	NA	NA
- None, %	22.2	22.2**	NA	NA

The registered manifestations correspond to those present at the time of examination, or retrieved from past-medical history. Inflammatory bowel disease: Crohn's disease or ulcerative colitis; NSAID : Non-Steroidal Anti Inflammatory Drugs ; NA: not available; * Refers to radiographic sacroiliitis ≥ grade II bilateral or grade III unilateral ** treatment data available for 9 patients

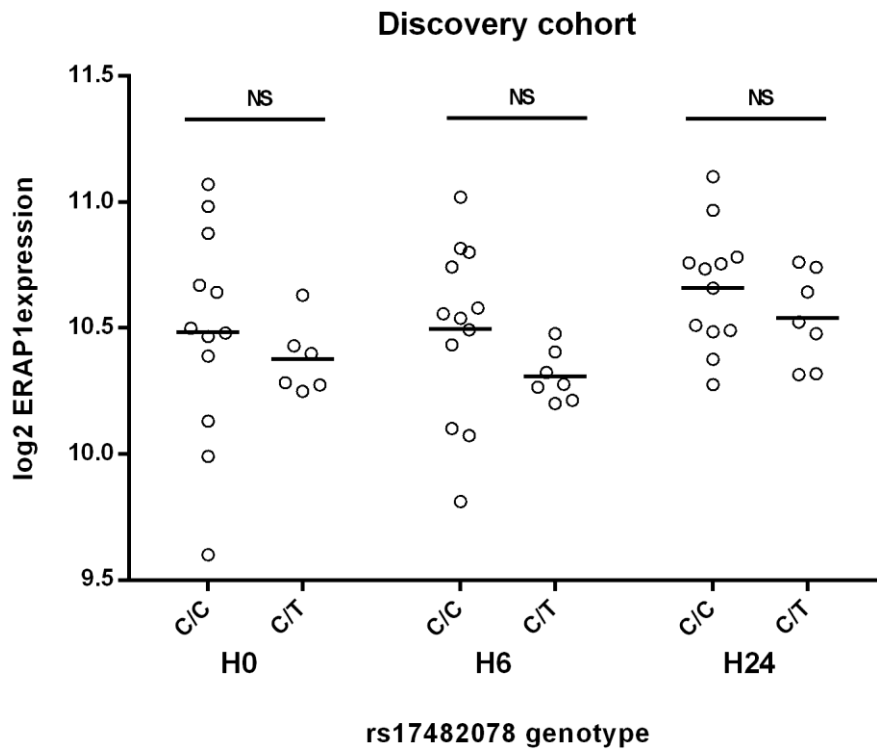


Supplementary figure 1. ERAP1 gene expression assessed by RT-qPCR, according to rs30187 genotype in the discovery samples. The x axis of the plots represents cell type (monocytes or MD-DCs) and stimulation time-points (H0, H6, H24) and the y axis shows the $\Delta\Delta Cq$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

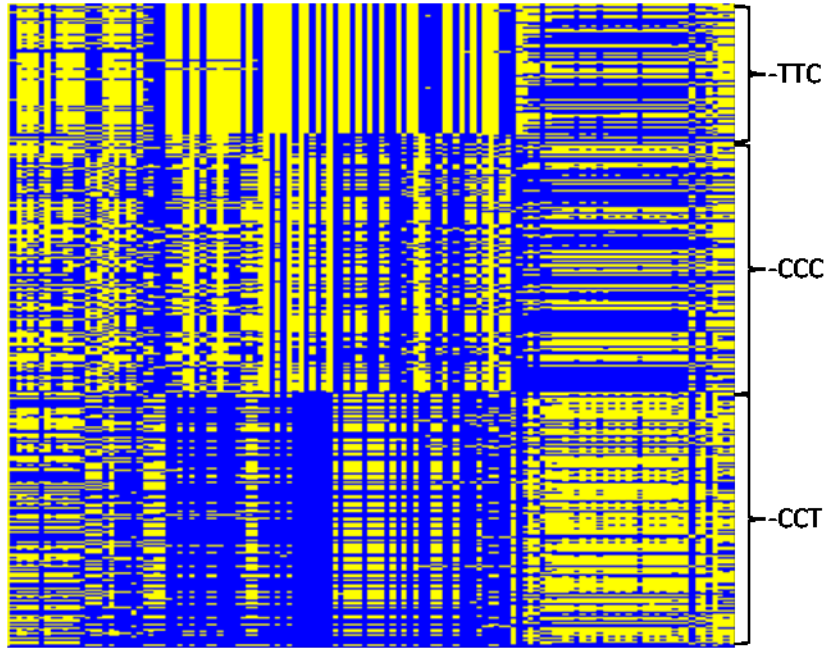


Supplementary figure 2. *ERAP2* (A) and *LNPEP* (B) genes expression, assessed by micro-arrays, according to rs30187 genotype in the discovery cohort The x axis of the plots represents MD-DCs stimulation time-points (H0, H6, H24) and the y axis shows the log₂ gene expression.

MD-DCs: monocyte-derived dendritic cells; NS: non-significant



Supplementary figure 3. *ERAP1* gene expression assessed by micro-arrays, according to rs17482078 genotype, in the discovery cohort. The x axis of the plots represents MD-DCs stimulation time-points (H0, H6, H24) and the y axis shows the log2 gene expression; NS: non-significant



Supplementary figure 4. Representation of phased reconstructed haplotypes. Each line represents one haplotype and each column represents a tag-SNP. All the haplotypes are compared to a randomly selected reference haplotype. Blue cases correspond to SNPs with the same allele as the reference haplotype, yellow ones to SNPs with alternative allele.

REFERENCES

1. Costantino F, Talpin A, Saïd-Nahal R, Goldberg M, Henny J, Chiocchia G, et al. Life-time Prevalence of Spondyloarthritis in Reference to HLA-B27 in a French Retired Worker Population: Results of the GAZEL Cohort. *Ann Rheum Dis* 2013 (*in revision*).
2. Saïd-Nahal R, Miceli-Richard C, Berthelot JM, Duché A, Dernis-Labous E, Blévec G Le, et al. The familial form of spondylarthropathy: a clinical study of 115 multiplex families. Groupe Français d'Etude Génétique des Spondylarthropathies. *Arthritis Rheum* 2000;43:1356–1365.
3. Saïd-Nahal R, Miceli-Richard C, D'Agostino MA, Dernis-Labous E, Berthelot JM, Duché A, et al. Phenotypic diversity is not determined by independent genetic factors in familial spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 2001;45:478–484.
4. Breban M, Miceli-Richard C, Zinovieva E, Monnet D, Saïd-Nahal R. The genetics of spondyloarthropathies. *Jt Bone Spine Rev Rhum* 2006;73:355–362.
5. Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, Deloukas P, Duncanson A, et al. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet* 2007;39:1329–1337.
6. Maksymowych WP, Inman RD, Gladman DD, Reeve JP, Pope A, Rahman P. Association of a specific ERAP1/ARTS1 haplotype with disease susceptibility in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2009;60:1317–1323.
7. Tsui FWL, Haroon N, Reveille JD, Rahman P, Chiu B, Tsui HW, et al. Association of an ERAP1 ERAP2 haplotype with familial ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2010;69:733–736.
8. Davidson SI, Wu X, Liu Y, Wei M, Danoy PA, Thomas G, et al. Association of ERAP1, but not IL23R, with ankylosing spondylitis in a Han Chinese population. *Arthritis Rheum* 2009;60:3263–3268.
9. Kadi A, Izac B, Saïd-Nahal R, Leboime A, Praet L Van, Vlam K de, et al. Investigating the genetic association between ERAP1 and spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 2013;72:608–613.
10. Cherciu M, Popa LO, Bojinca M, Dutescu MI, Bojinca V, Bara C, et al. Functional variants of ERAP1 gene are associated with HLA-B27 positive spondyloarthritis. *Tissue Antigens* 2013.
11. Evans DM, Spencer CCA, Pointon JJ, Su Z, Harvey D, Kochan G, et al. Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nat Genet* 2011;43:761–767.
12. International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium (IGAS), Cortes A, Hadler J, Pointon JP, Robinson PC, Karaderi T, et al. Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat Genet* 2013.

13. Saric T, Chang S-C, Hattori A, York IA, Markant S, Rock KL, et al. An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol* 2002;3:1169–1176.
14. York IA, Chang S-C, Saric T, Keys JA, Favreau JM, Goldberg AL, et al. The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat Immunol* 2002;3:1177–1184.
15. Cui X, Hawari F, Alsaaty S, Lawrence M, Combs CA, Geng W, et al. Identification of ARTS-1 as a novel TNFR1-binding protein that promotes TNFR1 ectodomain shedding. *J Clin Invest* 2002;110:515–526.
16. Cui X, Rouhani FN, Hawari F, Levine SJ. An aminopeptidase, ARTS-1, is required for interleukin-6 receptor shedding. *J Biol Chem* 2003;278:28677–28685.
17. Cui X, Rouhani FN, Hawari F, Levine SJ. Shedding of the type II IL-1 decoy receptor requires a multifunctional aminopeptidase, aminopeptidase regulator of TNF receptor type 1 shedding. *J Immunol Baltim Md 1950* 2003;171:6814–6819.
18. Haroon N, Tsui FWL, Chiu B, Tsui HW, Inman RD. Serum cytokine receptors in ankylosing spondylitis: relationship to inflammatory markers and endoplasmic reticulum aminopeptidase polymorphisms. *J Rheumatol* 2010;37:1907–1910.
19. Harvey D, Pointon JJ, Evans DM, Karaderi T, Farrar C, Appleton LH, et al. Investigating the genetic association between ERAP1 and ankylosing spondylitis. *Hum Mol Genet* 2009;18:4204–4212.
20. Kochan G, Krojer T, Harvey D, Fischer R, Chen L, Vollmar M, et al. Crystal structures of the endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 (ERAP1) reveal the molecular basis for N-terminal peptide trimming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:7745–7750.
21. Goto Y, Hattori A, Ishii Y, Tsujimoto M. Reduced activity of the hypertension-associated Lys528Arg mutant of human adipocyte-derived leucine aminopeptidase (A-LAP)/ER-aminopeptidase-1. *FEBS Lett* 2006;580:1833–1838.
22. Evnouchidou I, Kamal RP, Seregin SS, Goto Y, Tsujimoto M, Hattori A, et al. Cutting Edge: Coding single nucleotide polymorphisms of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 can affect antigenic peptide generation in vitro by influencing basic enzymatic properties of the enzyme. *J Immunol Baltim Md 1950* 2011;186:1909–1913.
23. Reeves E, Edwards CJ, Elliott T, James E. Naturally Occurring ERAP1 Haplotypes Encode Functionally Distinct Alleles with Fine Substrate Specificity. *J Immunol Baltim Md 1950* 2013;191:35–43.
24. Seregin SS, Rastall DPW, Evnouchidou I, Aylsworth CF, Quiroga D, Kamal RP, et al. Endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 alleles associated with increased risk of ankylosing spondylitis reduce HLA-B27 mediated presentation of multiple antigens. *Autoimmunity* 2013.

25. Nguyen TT, Chang S-C, Evnouchidou I, York IA, Zikos C, Rock KL, et al. Structural basis for antigenic peptide precursor processing by the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1. *Nat Struct Mol Biol* 2011;18:604–613.
26. Hacquard-Bouder C, Falgarone G, Bosquet A, Smaoui F, Monnet D, Ittah M, et al. Defective costimulatory function is a striking feature of antigen-presenting cells in an HLA-B27-transgenic rat model of spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 2004;50:1624–1635.
27. Hacquard-Bouder C, Chimenti M-S, Giquel B, Donnadieu E, Fert I, Schmitt A, et al. Alteration of antigen-independent immunologic synapse formation between dendritic cells from HLA-B27-transgenic rats and CD4+ T cells: selective impairment of costimulatory molecule engagement by mature HLA-B27. *Arthritis Rheum* 2007;56:1478–1489.
28. Glatigny S, Fert I, Blaton MA, Lories RJ, Araujo LM, Chiocchia G, et al. Proinflammatory Th17 cells are expanded and induced by dendritic cells in spondylarthritiss-prone HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis Rheum* 2012;64:110–120.
29. Utriainen L, Firmin D, Wright P, Cerovic V, Breban M, McInnes I, et al. Expression of HLA-B27 causes loss of migratory dendritic cells in a rat model of spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 2012;64:3199–3209.
30. Krause L, Fert I, Labroquère K, Andrieu M, Chiocchia G, Breban M. Regulatory T Cells in Spondyloarthritis (SpA) Animal Model and Modulatory Role of Inducible Costimulator (ICOS). *Arthritis Rheum* 2012;64:S260–261.
31. Amor B, Dougados M, Mijiyawa M. [Criteria of the classification of spondylarthropathies]. *Rev Rhum Mal Ostéo-Articul* 1990;57:85–89.
32. Dougados M, Linden S van der, Juhlin R, Huitfeldt B, Amor B, Calin A, et al. The European Spondylarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 1991;34:1218–1227.
33. Linden S van der, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum* 1984;27:361–368.
34. Rudwaleit M, Heijde D van der, Landewé R, Listing J, Akkoc N, Brandt J, et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann Rheum Dis* 2009;68:777–783.
35. Rudwaleit M, Heijde D van der, Landewé R, Akkoc N, Brandt J, Chou CT, et al. The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann Rheum Dis* 2011;70:25–31.
36. Scheet P, Stephens M. A fast and flexible statistical model for large-scale population genotype data: applications to inferring missing genotypes and haplotypic phase. *Am J Hum Genet* 2006;78:629–644.

37. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21:263–265.
38. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinforma Oxf Engl* 2004;20:307–315.
39. Monks SA, Leonardson A, Zhu H, Cundiff P, Pietrusiak P, Edwards S, et al. Genetic inheritance of gene expression in human cell lines. *Am J Hum Genet* 2004;75:1094–1105.
40. Dixon AL, Liang L, Moffatt MF, Chen W, Heath S, Wong KCC, et al. A genome-wide association study of global gene expression. *Nat Genet* 2007;39:1202–1207.
41. Campbell EC, Fettke F, Bhat S, Morley KD, Powis SJ. Expression of MHC class I dimers and ERAP1 in an ankylosing spondylitis patient cohort. *Immunology* 2011;133:379–385.
42. Fruci D, Ferracuti S, Limongi MZ, Cunsolo V, Giorda E, Fraioli R, et al. Expression of endoplasmic reticulum aminopeptidases in EBV-B cell lines from healthy donors and in leukemia/lymphoma, carcinoma, and melanoma cell lines. *J Immunol Baltim Md 1950* 2006;176:4869–4879.
43. García-Medel N, Sanz-Bravo A, Nguyen D Van, Galocha B, Gómez-Molina P, Martín-Esteban A, et al. Functional interaction of the ankylosing spondylitis-associated endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 polymorphism and HLA-B27 in vivo. *Mol Cell Proteomics MCP* 2012;11:1416–1429.

Troisième partie

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Discussion

La SpA est une maladie complexe dont la cause demeure méconnue à ce jour. Quarante années après la découverte de l'association de l'allèle HLA-B27 à la SpA, et malgré de nombreuses preuves épidémiologiques de son implication, le rôle pathogénique de cette molécule n'a toujours pas été élucidé. Il constitue un facteur de prédisposition génétique quasi-nécessaire, mais non suffisant à la survenue de la maladie. Comme les études épidémiologiques l'indiquent, d'autres facteurs de susceptibilité à la SpA doivent intervenir et restent donc à déterminer. En outre, les mécanismes physiopathologiques mis en jeu sont complexes et aucune hypothèse n'a été validée à ce jour.

C'est donc dans la préoccupation globale d'améliorer la compréhension des événements impliqués dans la SpA, que mon travail de thèse s'est inscrit. Pour se faire, nous avons utilisé deux approches majeures qui sont la génétique et la génomique fonctionnelle. La première a consisté à rechercher de nouveaux loci de susceptibilité à la SpA, dans la région du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) et la deuxième, à réaliser une étude transcriptomique pangénomique sur des cellules dendritiques dérivées de monocytes (MD-DCs), afin d'identifier des gènes différentiellement exprimés entre patients atteints de SpA et témoins sains. Nous avons, au cours de notre projet, mené ces deux études en parallèle, considérant qu'il s'agissait de types d'approche complémentaires.

1. CMH et SpA (cf. article 1)

- Identification de nouveaux facteurs de susceptibilité à la SpA (cf. article 1)

Les études épidémiologiques attribuent au CMH, 40 à 50% de la composante génétique, expliquée en grande partie par le poids du HLA-B27, en suggérant cependant l'implication possible d'autres gènes au sein de cette région ⁷⁵. Déterminer de nouveaux facteurs de susceptibilité à la SpA au sein du CMH, distincts de HLA-B27, était donc notre objectif.

Avant mon arrivée au laboratoire, une étude de liaison pan-génomique réalisée à l'aide de puces à ADN Affymetrix® de 250 000 SNPs, et portant sur 154 familles multiplex recrutées par le GFECS, comprenant 1068 individus (dont 439 patients atteints de SpA) avait

été réalisée. Pour mon projet, je me suis focalisée sur les données de cette étude qui concernaient la région du CMH et les régions adjacentes. Pour cela, nous avons analysé les données d'une région située de part et d'autre du locus HLA-B, s'étendant sur 20 Mb, et correspondant à 1134 SNPs génotypés entre les positions 20 et 40 Mb à partir du p-télomère du chromosome 6, le HLA-B étant situé à 31,32 Mb du p-télomère, au centre de la région investiguée.

Afin d'identifier des polymorphismes associés à la SpA, indépendamment de HLA-B27, j'ai appliqué une approche conditionnée sur cet allèle lors de l'étude d'association. Nous avons ainsi identifié l'association de 47 variants, distincts du HLA-B27, à la SpA. Cinq d'entre eux, situés entre 24 et 37 Mb du p-télomère, ont été répliqués dans la cohorte constituées de 142 trios.

L'association du SNP rs5025315 à la SpA a également été répliquée dans la cohorte de cas-témoins. Ce variant est situé dans une région inter-génique, entre *HLA-B* et *MICA*, distants de 43 kb, où trois pseudogènes sont également présents. Le polymorphisme rs5025315 est fortement associé à deux autres SNPs qui forment ainsi un bloc de déséquilibre de liaison couvrant 669 pb, dans lesquels pourraient se situer le(s) variant(s) causal(aux).

Le gène *MICA* code pour une molécule exprimée à la surface cellulaire et fonctionne comme ligand des récepteurs de type NK (NKG2D) exprimés à la membrane des cellules NK, des LT $\gamma\delta$ et des LT $\alpha\beta$ CD8⁺, il semble donc être un candidat potentiel pour influencer le risque de SpA²³⁵. En effet, le rôle des cellules NK dans la SpA a largement été rapporté dans la littérature^{236 237}. Une interaction entre cette molécule et le HLA-B27 paraît donc être possible. Les protéines KIR, KIR3DL1 et KIR3DL2, exprimées également à la surface des cellules NK et LT sont d'ailleurs connues pour se fixer à des homodimères de B27 exprimés à la surface cellulaire^{238 239}. L'expression anormale d'homodimères B27 dans la SpA pourrait exercer un rôle pathogène par leur interaction avec des récepteurs de cellules NK, tel que les récepteurs KIR et ainsi altérer la fonction de MICA.

Un autre polymorphisme, rs7761118, situé à 4,6 Mb du côté télomérique du HLA-B, était significativement associé à la SpA dans les deux premières cohortes et présentait une tendance d'association dans la troisième cohorte constituée de cas-témoins. Il est situé au sein d'un intron du gène *MAPK14* qui code pour la p38 Map kinase possédant un rôle central

dans plusieurs voies de signalisation intracellulaires et intervenant dans de nombreuses fonctions cellulaires essentielles comme la différenciation, la prolifération ou la régulation de la transcription, notamment dans des cellules immunitaires. Cette protéine est notamment activée sous l'effet d'un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires. Il en résulte que MAPK14 pourrait jouer un rôle crucial dans les pathologies inflammatoires, comme cela a déjà été montré pour la polyarthrite rhumatoïde^{240 241}. De façon intéressante, il a été montré que la voie de MAPK14 pouvait être dérégulée sous l'influence de l'expression de la molécule HLA-B27, d'une façon corrélée à celle d'homodimères de la chaîne libre de B27, l'un des mécanismes proposés pour expliquer la pathogénicité du B27 dans la SpA²⁴².

L'association des trois autres variants a été répliquée dans la collection de trios mais pas celle constituée de cas-témoins. Cela pourrait être dû au design différent des deux cohortes. En effet, les cohortes de familles et de trios sont composées de patients présentant des caractéristiques cliniques comparables, alors que dans la cohorte cas-témoins, la proportion de patients HLA-B27 positifs et de spondylarthrite ankylosante est plus faible, celle de patients atteints de rhumatisme psoriasique plus importante. Néanmoins, il n'est pas inattendu d'observer des différences de caractéristiques, puisque les deux premières cohortes sont composées de cas familiaux alors que la collection de cas-témoins se compose de patients sporadiques.

Le marqueur rs10946676 est situé à 7,17 Mb de HLA-B, du côté centromérique de ce locus, dans un intron du gène *neurensin* (*NRSN1*), alors que le SNP rs10484431 se localise dans l'intron d'un gène codant pour un transporteur de phosphate (*SLC17A2*) à 25,93 Mb du p-télomère. Enfin, le variant rs963835 est situé au sein d'un intron du gène *RNF8* qui code pour une ubiquitine ligase impliquée dans la réparation de l'ADN, à 6,02 Mb du HLA-B.

L'identification de nouveaux variants génétiques situés dans la région du CMH et, indépendamment de HLA-B27, associés à la SpA représentait un vrai défi, compte tenu du poids exorbitant de l'association au B27 et du fort DL existant dans cette région, le risque majeur étant que les associations décrites ne se révèlent finalement des faux positifs. Pour cela, plusieurs contraintes ont été respectées. Tout d'abord, les études d'association ont été conditionnées sur la présence du HLA-B27 afin de neutraliser son influence. Pour cela, il a fallu déterminer le statut de ce marqueur pour l'ensemble des échantillons étudiés. Cela a été réalisé par deux méthodes de génotypage : la PCR spécifique de l'allèle HLA-B27 et le

génotypage du marqueur rs4349859, décrit comme un substitut de HLA-B27¹⁰⁷, méthode hautement spécifique qui nous a permis d'identifier les porteurs du HLA-B27 à l'état homozygote. Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, cette méthode s'est avérée techniquement satisfaisante. De plus, nous avons utilisé 3 collections indépendantes de patients et de témoins, afin de ne retenir que les associations qui étaient répliquées. Enfin, ces 3 collections étaient constituées exclusivement de Caucasiens, afin de se préserver du risque de biais de stratification de la population, lui-même source potentielle de faux positif.

Malgré les résultats significatifs que nous avons obtenus dans ce projet, la densité des marqueurs utilisés dans la région du CMH (en moyenne, 1 SNP tous les 18 kb) n'était pas suffisante pour conclure. La région du CMH étant extrêmement polymorphe et dense en gènes, le recours à une puce spécifique du CMH et plus dense en SNPs permettrait une cartographie plus fine et plus précise. En fait, une limite importante de cette étude est son caractère ancillaire, puisqu'elle a été conduite au décours de l'étude de liaison, sans calcul de puissance préalable. Un tel calcul serait d'ailleurs particulièrement complexe, puisqu'il faudrait prendre en compte le caractère conditionnel de l'analyse, en plus des paramètres habituels (fréquence de l'allèle mineur, amplitude de l'effet).

- Prévalence de HLA-B27 dans la population française (cf. article 2)

Pour poursuivre les études d'association conditionnées sur l'allèle HLA-B27, il nous a paru essentiel de disposer d'un échantillon suffisamment large de sujets sains représentatifs de la population générale et porteurs du HLA-B27. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes tournés vers la cohorte GAZEL. Dans cette cohorte nous avons sélectionné les individus n'ayant aucun symptôme compatible avec une SpA pour nous servir de témoins. Nous avons également identifié ceux qui avaient développé la maladie. La caractérisation du statut HLA-B27 chez ces individus a permis d'estimer la prévalence de cet allèle à 6,9% chez les témoins et à 75% chez les patients atteints de SpA. Reveille *et al.* ont récemment estimé la prévalence de B27 dans une population de sujets américains blancs non-hispaniques à 7,5% (95%CI: 5,3 - 10,4) ce qui est très proche de notre estimation²⁴³. D'après notre étude, le risque de développer une SpA serait 39 fois plus élevé chez les individus porteurs du HLA-B27 que chez les sujets HLA-B27 négatifs, alors qu'une étude berlinoise avait conclu à un

risque relatif de 20,7. Cependant, la prévalence de la SpA retenue pour estimer ce risque était plus élevée que dans notre population (1,9%)³⁴.

Il est également intéressant de préciser qu'une fréquence plus faible de HLA-B27 a été observée chez les individus de plus de 70 ans (5,1%; 95%CI: 3,4 - 7,4%) comparés aux sujets plus jeunes (7,3%; 95%CI: 6,2 - 8,6%). Ces résultats suggèrent une mortalité accrue des individus positifs pour HLA-B27 nés au cours des années 1940-1950. Néanmoins aucune étude en rapport avec la prévalence de HLA-B27 dans la population générale et les causes de mortalité de ces individus n'a été menée à ce jour. Il est cependant connu que HLA-B27 est associé à des maladies cardiaques et du système immunitaire. En effet, B27 semble induire une réduction de la réponse immune en présence de bactéries pathogènes intracellulaires. De plus, il s'agit de sujets nés durant la seconde guerre mondiale, sachant que plusieurs épidémies se sont développées durant cette période en France, ce qui pourrait suggérer une susceptibilité plus élevée des sujets HLA-B27 à des maladies infectieuses infantiles²⁴⁴ ou encore à l'environnement particulier, notamment nutritionnel, de cette période. Une étude américaine a rapporté récemment une tendance similaire chez des individus de 50 à 69 ans²⁴³. La différence entre ces deux classes d'âge pourrait correspondre à des différences d'exposition à des pathogènes entre la France et les Etats-Unis.

Dans la cohorte GAZEL, le génotypage de HLA-B27 a été réalisé à nouveau par deux méthodes conjointes, la PCR allèle spécifique et le génotypage du marqueur rs4349859, ce qui là encore nous a permis d'identifier les porteurs du HLA-B27 à l'état homozygote. La fréquence de l'allèle mineur (allèle A qui étiquette HLA-B27) était de 6,8% (95%CI: 5,9 - 7,9%) dans la cohorte, avec présence de deux témoins mais d'aucun patient homozygotes. Comme observé dans d'autres études, l'état homozygote pour HLA-B27 ne semble pas influencer le risque de développer une SpA^{91 92}.

Il est important de noter que la concordance des résultats entre les deux méthodes de génotypage était satisfaisante. En effet, parmi les 2 466 témoins testés nous n'avons observé que 11 discordances (6 rs4349859+/HLA-B27-, 5 rs4349859-/HLA-B27+). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces quelques discordances. Les individus rs4349859-/HLA-B27+ pourraient être porteurs de sous-types rares de HLA-B27 qui ne sont pas « taggés » par le rs4349859, tels que les allèles HLA-B*2703, B*2704, et B*2706, allèles qui sont présents en Afrique et/ou en Asie mais qui sont rares chez les Caucasiens¹⁰⁰. L'origine ethnique des

participants de la cohorte n'est pas connue, ce qui ne permet pas de confronter ces informations. Par contre, le séquençage du gène HLA-B chez ces individus devrait permettre de répondre à la question. Il se pourrait également que les discordances rs4349859+/HLA-B27- et rs4349859-/HLA-B27+ soient dues à une recombinaison entre ces deux loci.

Le génotypage du polymorphisme rs4349859 a été obtenu sur quasiment l'ensemble des échantillons (99,5%). De plus, en comparaison avec la PCR allèle spécifique, le génotypage du rs4349859 a fait preuve d'une bonne sensibilité (97,0%) et d'une bonne spécificité (99,7%) pour déterminer le statut HLA-B27. Ce nouvel outil de typage B27 permet, malgré les quelques discordances observées, de déterminer spécifiquement le statut homozygote de HLA-B27 et cela à grande échelle. Les avantages de cette méthode nous permettrons donc de gagner des informations et du temps pour nos prochaines études au sein du laboratoire. Il est également envisageable d'utiliser le génotypage du rs4349859 en routine en laboratoire d'analyse. Ainsi, une fois précisées les raisons des discordances entre la PCR spécifique d'allèle et le génotypage du SNP rs4349859, ce dernier pourrait constituer une alternative très intéressante à la PCR spécifique d'allèle en biologie clinique ou dans des études d'épidémiologie génétique, compte tenu de la simplicité de sa mise en œuvre.

La prévalence de la SpA a été estimée à 0,43% dans notre étude, alors que la dernière étude menée dans la population française datant de 2001 l'avait estimée à 0,3%²⁵. Cependant, l'intervalle de confiance de notre estimation (95%CI: 0,26 à 0,70%) chevauche celle de l'étude précédente (95%CI: 0,17 à 0,46%). Cette différence pourrait peut-être s'expliquer par l'âge des individus différent entre les deux études. En effet, *Saroux et al.* ont examiné des sujets de 18 à 84 ans alors que nous avons uniquement inclus des individus de plus de 57 ans²⁵. Sachant que le diagnostic de la maladie se fait très rarement après l'âge de 50 ans, la probabilité de voir d'autres cas se déclarer plus tard est faible. Ainsi notre étude se rapproche davantage de l'approximation du risque cumulé de SpA dans la population française.

Des biais sont toutefois à prendre en considération dans notre étude. Tout d'abord, notre cohorte se composait d'hommes en proportion exagérée. Néanmoins ce biais ne devrait avoir que peu d'impact sur l'estimation du risque de SpA, sachant que la prévalence de la SpA observée était similaire entre hommes et femmes et que la prévalence a été

ajustée sur le sexe ratio. Par ailleurs, les participants de l'étude étaient des volontaires, travaillant au sein de la compagnie EDF-GDF, leur état de santé pourrait ainsi avoir eu une influence sur leur prise de décision. Cependant, ces individus provenaient de toutes les régions de France et avaient des statuts socio-économiques variés. D'autre part, le nombre de patients réellement atteints de SpA était faible (31/72), correspondant à la valeur prédictive positive, qui est égale à 9% dans cette étude. En effet, c'est pourquoi il était indispensable de vérifier les diagnostics par un rhumatologue. Enfin, le diagnostic de SpA n'a été envisagé que chez les participants ayant connaissance d'avoir cette maladie, ce qui fait que nous avons pu manquer certains sujets non diagnostiqués. Néanmoins, la valeur prédictive négative étant proche de 100%, ce biais devrait avoir des conséquences minimales.

Notre étude apporte de nouvelles informations quant à la prévalence de HLA-B27 dans la population française et le risque de SpA chez les individus B27⁺. Néanmoins, il aurait été intéressant de connaître la distribution des sous-types de HLA-B27 au sein de cette cohorte représentative de la population française. Ces données permettraient d'estimer la fréquence de HLA-B27:05 en France, sous-type le plus commun chez les Caucasiens, et d'identifier de nouveaux sous-types associés à la SpA ⁸².

2. Cellules dendritiques et SpA

Les études menées dans le modèle du rat transgénique HLA-B27, ont mis en exergue diverses anomalies fonctionnelles de leurs cellules dendritiques (DCs) ^{51-54 59}. Partant de ces observations, l'existence d'un défaut fonctionnel de ces cellules dans la pathologie humaine était donc une hypothèse à tester.

- Défaut fonctionnel des DCs

En effet, comme chez le rat transgénique HLA-B27, un défaut de réponse proliférative des LT CD4⁺ hétérologues stimulés par les MD-DCs, a été mise en évidence chez les patients atteints de SpA, en comparaison avec les sujets témoins. Les MD-DCs immatures (H0) ou stimulées 6h par du LPS (H6) présentaient ce défaut fonctionnel (Figure 1 - cf. Article 3). De façon

remarquable, l'index de prolifération des LT CD4⁺ semble comparable lors de leur stimulation avec les MD-DCs de patients activées ou non par le LPS (H0 et H6), laissant supposer que les MD-DCs de sujets malades se sont moins activées sous l'effet du LPS. Néanmoins, la différence semble s'estomper après 24 heures de stimulation (H24). En effet, l'index de prolifération obtenu avec les MD-DCs des patients augmente à H24. De façon concordante, l'expression des molécules de co-stimulation était plus élevée après stimulation par le LPS démontrant la bonne maturité de ces cellules présentatrice d'antigène (Figure supplémentaire 2 – cf. Article 3). Ce déficit des cellules dendritiques constaté après 6 heures de stimulation pourrait donc être plutôt le fait d'une maturation plus lente et incomplète. Il faut noter que les différences observées entre patients et témoins se sont révélées reproductibles entre deux groupes d'expériences indépendantes, dont les données ont été réunies. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce défaut de réponse proliférative des LT CD4⁺ : une diminution de formation de conjugués entre MD-DCs et LT CD4⁺ des patients et/ou un défaut d'engagement de certaines molécules à la surface des MD-DCs qui limiterait la formation de la synapse immune, (SI) comme cela a pu être mis en évidence pour les DCs de rat transgénique HLA-B27^{51 52}.

En parallèle de ces études de prolifération, une analyse en cytométrie de flux a été réalisée chez 11 patients et 15 témoins sains, afin de déterminer s'il existait une altération de l'expression de la surface, des molécules HLA et de co-stimulation. De fait, une augmentation de l'expression des molécules HLA de classe-I, HLA-DR et du CD40 a été observée chez les patients atteints de SpA dans une première série d'expériences. Néanmoins, ces différences n'ont pas été répliquées dans la seconde cohorte étudiée, il est donc difficile d'être certains de la signification de ces résultats. En effet, le défaut de réponse proliférative des LT CD4⁺ stimulés par les MD-DCs pourrait plutôt suggérer une réduction d'engagement des molécules de co-stimulation à la surface des MD-DCs, comme cela a été montré chez le rat transgénique HLA-B27, qu'une diminution d'expression de la molécule CD86. De façon intéressante, une autre étude a mis en évidence une diminution de la molécule HLA-DR à la surface des MD-DCs de patients atteints de SA comparées à celles de témoins²⁴⁵. Il faut néanmoins noter que ce travail n'a concerné qu'un faible échantillon de 5 patients et 8 témoins sains.

Les mécanismes moléculaires à l'origine du défaut fonctionnel des MD-DCs de patients atteints de SpA restent donc à caractériser.

Pour finir, il semblerait que la co-stimulation par les molécules de surface, lors de la formation de la SI, soit essentielle pour l'expansion des lymphocytes T régulateurs chez le rat²⁴⁶. Il a d'ailleurs été montré, une augmentation des LT pro-inflammatoires Th17 chez le rat transgénique HLA-B27, alors que la fonction des LT régulateurs était altérée, en comparaison avec les rats témoins^{58 247}. Les LT TH17 circulants sont également plus fréquents chez les patients atteints de SpA que chez les sujets sains dans l'étude de Jandus *et al.*¹⁸⁶. Ainsi, nous pourrions envisager que les MD-DCs défectueuses de patients atteints de SpA puissent perturber l'expansion des LT régulateurs, ce qui pourrait entraîner une perte de tolérance aux antigènes du soi.

- Signature transcriptomique chez des patients atteints de SpA

Analyser le profil d'expression des gènes peut être une approche complémentaire aux études génétiques pour identifier les mécanismes moléculaires responsables de la maladie. A ma connaissance, une dizaine d'études transcriptomiques ont été menées à ce jour dans la SA ou la SpA, mais aucune sur la DC. L'originalité de notre projet vient aussi de l'étude cinétique de stimulation des MD-DCs par le LPS.

La recherche de gènes différentiellement exprimés entre les MD-DCs de patients atteints de SpA et celles des témoins sains, nous a permis d'identifier une signature transcriptionnelle associée à la SpA, composée de 81 gènes ($P < 0,01$ et $F \leq$ ou $\geq 1,5$) (Figure 3 supplémentaire – cf. Article 3). Les quelques 22000 gènes de la puce Affymetrix ont été testés, toutefois après avoir sélectionné les gènes « exprimés ». Dans ce but, nous avons effectué un filtrage sur l'expression moyenne des gènes comparée à celle de jeux de sondes censées ne pas correspondre à des transcrits (introniques, etc). En revanche, nous n'avons pas exigé que les gènes soient exprimés chez tous les patients ou témoins. Enfin, il convient de noter que, du fait de la petite taille de notre échantillon, nous n'avons pas effectué de correction pour compenser la multiplicité des tests.

Les MD-DCs sont des cellules obtenues *ex-vivo* qui ne sont, par conséquent, pas directement influencées par un environnement systémique inflammatoire ni par un traitement médicamenteux. En outre, elles ont été dérivées à partir de populations de monocytes comparables (Figure 2 supplémentaire – cf. Article 3) et présentaient le même phénotype d'expression des marqueurs de surface, dans les deux groupes d'individus (Figure 1 supplémentaire – cf. Article 3). Nous pouvons donc penser que les différences d'expressions de gènes que nous avons observées sont bien le reflet de la maladie.

Les quatre gènes que nous avons validés par RT-qPCR, *ADAMTS15*, *CITED2*, *F13A1* et *SELL* (Tableau 1 et Figure 3 – cf. Article 3) ont été sélectionnés sur la valeur P, l'amplitude de leur variation entre patients et contrôles, et sur leur pertinence biologique ainsi que sur la somme de travail que représente cette validation. Ces gènes pourraient contribuer à la SpA par différents biais. Certains d'entre eux (*ADAMTS15*, *F13A1* et *SELL*) pourraient participer à l'inflammation des articulations dans la maladie. *ADAMTS15* appartient à la famille des metalloprotéinases (MMP) dont plusieurs membres ont été associés à la susceptibilité et à la sévérité de la SA et/ou de la SpA²⁴⁸⁻²⁵⁰. Ce gène pourrait ainsi être impliqué dans la synthèse ou la dégradation de composants des os ou du cartilage durant l'inflammation de l'articulation, comme pour la SpA. *F13A1* code pour un facteur de coagulation et possède de nombreuses fonctions dont le développement osseux et cartilagineux²⁵¹. Il a également été montré que le génotype de la sous-unité A du facteur XIII influençait le niveau de CRP durant l'inflammation chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde²⁵². *SELL*, quant à lui, code pour un récepteur lymphocytaire, une des molécules d'adhésion qui régule l'entrée de certaines cellules, comme les monocytes et les neutrophiles, dans les tissus inflammés et contribue à la sévérité de l'inflammation articulaire²⁵³. La surexpression de ces trois gènes pourrait ainsi renforcer l'inflammation des tissus touchés dans la SpA.

Le gène *CITED2*, code pour un co-activateur transcriptionnel qui ne se lie pas directement à l'ADN, mais s'attache, avec une forte affinité, à une région riche en cystéine et en histidine (CH1) de p300 et CBP²⁵⁴. Il peut être ainsi en compétition avec des modulateurs de transcription, comme HIF-1 α , RXR α , NF- κ B, STAT2, MDM2 et ETS1^{255 256}. Ainsi, *CITED2* régule selon le contexte, positivement ou négativement, l'expression de gènes spécifiques, comme ce pourrait être le cas dans la SpA. Dans notre étude, il était sous-exprimé chez les

patients et corrélé négativement avec *ADAMTS15*, dans les MD-DCs stimulées pendant 6 heures par le LPS (Figure 4 – cf. Article 3). Il est intéressant d’observer que des corrélations négatives similaires ont été reportées entre *CITED2* et plusieurs membres de la famille des MMP (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13)²⁵⁷. Prenant en considération que les MMPs constituent un groupe d’enzymes protéolytiques exprimés dans les tissus articulaires, il a été suggéré que *CITED2* puisse exercer un effet chondro-protecteur par le biais d’une régulation négative des MMPs²⁵⁸. Dans le cadre de notre travail, la sous-expression de *CITED2* et sa corrélation inverse avec l’expression d’*ADAMTS15* nous a conduits à considérer que les DCs ou d’autres cellules phagocytaires, comme le macrophage ou l’ostéoclaste, pouvaient jouer un rôle dans la résorption articulaire de la SpA renforcé par l’activité metallo-peptidasique.

Les analyses *in silico* conduites sur les gènes co-régulés à *CITED2* ont mis en évidence plusieurs facteurs appartenant aux voies de signalisation canoniques (*WNT1*, *WNT10B* et *FRZL4*) et non-canoniques (*ROR2*) de Wnt (Figure 5 – cf. Article 3). La sous régulation de ces gènes, observée chez les patients atteints de SpA, est une donnée qui possède un intérêt pour la pathologie. En effet, la voie canonique de Wnt joue un rôle important dans la synthèse et/ou la destruction osseuse dans l’arthrite inflammatoire^{259 260}. En particulier *Wnt10b*, dont la sous-expression a été associée à une diminution de la masse osseuse²⁶¹. De plus, l’activation de la voie canonique Wnt/ β -caténine dans les DCs pourrait jouer un rôle dans l’induction des LT régulateurs et dans l’inhibition de la différenciation des LT Th17, par un mécanisme impliquant la synthèse de l’acide rétinoïque²⁶². Par conséquent, la sous-expression de la voie canonique de Wnt dans les DCs pourrait favoriser la différenciation des Th17, impliqués dans les processus inflammatoires, comme dans la SpA²⁶³. Enfin, *ROR2* est impliqué dans la mobilité cellulaire via l’actine du cytosquelette en collaboration avec *WNT5a* pour stimuler la migration cellulaire²⁶⁴. Il est intéressant de noter que le défaut de stimulation des LT était associé à un cytosquelette altéré dans les DCs des rats transgéniques HLA-B27⁵⁴.

Un de mes objectifs de thèse était de confronter entre elles les données obtenues dans les études génétiques et transcriptomiques. Nous aurions donc apprécié identifier des gènes du CMH différenciellement exprimés entre patients atteints de SpA et témoins. Mais

aucun gène de la région du CMH n'est ressorti de notre étude. Néanmoins, ces résultats ne suggèrent pas pour autant qu'aucun gène du CMH ne soit différentiellement exprimé chez des sujets atteints de SpA comparés à des témoins, différents facteurs ayant pu influencer ce résultat. En particulier, la composition des individus de l'étude de transcriptomique pourrait y avoir contribué. En effet, les patients étaient tous HLA-B27⁺ et les témoins sains HLA-B27⁻, il se pourrait que l'influence de B27 chez les malades ait dissimulé l'effet des autres gènes de la région.

3. ERAP1 : un eQTL dans la SpA (cf. Article 4)

Des polymorphismes codants d'*ERAP1* ont été associés à la SA puis à la SpA dans de nombreuses études^{152 161 162 166 167}. La surexpression du gène *ERAP1*, chez les sujets atteints de SpA comparés aux témoins ($P < 0,05$ et $F \geq 1,5$), dans les MD-DCs stimulées 6 heures par le LPS, nous a interpellé quant à l'effet potentiel des polymorphismes d'*ERAP1* associés à la SpA sur la variation de l'expression de son gène. En effet, des études suggèrent que la variation naturelle de l'expression des gènes est communément associée à des variants génétiques^{265 175}. Ainsi, nous avons tenté de déterminer si les polymorphismes associés à la SpA pouvaient avoir un impact sur l'ARNm d'*ERAP1*. Le génotype du SNP rs30187, qui semble être le principal polymorphisme responsable du signal d'association¹⁰⁷, apparaissait corrélé à l'expression du gène *ERAP1*, aussi bien dans les MD-DCs de sujets atteints de SpA que chez les sujets sains, dans deux cohortes indépendantes. Un effet haplotypique de rs17482078/rs10050860/rs30187, dont l'association à la SpA a été identifiée dans plusieurs études^{161 162 168}, a également été observé sur l'expression d'*ERAP1*. En effet, l'expression était plus faible chez les porteurs de l'haplotype protecteur (-TTC) et plus élevée chez les porteurs de l'haplotype conférant un risque élevé de SpA (-CCT). Nous avons pu démontrer qu'*ERAP1* était une « expression » QTL (locus de trait quantitatif), ce qui signifie que son expression est sous contrôle, en cis-régulation, de rs17482078/rs10050860/rs30187. Il faut noter que cette cis-régulation a également été suggérée pour plusieurs SNPs d'*ERAP1* dans des lignées cellulaires¹⁷⁶. Mais c'est la première fois, que ce contrôle d'*ERAP1* en cis, est identifié dans des cellules primaires.

De façon intéressante, une association entre la quantité de protéines produites et l'haplotype rs17482078/rs10050860/rs30187, ce que l'on peut nommer une « protéine »

QTL (locus de trait quantitatif) a également été observée. A ma connaissance, ce type de régulation n'avait jamais été décrit pour *ERAP1*. Toutefois, une quantité accrue de protéine ERAP1 a déjà été rapportée chez des patients atteints de SA comparés à des témoins dans des MD-DCs ¹⁷⁷. Ce résultat pourrait refléter une répartition inégale des haplotypes au sein des deux groupes d'individus étudiés si l'on s'en réfère à nos propres résultats. En effet, dans notre étude, les différences observées étaient indépendantes du statut maladie, comme le confirme la forte corrélation de l'expression d'*ERAP1* chez les individus haplo-identiques appariés (malade-témoin).

De façon apparemment contradictoire, une étude récente a conclu à une absence de corrélation entre les haplotypes -TTC et -CCT de rs17482078/rs10050860/rs30187 et l'expression de la protéine ERAP1 ²⁶⁶. Cependant, il faut souligner que ces résultats ont été obtenus à partir de lignées cellulaires transfectées surexprimant ERAP1.

Les effets des polymorphismes d'*ERAP1* associés au risque de SpA sur le taux d'expression de la protéine ERAP1 ont été explorés dans des lignées EBV, obtenues à partir de cellules lymphoblastiques de patients porteurs de l'un des 3 haplotypes différenciellement associés à la SpA à l'état homozygote ¹⁶⁸. Ces lignées cellulaires immortalisées nous ont permis d'obtenir une quantité suffisante de protéines, à la différence des MD-DCs dont la faible quantité de cellules récupérée avait été utilisée pour isoler les ARN.

L'association entre l'haplotype rs17482078/rs10050860/rs30187 prédisposant à la SpA, et l'augmentation de l'expression du gène et de la protéine, suggère des conséquences au niveau de l'activité enzymatique. En effet, diverses études ont montré que les polymorphismes rs30187, rs17482078 et rs27044 étaient associés à des variations de l'activité enzymatique d'*ERAP1* ^{172-174 266 267}. Le rôle physiopathologique joué par *ERAP1* dans la SpA est encore inconnu à ce jour. Cependant, les conséquences fonctionnelles des variations de l'activité aminopeptidasique d'*ERAP1* sont largement étudiées. En effet, ERAP1 jouant un rôle dans la présentation antigénique, il est essentiel de comprendre les impacts que ces modifications peuvent engendrer.

Il a été montré que l'activité enzymatique de clivage peptidique d'*ERAP1* était réduite chez les individus porteurs des allèles de rs17482078 et rs30187 protecteurs vis à vis du risque de SpA ^{107 174}. Une diminution de la stabilité des molécules de classe I et de leur

capacité à présenter des antigènes à la surface des cellules a été mise en évidence chez la souris déficiente pour ERAP1¹⁷¹. Il a par ailleurs été proposé que la variation de l'activité catalytique puisse dépendre du substrat et de sa concentration¹⁷³. Des études ont suggéré que la diminution de clivage des peptides par le variant K528R (allèle protecteur du rs30187) pouvait s'expliquer par un changement de conformation de la protéine, lors par exemple, de la transition de sa forme active à sa forme inactive^{174 178}. Enfin, K528R étant situé près de l'entrée de la poche enzymatique, il se pourrait qu'une interaction entre plusieurs résidus de l'aminopeptidase facilite une liaison de haute affinité du substrat à son enzyme, en maintenant la poche dans une certaine conformation¹⁷².

Nous avons étudié les conséquences des changements d'expression d'*ERAP1* sur l'expression des molécules de CMH de classe I dont le HLA-B27 à la surface des MD-DCs et des lignées EBV. Aucune corrélation d'expression n'a pu être identifiée entre *ERAP1* et ces molécules. Ces données contradictoires existent à ce sujet dans la littérature. En effet, certaines études montrent, dans le modèle de la souris déficiente pour ERAP1, une corrélation entre l'expression d'*ERAP1* et l'expression des molécules du CMH de classe I à la surface cellulaire^{170 268 269}. Ce type de résultat n'a cependant pas été confirmé dans une étude portant sur les conséquences de l'atténuation de l'expression d'*ERAP1* dans des cellules HeLa²⁷⁰. De plus, une autre étude utilisant des HeLa dont l'expression d'*ERAP1* a été réduite par siRNA a mis en évidence, à l'inverse, une augmentation de l'expression des molécules HLA de classe I à la surface cellulaire²⁷¹.

Notre travail a mis en évidence une forte association entre l'haplotype d'*ERAP1* prédisposant à la SpA, et un niveau accru d'expression du gène et de la protéine. Le rôle d'*ERAP1* dans la présentation antigénique apporte un argument supplémentaire pour penser que la SpA est causée par une altération de ce processus. Néanmoins, les conséquences fonctionnelles de l'augmentation de l'expression d'*ERAP1* chez les patients atteints de SpA restent à être élucidées.

Par ailleurs, l'identification de cet eQTL confirme la nécessité, dans le domaine des maladies complexes comme la SpA, de confronter entre elles les données de génétiques et de génomique afin d'identifier des variants régulateurs à l'origine de modifications fonctionnelles de gènes impliqués dans la pathologie.

Perspectives

Les résultats de nos études ainsi que les nouvelles avancées technologiques dans le domaine de la génomique offrent de nombreuses perspectives pour l'identification future de nouveaux facteurs génétique et/ou évènements moléculaires impliqués dans la SpA.

- CMH et SpA

Dans un premier temps, il est souhaitable d'approfondir la compréhension de l'effet des 5 nouveaux variants associés à la SpA, indépendamment de HLA-B27. En effet, une approche haplotypique en combinant plusieurs SNPs adjacents, pourrait permettre de mieux déterminer l'étendue de l'association et de détecter un potentiel effet additionnel. Dans un second temps, nous chercherons à discerner le(s) variant(s) causal(aux) au sein de la région identifiée. Enfin, caractériser les variations de l'expression du ou des gènes(s) à proximité du variant étudié sera nécessaire pour mieux caractériser les conséquences fonctionnelles qu'ils induisent et le rôle qu'ils jouent dans la pathogénèse de la SpA.

Poursuivre nos investigations sur le rôle du variant rs5025315, dont l'association a été répliquée dans les cohortes indépendantes, est particulièrement envisagé. En effet, ce SNP associé significativement à la SpA et situé à proximité du gène *MICA*, est en DL avec 2 autres polymorphismes également associés à la SpA dans la cohorte familiale. Il est donc possible que rs5025315 ne soit pas le polymorphisme causal. Une étude haplotypique en combinant les variants adjacents et un séquençage complet du gène et des séquences qui l'entourent pourrait ainsi nous permettre d'identifier le ou les variant(s) causal(aux). Une étude approfondie *in silico* des régions régulatrices de ce gène semble également complémentaire.

Lorsque le ou les variant(s) causal(aux) seront identifiés d'autres expérimentations seront à prévoir. En premier lieu il faudra se concentrer sur la modélisation des relations génotype-phénotype de la SpA, en tenant compte de sa présentation clinique complexe. En effet, nous avons fait le choix de considérer la SpA comme une unité indivisible. Toutefois il serait intéressant de voir si tous les facteurs génétiques sous-jacents prédisposent indifféremment à tous les sous- types de la maladie ou bien si certains d'entre eux favorisent

l'apparition de manifestations cliniques particulières et/ou influencent l'âge de la survenue et/ou la sévérité de la SpA.

- DCs et SpA
 - Poursuivre l'étude des perturbations fonctionnelles des DCs

Comme cela a été développé dans la discussion, les mécanismes moléculaires à l'origine du défaut de réponse proliférative des LT CD4⁺ hétérologues stimulés par les MD-DCs restent à élucider. Nous envisageons donc de poursuivre le travail de caractérisation de ce défaut fonctionnel des DCs dans la SpA. Pour cela, nous envisageons d'étudier la formation des conjugués entre MD-DCs et LT CD4⁺ et de la synapse immune. D'autant plus que la proportion de conjugués formés entre ces deux types de cellules est réduite avec les DCs de rat transgénique HLA-B27 en comparaison avec celles de rats témoins.

Par ailleurs, une augmentation des LT pro-inflammatoires Th17, ainsi qu'un dysfonctionnement des LT régulateurs, ont été démontrés dans le modèle du rat transgénique HLA-B27 en comparaison de rats témoins^{58 247}. Chez les patients atteints de SpA, il a aussi été rapporté que les cellules Th17 circulantes étaient plus fréquentes que chez les sujets sains¹⁸⁶. Une exploration des capacités des MD-DCs à induire une réponse Th17, en comparant patients et témoins serait pertinente. Dans ce contexte, l'utilisation de témoins HLA-B27 positifs et négatifs, permettra également de discerner si le résultat obtenu est dépendant du HLA-B27 et/ou du statut SpA.

- Poursuivre les études de gènes candidats

Nous envisageons maintenant d'approfondir nos investigations concernant certains gènes dont l'expression dérégulée a été observée dans les MD-DCs de patients et dont les modifications fonctionnelles pourraient avoir des conséquences directes sur la pathogénèse de la SpA. En effet, *ADAMTS15* code pour une metallopeptidase (MMP) excrétée vers la matrice extracellulaire. Nous nous proposons de quantifier la production de cette protéine, tout d'abord dans le surnageant de culture des MD-DCs, puis dans le sérum, en comparant

patients atteints de SpA et témoins, afin de vérifier si la différence d'expression du gène affecte la sécrétion de la protéine. En effet, la surexpression de MMPs a déjà été identifiées dans le sérum de patients atteints de SpA, qu'il s'agisse de la MMP-3²⁷², mais aussi de la MMP-8 et de la MMP-9²⁵⁰.

CITED2, est un facteur de transcription connu pour intervenir dans la régulation de l'expression de certaines MMPs^{257 273-275} et sous-exprimé dans les MD-DCs de patients atteints de SpA. Explorer la quantité protéique produite dans les noyaux de MD-DCs de patients et témoins par Western-blot devra être réalisé pourrait vérifier si son expression protéique est diminuée. Il sera alors intéressant de rechercher s'il existe une corrélation négative entre l'expression protéique d'ADAMTS15 et celle de CITED2 dans ces cellules. Les protéines ADAMTS15 et CITED2 pourraient ainsi se confirmer comme des biomarqueurs pertinents de la SpA.

Par ailleurs, la voie Wnt semble une voie de signalisation particulièrement prometteuse à explorer quant à son rôle possible dans la physiopathologie de la SpA. L'expression des quatre gènes de cette voie que nous avons mis en évidence sur la base de leur co-régulation avec CITED2 n'était pas modifiée entre patients et témoins. Il se peut cependant que notre étude ait manqué de puissance. Ainsi, nous examinerons les protéines de la voie Wnt afin de savoir si la corrélation de leur expression à celle de *CITED2* induit une dérégulation de cette voie de signalisation chez les patients atteints de SpA.

L'association de l'haplotype d'ERAP1 avec le niveau d'expression du gène et de la protéine ERAP1, que nous avons rapportée, demande des études supplémentaires afin de connaître l'effet de ces variations. De ce fait, nous avons initié un projet d'étude de l'activité enzymatique d'ERAP1 au travers d'une collaboration (collaboration avec Peter van Edert et Irini Evnouchidou, Inserm, Institut Necker). L'activité aminopeptidase d'ERAP1 sera étudiée prochainement dans des lignées EBV mais également dans les MD-DCs de patients porteurs des 3 types d'haplotypes associés à une susceptibilité distincte vis-à-vis de la SpA.

- Répliquer les résultats de l'étude transcriptomique et étendre ce projet

Lors d'une étude d'expression «génomique entière», il est nécessaire de valider, par une autre méthode, les gènes identifiés. En effet, la fiabilité de cette technique pour détecter des différences d'expression des transcrits peut être limitée par différents facteurs comme l'extraction d'ARN, les conditions d'hybridation des sondes ou encore leurs fluorescences²²². Dans nos travaux, les gènes différentiellement exprimés dans la maladie que nous avons sélectionnés ont tous été validés par PCR quantitative à partir des échantillons d'ARN utilisés pour la puce. Il serait donc utile de chercher à répliquer ces résultats sur une seconde cohorte de patients et témoins. C'est pour cette raison, qu'une deuxième étude transcriptomique, que nous avons déjà largement entamée, a été entreprise. Dans le cadre de ce nouveau projet, nous avons d'ores et déjà collecté les MD-DCs des sujets de l'étude, isolé leur ARN et les puces d'expression ont été hybridées. Les analyses des données d'expression des gènes sont en cours d'exploitation. Cette expérience est plus complète que la 1^{ère} de par la collection d'individus, constituée de 13 couples de germains appariés sur la présence du HLA-B27 et discordants pour la maladie (dans chaque couple, l'un des germains est atteint de SpA, l'autre est sain, tous deux HLA-B27⁺) et 21 témoins indépendants (10 HLA-B27⁺ et 11 HLA-B27⁻). En premier lieu nous vérifierons si les différences d'expression identifiées dans la première puce sont répliquées, en comparant les sujets atteints de SpA HLA-B27⁺ aux témoins HLA-B27⁻ indépendants. Dans un deuxième temps nous comparerons l'expression des gènes entre patients et témoins appartenant aux mêmes fratries, tous HLA-B27⁺. Cette analyse permettra d'identifier les gènes différentiellement exprimés entre patients et témoins, en contrôlant l'influence du HLA-B27, présent chez l'ensemble des individus. De plus, l'expression des gènes pourra être comparée entre les témoins HLA-B27 positifs et négatifs, permettant d'identifier les gènes affectés par le HLA-B27, sans rapport avec la maladie, l'inflammation ou le traitement médicamenteux.

Quatrième partie

CONCLUSIONS

Conclusions

Les SpA sont la résultante d'un ensemble de facteurs génétiques, immunitaires et environnementaux qui se croisent chez un individu donné. Les projets menés durant ces quatre années de thèse m'ont permis d'apporter de nouvelles informations permettant de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans cette maladie complexe.

Cinq nouveaux loci de susceptibilité à la SpA au sein du CMH et distinct de HLA-B27 ont été mis en évidence. Les variants à proximité des gènes *MICA* et *MAPK14* semblent particulièrement intéressants pour leur implication potentielle dans la pathogénèse de la SpA. Cette étude nous a aussi conduits à déterminer la prévalence du HLA-B27 dans une cohorte française représentative de la population générale. La fréquence de l'allèle HLA-B27 était de 6,9% chez les témoins et de 75% chez les sujets atteints de SpA, alors que la prévalence cumulative de la SpA au sein de cette cohorte était de 0,43%.

L'étude menée sur les MD-DCs de patients atteints de SpA et de témoins sains a démontré l'existence d'un défaut fonctionnel de ces cellules présentatrices d'antigène, tout comme cela était déjà connu dans le modèle du rat transgénique HLA-B27. Une signature transcriptomique de la maladie, composée de 81 gènes, a parallèlement été identifiée dans ces MD-DCs. Parmi les gènes validés, la surexpression d'*ADAMTS15*, de *F13A1* et de *SELL* pourrait jouer un rôle dans l'inflammation liée à la pathologie, alors que la sous-régulation de *CITED2* paraissait corrélée à une dérégulation de la voie Wnt. Ces travaux confirment par la même le rôle possible des DCs dans la pathogénèse de la SpA. Enfin, nos investigations sur les MD-DCS nous ont amené à identifier une corrélation entre l'haplotype d'*ERAP1* prédisposant à la SpA, et un niveau accru d'expression de ce gène ainsi que de la protéine ERAP1.

La SpA est une pathologie difficile à diagnostiquer, dont les traitements actuels ne permettent pas de soigner les patients et dont l'impact sur la vie personnelle et professionnelle est très souvent sous-estimé par l'entourage. Nous espérons que ce travail

de thèse permettra dans un futur, qu'il soit proche ou plus lointain, d'améliorer la compréhension de la physiopathologie de la maladie et par conséquent, les possibilités diagnostiques et thérapeutiques offertes à ces patients.

Cinquième partie

BIBLIOGRAPHIE

1. Sieper J, Braun J, Rudwaleit M, Boonen A, Zink A, . Ankylosing spondylitis : an overview. *Ann Rheum Dis* **61**, 8–19 (2002).
2. Zeidler, H., Calin, A. & Amor, B. A historical perspective of the spondyloarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **23**, 327–33 (2011).
3. Colombo R. *De Re Anatomica.* (1559).
4. Connor B. Dissertationes medico-physicae. *Sheldonian Theatr. Oxford* 206 (1695).
5. Bywaters, E. Historical perspectives in the aetiology of ankylosing spondylitis. *Br J Rheumatol.* **22**, 1–4 (1983).
6. Moll JM, Haslock I, Macrae IF, Wright V. Associations between ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, Reiter's disease, the intestinal arthropathies, and Behcet's syndrome. *Med.* **53**, 343–64 (1974).
7. Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM. High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med* **288**, 704–6 (1973).
8. François RJ, Gardner DL, Degraeve EJ, Bywaters EG. Histopathologic evidence that sacroiliitis in ankylosing spondylitis is not merely enthesitis. *Arthritis Rheum.* **43**, 2011–24 (2000).
9. Bollow M, Fischer T, Rei H, Backhaus M, Sieper J, Hamm B, B. J. Quantitative analyses of sacroiliac biopsies in spondyloarthropathies : T cells and macrophages predominate in early and active sacroiliitis-cellularity correlates with the degree of enhancement detected by magnetic resonance imaging. *Ann Rheum Dis* **59**, 135–140 (2000).
10. Braun J, Bollow M, Neure L, Seipelt E, Seyrekbasan F, Herbst, H, Eggens U, A, Distler, J, Sieper. Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing. spondylitis. *Arthritis Rheum.* **38**, 499–505 (1995).
11. Van Kuijk AWR , Reinders-Blankert P, Smeets TJM, Dijkmans BAC, Tak PP. Detailed analysis of the cell infiltrate and the expression of mediators of synovial inflammation and joint destruction in the synovium of patients with psoriatic arthritis: implications for treatment. *Ann Rheum Dis* **65**, 1551–57 (2006).
12. Baeten D, Demetter P, Cuvelier CA, Kruithof E, Van Damme N, De Vos M, Veys EM, De Keyser F. Macrophages expressing the scavenger receptor CD163 : a link between immune alterations of the gut and synovial inflammation in spondyloarthropathy. *J pathol* **196**, 343–350 (2002).
13. Baeten D, Demetter P, Cuvelier C, Van Den Bosch F, Kruithof E, Van Damme N, Verbruggen G, Mielants H, Veys EM, De Keyser F. Comparative study of the synovial histology in rheumatoid arthritis, spondyloarthropathy, and osteoarthritis: influence of disease duration and activity. *Ann Rheum Dis* **59**, 945–53 (2000).
14. Reece RJ, Canete JD, Parsons WJ, Emery P, Veale DJ. Distinct vascular patterns of early synovitis in psoriatic, reactive, and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **42**, 1481–1484 (1999).
15. D'Agostino MA, Olivieri I. Enthesitis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **20**, 473–86 (2006).
16. Van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum.* **27**, 361–8 (1987).
17. Slobodin G, Reyhan I, Avshovich N, Balbir-Gurman A, Boulman N, Elias M, Feld J, Mader R, Markovitz D, Rimar D, Rosner I, Rozenbaum M, Zisman D, Odeh M. Recently diagnosed axial

- spondyloarthritis: gender differences and factors related to delay in diagnosis. *Clin Rheumatol* **30**, 1075–80 (2011).
18. Jacques P, Van Praet L, Carron P, Van den Bosch F, Elewaut D. Pathophysiology and role of the gastrointestinal system in spondyloarthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* **38**, 569–82 (2012).
 19. Gladman DD, Brubacher B, Buskila D, Langevitz P, Farewell VT. Differences in the expression of spondyloarthropathy: a comparison between ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. *Clin Invest Med.* **16**, 1–7 (1993).
 20. Burgos-Vargas, R. Undifferentiated spondyloarthritis: a global perspective. *Curr Rheumatol Rep* **9**, 361–6 (2007).
 21. Amor B, Dougados M, Mijiyawa M. Criteria of the classification of spondylarthropathies. *Rev Rhum Mal Osteoartic* **57**, 85–89 (1990).
 22. Dougados M, van der Linden S, Juhlin R, Huitfeldt B, Amor B, Calin A, *et al.* The European Spondylarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of spondylarthropathy. *Arthritis Rheum.* **34**, 1218–27 (1991).
 23. Rudwaleit, M, Landewé, R, Van der Heijde, D, Listing, J, Brandt, J, Braun, J. *et al.* The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part I): classification of paper patients by expert opinion including uncertainty appraisal. *Ann. Rheum. Dis.* **68**, 770–6 (2009).
 24. Guillemin, F, Saraux, A, Guggenbuhl, P, Roux, CH, Fardellone, P, Le Bihan, E, Cantagrel, A. *et al.* Prevalence of rheumatoid arthritis in France: 2001. *Ann Rheum Dis* **64**, 1427–1430 (2005).
 25. Saraux, A, Guillemin, F, Guggenbuhl, P, Roux, C H, Fardellone, P, Le Bihan, E *et al.* Prevalence of spondyloarthropathies in France: 2001. *Ann. Rheum. Dis.* **64**, 1431–1435 (2005).
 26. Sieper J, Rudwaleit M, Khan MA, Braun J. Concepts and epidemiology of spondyloarthritis. 401–17 (2006).
 27. Feldtkeller E, Khan MA, van der Heijde D, van der Linden S, Braun J, . Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int.* **23**, 61–6 (2003).
 28. Saraux A, Guedes C, Allain J, Devauchelle V, Valls I, Lamour A, Guillemin F, Youinou P, Le Goff P. Prevalence of rheumatoid arthritis and spondyloarthropathy in Brittany, France. Société de Rhumatologie de l'Ouest. *J Rheumatol.* **26**, 2622–7 (1999).
 29. Dequeker J, Decock T, Walravens M, I, Van de Putte. HLA B27 prevalence in spondylo-arthropathy syndromes. *Acta Rhumatol* **3**, 144–53 (1979).
 30. Breban, M. Genetics of spondyloarthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **20**, 593–9 (2006).
 31. Andrianakos A, Trontzas P, Christoyannis F, Dantis P, Voudouris C, Georgountzos A, Kaziolas, E. *et al.* Prevalence of rheumatic diseases in Greece: a cross-sectional population based epidemiological study. The ESORDIG Study. *J Rheumatol.* **30**, 1589–601 (2003).
 32. Steven, M. Prevalence of chronic arthritis in four geographical areas of the Scottish Highlands. *Ann. Rheum. Dis.* **51**, 186–194 (1992).

33. Braun J, Bollow M, Remlinger G, Eggens U, Rudwaleit M, Distler A, Sieper J. Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. *Arthritis Rheum.* **41**, 58–67 (1998).
34. Akkoc N, Khan MA. Overestimation of the prevalence of ankylosing spondylitis in the Berlin study. *Arthritis Rheum.* **52**, 4048–9 (2005).
35. Boyer GS, Templin DW, Cornoni-Huntley JC, Everett DF, Lawrence RC, Heyse SF, Miller, MM, Goring WP. Prevalence of spondyloarthropathies in Alaskan Eskimos. *J Rheumatol.* **21**, 2292–7 (1994).
36. Yamaguchi A, Tsuchiya N, Mitsui H, Shiota M, Ogawa A, Tokunaga K, Yoshinoya S, Juji T, Ito K. Association of HLA-B39 with HLA-B27-negative ankylosing spondylitis and pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis in Japanese patients. Evidence for a role of the peptide-anchoring B pocket. *Arthritis Rheum.* **38**, 1672–7 (1995).
37. Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, Tang JP, Taurog JD. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human β 2m: An animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* **63**, 1099–112 (1990).
38. Taurog JD, Maika SD, Satumtira N, Dorris ML, McLean IL, Yanagisawa H, Sayad, A. *et al.* Inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *Immunol Rev.* **169**, 209–23 (1999).
39. Taurog, J. D., Hammert, R. E., Maika, D., Simmons, W. A. & Breban, M. Susceptibility to Inflammatory Disease in HLA-B27 Transgenic Rat Lines Correlates with the level of B27 Expression'. *J. Immunol.* **150**, 68–78 (1993).
40. Mielants H, Veys EM. HLA-B27 related arthritis and bowel inflammation. Part 1. *J Rheumatol* **12**, 287–93 (1985).
41. Mielants, H., Veys, E. M., Cuvelier, C., De Vos, M. & Botelberghe, L. HLA-B27 related arthritis and bowel inflammation. Part 2. Ileocolonoscopy and bowel histology in patients with HLA-B27 related arthritis. *J Rheumatol* **12**, 294–8 (1985).
42. Yanagisawa H, Richardson JA, Taurog JD, Hammer RE. Characterization of psoriasiform and alopecic skin lesions in HLA-B27 transgenic rats. *Am J Pathol.* **147**, 955–64 (1995).
43. Said-Nahal R, Miceli-Richard C, Berthelot JM, Duché A, Dernis-Labous E, Le Blévec, G. *et al.* The familial form of spondylarthropathy: a clinical study of 115 multiplex families. Groupe Français d'Etude Génétique des Spondylarthropathies. *Arthritis Rheum.* **43**, 1356–1365 (2000).
44. Said-Nahal, R. *et al.* Phenotypic diversity is not determined by independent genetic factors in familial spondylarthropathy. *Arthritis Rheum.* **45**, 478–84 (2001).
45. Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernandez-Sueiro JL, *et al.* The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLAB27 transgenic rats. *J Exp Med.* **180**, 2359–64 (1994).
46. Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, Grenther WB, Hamm TE Jr, Balish E, Taurog, JD, Hammer, RE, Wilson KH, Sartor RB. Normal luminal bacteria, especially Bacteroides species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest.* **98**, 945–53 (1996).
47. Breban, M., Hammer, R. E., Richardson, J. A. & Taurog, J. D. Transfer of the Inflammatory Disease of HLA-B27. *J Exp Med* **178**, 1607–16 (1993).

48. Breban M, Fernandez-sueiro JLN, Richardson JA, Hadavand RR, Maika SD, Hammer RE, Taurog JD, Coplekeli G. T cells, but not thymic exposure to HLA-B27, are required for the inflammatory disease of HLA-B27 transgenic rats. *J Immunol* **156**, 794–803 (1996).
49. May, E, Dorris, ML, Satumtira, N, Iqbal, I, Rehman, M., Lightfoot, E. & Taurog, J. CD8 $\alpha\beta$ T Cells Are Not Essential to the Pathogenesis of Arthritis or Colitis in HLA-B27 Transgenic Rats 1. *J. Immunol.* **170**, 1099–1105 (2003).
50. Taurog, JD, Dorris, ML, Satumtira, N, Tran, TM, Sharma, R, Dressel, R., Brandt, J. Van Den & Reichardt, H. Spondylarthritis in HLA-B27 / Human $\beta 2$ -Microglobulin- Transgenic Rats Is Not Prevented by Lack of CD8. *Arthritis Rheum.* **60**, 1977–1984 (2009).
51. Hacquard-Bouder C, Falgarone G, Bosquet A, Smaoui F, Monnet, D., Ittah, M. & Breban, M. Defective costimulatory function is a striking feature of antigen-presenting cells in an HLA-B27-transgenic rat model of spondylarthropathy. *Arthritis Rheum.* **50**, 1624–35 (2004).
52. Hacquard-Bouder C, Chimenti, MS, Giquel B, Donnadiou E, Fert I, Schmit, A., André, C. & Breban, M. Alteration of antigen-independent immunologic synapse formation between dendritic cells from HLA-B27-transgenic rats and CD4⁺ T cells: selective impairment of costimulatory molecule engagement by mature HLA-B27. *Arthritis Rheum.* **56**, 1478–89 (2007).
53. Fert I, Glatigny S, Poulain C, Satumtira N, Dorris ML, JD, Taurog, Breban M. Correlation between dendritic cell functional defect and spondylarthritis phenotypes in HLA-B27/HUMAN beta2-microglobulin-transgenic rat lines. *Arthritis Rheum.* **58**, 3425–9 (2008).
54. Dhaenens M, Fert I, Glatigny S, Haerincx S, Poulain C, Donnadiou E, Hacquard-Bouder C, Andre C , Dirk E, Deforce D, Breban M. Dendritic Cells From Spondylarthritis-Prone HLA- B27 - Transgenic Rats Display Altered Cytoskeletal Dynamics , Class II Major Histocompatibility Complex Expression , and Viability. *Arthritis Rheum.* **60**, 2622–2632 (2009).
55. Breban, M., Hacquard-bouder, C. & Falgarone, G. Animal Models of HLA-B27-Associated Diseases. *Curr. Mol. Med.* **4**, 31–40 (2004).
56. Milia AF, Manetti M, Generini S, Polidori L, Benelli G, Cinelli M, Messerini L, Ibba-Manneschi L, Matucci-Cerinic M. TNF alpha blockade prevents the development of inflammatory bowel disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Cell Mol Med* **13**, 164–76 (2009).
57. Milia, AF, Ibba-manneschi L, Manetti M, Benelli G, Generini S, Messerini, L, Matucci-cerinic, M. Evidence for the prevention of enthesitis in HLA-B27 / h $\beta 2$ m transgenic rats treated with a monoclonal antibody against TNF- α . *J. Cell. Mol. Med.* **15**, 270–279 (2011).
58. Glatigny S, Fert I, B. M. & Lories RJ, Araujo LM, Chiocchia G, Breban M. Proinflammatory Th17 cells are expanded and induced by dendritic cells in spondylarthritis-prone HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis Rheum.* **64**, 110–20 (2012).
59. Utriainen L, Firmin D, Wright P, Cerovic V, Breban M, McInnes I, Milling S. Expression of HLA-B27 causes loss of migratory dendritic cells in a rat model of spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* **64**, 3199–3209 (2012).
60. Hersh, A., Stecher, R., Solomon, W. & Wolpaw, R. Heredity in Ankylosing Spondylitis A Study of Fifty Families. *Am J Hum Genet* **2**, 391–408 (1950).
61. De Blecourt, J., Polman, A. & De Blecourt-Meindersma, T. Hereditary factors in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* **20**, 215–20 (1961).

62. Brown, M., Laval, S., Brophy, S. & Calin, A. Recurrence risk modelling of the genetic susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* **59**, 883–886 (2000).
63. Csonka G. Multiple cases in Reiter's syndrome. *Br J Vener Dis.* **45**, 157–60 (1969).
64. Moll, JMH, Wright V. Familial occurrence of psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* **32**, 181–202 (1973).
65. Scharf Y, Nahir M, Levy N. Familial ulcerative colitis associated with ankylosing spondylitis. *Harefuah* **86**, 30–1 (1974).
66. Dernis, E. *et al.* Recurrence of spondylarthropathy among first-degree relatives of patients: a systematic cross-sectional study. *Ann. Rheum. Dis.* **68**, 502–7 (2009).
67. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD, . Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet* **28**, 904–7 (1973).
68. Christiansen FT, Owen ET, Dawkins RL, Hanrahan P. Symptoms and signs among relatives of patients with HLA B27 ankylosing spondylitis: Correlation between back pain, spinal movement, sacroiliitis, and HLA antigens. *J Rheumatol Suppl.* **3**, 11–7 (1977).
69. Daneo V, Migone N, Modena V, Bianchi SD, Alfieri G, Diotallevi P, Carbonara AO. Family studies and HLA typing in ankylosing spondylitis and sacroiliitis. *Ann Rheum Dis.* **3**, 5–10 (1977).
70. Woodrow, J. & Eastmond, C. HLA B27 and the genetics of ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* **37**, 504–509 (1978).
71. Morris R, Metzger AL, Bluestone R, T. P. HL-A W27-a clue to the diagnosis and pathogenesis of Reiter's syndrome. *N Engl J Med.* **290**, 554–6 (1974).
72. Morris RI, Metzger AL, Bluestone R, Terasaki PI. HL-A-W27-a useful discriminator in the arthropathies of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* **290**, 1117–9 (1974).
73. Feldmann JL, Amor B, Kahan A, Solnik C, Delbarre F. W27 HL-A antigen. Diagnostic value in rheumatology. *Rev Rhum Mal Osteoartic.* **42**, 85–92 (1975).
74. Järvinen P. Occurrence of ankylosing spondylitis in a nationwide series of twins. *Arthritis Rheum.* **38**, 381–3 (1995).
75. Brown MA, Kennedy LG, Macgregor AJ, Darke C, Duncan E, Shatford JL, Taylor A, C. A. & Wordsworth P. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment. *Arthritis Rheum.* **30**, 1823–1828 (1997).
76. Calin A, Marder A, Becks E, Burns T. Genetic differences between B27 positive patients with ankylosing spondylitis and B27 positive healthy controls. *Arthritis Rheum.* **26**, 1460–4 (1983).
77. Van der Linden SM, Valkenburg HA, de Jongh BM, Cats A. The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. A comparison of relatives of spondylitis patients with the general population. *Arthritis Rheum.* **27**, 241–9 (1984).
78. Laval SH, Timms A, Edwards S, Bradbury L, Brophy S, Milicic A, Rubin L, Siminovitch KA, Weeks DE, Calin A, Wordsworth BP, B. M. Whole-genome screening in ankylosing spondylitis: evidence of non-MHC genetic-susceptibility loci. *Am J Hum Genet.* **68**, 918–24 (2001).
79. Miceli-Richard C, Zouali H, Said-Nahal R, Lesage S, Merlin F, De Toma C, Blanche H, Sahbatou M, Dougados M, Thomas G, Breban M, Hugot JP, Groupe Français d'Etude Génétique des

- Spondylarthropathies. Significant linkage to spondyloarthritis on 9q31-34. *Hum Mol Genet.* **13**, 1641–8 (2004).
80. Zhang G, Luo J, Bruckel J, Weisman MA, Schumacher HR, Khan, M. *et al.* Genetic studies in familial ankylosing spondylitis susceptibility. *Arthritis Rheum.* **50**, 2246–54 (2004).
 81. Brown MA, Wordsworth BP, Reveille JD. Genetics of ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol.* **20**, S43–9. (2002).
 82. Reveille, J. The genetic basis of spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **70 Suppl 1**, 44–50 (2011).
 83. Dausset, J. Iso-leuko-antibodies. *Acta Haematol* **20**, 156–66 (1958).
 84. The MHC sequencing Consortium. Complete sequence and genemap of a human major histocompatibility complex. *Nature* **401**, 921–3 (1999).
 85. Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford E, Khodiyar V. *et al.* Gene map of the extended human MHC. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 889–899 (2004).
 86. Stephens R, Horton R, Humphray S, Rowen L, Trowsdale J, Beck S. Gene Organisation, Sequence Variation and Isochore Structure at the Centromeric Boundary of the Human MHC. *J. Mol. Biol.* **291**, 789–99 (1999).
 87. The Wellcome Trust Sanger Institute. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature* **425**, 805–11 (2003).
 88. Thomson G. Investigation of the mode of inheritance of the HLA associated diseases by the method of antigen genotype frequencies among diseased individuals. *Tissue Antigens* **21**, 81–104 (1983).
 89. Rubin LA, Amos CI, Wade JA, Martin JR, Bale SJ, Little AH, Gladman DD, Bonney GE, Rubenstein JD, Siminovitch KA. Investigating the genetic basis for ankylosing spondylitis. Linkage studies with the major histocompatibility complex region. *Arthritis Rheum.* **37**, (1994).
 90. Lochead JA, Chalmers IM, Marshall WH, Larsen B, Skanes VM, Payne RH, Barnard JM. HLA-B27 haplotypes in family studies of ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* **26**, 1011–6 (1983).
 91. Suarez-Almazor ME, Russell AS, . B27 homozygosity and ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* **14**, 302–4 (1987).
 92. Kim TJ, Na KS, Lee HJ, Lee B, Kim TH. HLA-B27 homozygosity has no influence on clinical manifestations and functional disability in ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol.* **27**, 574–9 (2009).
 93. Khan MA, Kushner I, Braun WE, Zachary AA, Steinberg AG. HLA--B27 homozygosity in ankylosing spondylitis: relationship to risk and severity. *Tissue Antigens* **11**, 434–8 (1978).
 94. Jaakkola E, Herzberg I, Laiho K, Barnardo MCN, Pointon J, Kauppi M, Kaarela K, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Wordsworth BP, Brown MA. Finnish HLA studies confirm the increased risk conferred by HLA-B27 homozygosity in ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* **65**, 775–80 (2006).
 95. Robinson WP, van der Linden SM, Khan MA, Rentsch HU, Cats A, Russell A, Thomson G. HLA-Bw60 increases susceptibility to ankylosing spondylitis in HLA-B27+ patients. *Arthritis Rheum.* **32**, 1135–41 (1989).

96. Reveille JD, Maganti RM. Subtypes of HLA-B27: history and implications in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Adv Exp Med Biol* **649**, 159–76 (2009).
97. Dominguez O, Coto E, Martinez-Naves E, Choo SY, López-Larrea C. Molecular typing of HLA-B27 alleles. *Immunogenetics*. **36**, 277–282 (1992).
98. MacLean IL, Iqball S, Woo P, Keat AC, Hughes RA, Kingsley GH, Knight SC. HLA-B27 subtypes in the spondarthropathies. *Clin Exp Immunol* **91**, 214–9 (1993).
99. López-Larrea C, Sujirachato K, Mehra NK, Chiewsilp P, Isarangkura D, Kanga U, Dominguez O, Coto E, Penã M, Setién F, *et al.* HLA-B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis. Evidence for new associations. *Tissue Antigens* **45**, 169–76 (1995).
100. Reveille JD. Major histocompatibility genes and ankylosing spondylitis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **20**, 601–9 (2006).
101. Nasution AR, Mardjuadi A, Kunmartini S, Suryadhana NG, Setyohadi B, Sudarsono D, Lardy NM, Feltkamp TE. HLA-B27 subtypes positively and negatively associated with spondyloarthritis. *J Rheumatol* **24**, 1111–4 (1997).
102. Paladini F, Taccari E, Fiorillo MT, Cauli A, Passiu G, Mathieu A, Punzi L, Lapadula G, Scarpa R, Sorrentino R. Distribution of HLA-B27 subtypes in Sardinia and continental Italy and their association with spondylarthropathies. *Arthritis Rheum.* **52**, 3319–21 (2005).
103. Cauli A, Vacca A, Mameli A, Passiu G, Fiorillo MT, Sorrentino R, Mathieu A. A Sardinian patient with ankylosing spondylitis and HLA-B*2709 co-occurring with HLA-B*1403. *Arthritis Res. Ther.* **56**, 2807–9 (2007).
104. Van Gaalen FA. Does HLA-B*2706 protect against ankylosing spondylitis? A meta-analysis. *Int J Rheum Dis.* **15**, 8–12 (2012).
105. Taurog JD. The Mystery of HLA-B27: If It Isn't One Thing, It's Another. *Arthritis Rheum.* **56**, 2478–81 (2007).
106. Fiorillo MT, Cauli A, Carcassi C, Bitti PP, Vacca A, Passiu G, Bettosini F, Mathieu A, Sorrentino R. Two distinctive HLA haplotypes harbor the B27 alleles negatively or positively associated with ankylosing spondylitis in Sardinia: implications for disease pathogenesis. *Arthritis Rheum.* **48**, 1385–9 (2003).
107. Evans, DM, Spencer, CC, Pointon, JJ, Su, Z, Harvey, D, Kochan, G. *et al.* Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nat. Genet.* **43**, 761–7 (2011).
108. Benjamin R, Parham P. Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol Today* **11**, 137–42 (1990).
109. Ugrinovic S, Mertz A, Wu P, Braun J, Sieper J. A single nonamer from the Yersinia 60-kDa heat shock protein is the target of HLA-B27-restricted CTL response in Yersinia-induced reactive arthritis. *J Immunol* **159**, 5715–23 (1997).
110. Ramos M, Alvarez I, Sesma L, Logean A, Rognan D, López de Castro JA. Molecular mimicry of an HLA-B27-derived ligand of arthritis-linked subtypes with chlamydial proteins. *J Biol Chem.* **277**, 37573–81 (2002).

111. Mear JP, Schreiber KL, Münz C, Zhu X, Stevanović S, Rammensee HG, Rowland-Jones SL, Colbert RA. Misfolding of HLA-B27 as a result of its B pocket suggests a novel mechanism for its role in susceptibility to spondyloarthropathies. *J Immunol.* **163**, 6665–70 (1999).
112. Colbert RA. HLA-B27 misfolding: a solution to the spondyloarthropathy conundrum? *Mol Med Today.* **6**, 224–230 (2000).
113. Dangoria NS, DeLay ML, Kingsbury DJ, Mear JP, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A, Colbert RA. HLA-B27 misfolding is associated with aberrant intermolecular disulfide bond formation (dimerization) in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* **277**, 23459–68 (2002).
114. Allen RL, Raine T, Haude A, Trowsdale J, Wilson MJ. Leukocyte receptor complex-encoded immunomodulatory receptors show differing specificity for alternative HLA-B27 structures. *J Immunol* **167**, 5543–7 (2001).
115. Brown MA, Pile KD, Kennedy LG, Calin A, Darke C, Bell J, Wordsworth BP, Cornélis F. HLA class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the United Kingdom. *Ann. Rheum. Dis.* **55**, 268–70 (1996).
116. Wei, J., Tsai, W., Lin, H., Tsai, C. & Chou, C. HLA-B60 and B61 are strongly associated with ankylosing spondylitis in HLA-B27-negative Taiwan Chinese patients. *Rheumatology (Oxford).* **43**, 839–42 (2004).
117. Van Gaalen FA, Verduijn W, Roelen DL, Böhringer S, Huizinga TW, van der Heijde DM, Toes RE. Epistasis between two HLA antigens defines a subset of individuals at a very high risk for ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* **72**, 974–8 (2013).
118. López-Larrea C, Mijiyawa M, González S, Fernández-Morera JL, Blanco-Gelaz MA, Martínez-Borra J, López-Vázquez A. Association of Ankylosing Spondylitis With HLA-B*1403 in a West African Population. *Arthritis Rheum.* **46**, 2968–71 (2002).
119. Díaz-Peña R, Blanco-Gelaz MA, Njobvu P, López-Vazquez A, Suárez-Alvarez B, López-Larrea C. Influence of HLA-B*5703 and HLA-B*1403 on susceptibility to spondyloarthropathies in the Zambian population. *J Rheumatol* **35**, 2236–41 (2008).
120. Wagener P, Zeidler H, Eckert G, Deicher H. Increased frequency of HLA-Bw62 and Bw35 CREG antigens in HLA-B27 negative ankylosing spondylitis. *Z Rheumatol* **43**, 253–7 (1984).
121. Breban M, Said-Nahal R, Hugot JP, Miceli-Richard C. Familial and genetic aspects of spondyloarthropathy. *Rheum Dis Clin North Am.* **29**, 575–94 (2003).
122. Tsuchiya N, Shiota M, Moriyama S, Ogawa A, Komatsu-Wakui M, Mitsui H, Geraghty DE, Tokunaga K. MICA allele typing of HLA-B27 positive Japanese patients with seronegative spondylarthropathies and healthy individuals: differential linkage disequilibrium with HLA-B27 subtypes. *Arthritis Rheum.* **41**, 68–73 (1998).
123. Martinez-Borra J, Gonzalez S, López-Vazquez A, Gelaz MA, Armas JB, Kanga U, Mehra NK, López-Larrea C. HLA-B27 alone rather than B27-related class I haplotypes contributes to ankylosing spondylitis susceptibility. *Hum. Immunol.* **61**, 131–9 (2000).
124. Amroun, H, Djoudi, H, Busson, M, Allat, R, El Sherbini, SM, Sloma, I. *et al.* Early-onset ankylosing spondylitis is associated with a functional MICA polymorphism. *Hum. Immunol.* **66**, 1057–61 (2005).
125. Zhou, X, Wang, J, Zou, H, Ward, MM, Weisman, MH, Espitia, M. *et al.* MICA, a gene contributing strong susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* (2013).

126. Brown MA, Kennedy LG, Darke C, Gibson K, Pile KD, Shatford JL, A, Taylor, A, Calin, Wordsworth BP. The effect of HLA-DR genes on susceptibility to and severity of ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* **41**, 460–5 (1998).
127. Ploski R, Flatø B, Vinje O, Maksymowych W, Førre O, Thorsby E. Association to HLA-DRB1*08, HLA-DPB1*0301 and homozygosity for an HLA-linked proteasome gene in juvenile ankylosing spondylitis. *Hum Immunol* **44**, 88–96 (1995).
128. Monowarul Islam SM, Numaga J, Fujino Y, Masuda K, Ohda H, Hirata R, Maeda H, Mitsui H. HLA-DR8 and acute anterior uveitis in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* **38**, 547–50 (1995).
129. Said-Nahal R, Miceli-Richard C, Gautreau C, Tamouza R, Borot N, Porcher R, Charron D, Dougados M, Breban M. The role of HLA genes in familial spondyloarthropathy a comprehensive study of 70 multiplex families. *Ann Rheum Dis* **61**, 201–6 (2002).
130. Díaz-Peña R, Aransa AM, Bruges-Armas J, López-Vázquez A, Rodríguez-Ezpeleta N, Mendibil I, Sánchez A, Torre-Alonso JC, Bettencourt BF, Mulero J, Collaes E, López-Larrea C. Fine mapping of a major histocompatibility complex in ankylosing spondylitis: association of the HLA-DPA1 and HLA-DPB1 regions. *Arthritis Rheum.* **63**, 3305–12 (2011).
131. Díaz-Peña R, Castro-Santos P, Aransay AM, Brüges-Armas J, Pimentel-Santos FM, López-Larrea C. Genetic study confirms association of HLA-DPA1(*):01:03 subtype with ankylosing spondylitis in HLA-B27-positive populations. *Hum. Immunol.* **74**, 764–7 (2013).
132. Barron KS, Reveille JD, Carrington M, Mann DL, R. M. Susceptibility to Reiter's syndrome is associated with alleles of TAP genes. *Arthritis Rheum.* **38**, 684–9 (1995).
133. Feng M, Yin B, Shen T, Ma Q, Liu L, Zheng J, Zhao Y, Qian K, Liu D. TAP1 and TAP2 polymorphisms associated with ankylosing spondylitis in genetically homogenous Chinese Han population. *Hum. Immunol.* **70**, 257–61 (2009).
134. Kuipers JG, Raybourne RB, Williams KM, Zeidler H, Yu DT. Specificities of human TAP alleles for HLA-B27 binding peptides. *Arthritis Rheum.* **39**, 1892–5 (1996).
135. Fraile A, Collado MD, Matarán L, Martín J, Nieto A. TAP1 and TAP2 polymorphism in Spanish patients with ankylosing spondylitis. *Exp Clin Immunogenet* **17**, 199–4 (2000).
136. Vargas-Alarcón, G, Gamboa, R, Zuniga, J, Fragoso, JM, Hernández-Pacheco, G, Londoño, J, *et al.* Association study of LMP gene polymorphisms in Mexican patients with spondyloarthritis. *Hum. Immunol.* **65**, 1437–42 (2004).
137. Maksymowych WP, Adlam N, Lind D, Russell AS. Polymorphism of the LMP2 gene and disease phenotype in ankylosing spondylitis: no association with disease severity. *Clin Rheumatol.* **16**, 461–5 (1997).
138. Haroon N, Maksymowych WP, Rahman P, Tsui F, O'Shea WL, Finbar D, Inman RD. Radiographic severity of ankylosing spondylitis is associated with polymorphism of the large multifunctional peptidase 2 gene in the Spondyloarthritis Research Consortium of Canada cohort. *Arthritis Rheum.* **64**, 1119–26 (2012).
139. Fraile, A., Nieto, A., Matarán, L. & Martín, J. HSP70 gene polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* **51**, 382–5 (1998).
140. Milicic, A, Lindheimer, F, Laval, S, Rudwaleit, M, Ackerman, H, Wordsworth, P, Hohler, T, Brown, MA. Interethnic studies of TNF polymorphisms confirm the likely presence of a second MHC susceptibility locus in ankylosing spondylitis. *Genes Immun.* **1**, 418–22 (2000).

141. McGarry F, Walker R, Sturrock R, Field M. The -308.1 polymorphism in the promoter region of the tumor necrosis factor gene is associated with ankylosing spondylitis independent of HLA-B27. *J Rheumatol* **25**, 1110–6 (1999).
142. Vargas-Alarcón G, Casasola-Vargas J, Rodríguez-Pérez JM, Huerta-Sil G, Pérez-Hernández N, Londoño J, Pacheco-Tena C, Cardiel MH, Granados J, Burgos-Vargas R. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with spondyloarthritis. *Hum. Immunol.* **67**, 826–32 (2006).
143. Sousa, El, Caetano-Lopes, J, Pinto, P, Pimentel, F, Teles, J, Canhão, H, Rodrigues, A. & Fonseca, João Eurico. Ankylosing spondylitis susceptibility and severity--contribution of TNF gene promoter polymorphisms at positions -238 and -308. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1173**, 581–8 (2009).
144. Rudwaleit, M, Siebert, S, Yin, Z, Eick, J, Thiel, A, Radbruch, A, Sieper, J, Braun, J. Low T cell production of TNFalpha and IFNgamma in ankylosing spondylitis: its relation to HLA-B27 and influence of the TNF-308 gene polymorphism. *Ann. Rheum. Dis.* **60**, 36–42 (2001).
145. Verjans, G. M., Brinkman, B. M., Van Doornik, C. E., Kijlstra, A. & Verweij, C. L. Polymorphism of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) at position -308 in relation to ankylosing spondylitis. *Clin. Exp. Immunol.* **97**, 45–7 (1994).
146. González S, Torre-Alonso JC, Martínez-Borra J, Fernández Sánchez JA, López-Vazquez A, Rodríguez Pérez A, López-Larrea C. TNF-238A promoter polymorphism contributes to susceptibility to ankylosing spondylitis in HLA-B27 negative patients. *J Rheumatol* **28**, 1288–93 (2001).
147. Lee YH, Song GG. Lack of association of TNF-alpha promoter polymorphisms with ankylosing spondylitis: a meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)*. **48**, 1359–62 (2009).
148. Vargas-Alarcón, G. *et al.* Heat shock protein 70 gene polymorphisms in Mexican patients with spondyloarthropathies. *Ann. Rheum. Dis.* **61**, 48–51 (2002).
149. Brown, MA, Pile, KD, Kennedy, LG, Campbell, D, Andrew, L. *et al.* A genome-wide screen for susceptibility loci in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* **41**, 588–95 (1998).
150. Lee YH, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Ankylosing spondylitis susceptibility loci defined by genome-search meta-analysis. *J. Hum. Genet.* **50**, 453–9 (2005).
151. Carter KW, Pluzhnikov A, Timms AE, Miceli-Richard C, Bourgain C, Wordsworth BP, Jean-Pierre H, Cox NJ, Palmer LJ, Breban M, Reveille JD, B. M. Combined analysis of three whole genome linkage scans for Ankylosing Spondylitis. *Rheumatology (Oxford)*. **46**, 763–71 (2007).
152. Burton, PR, Clayton, DG, Cardon, LR, Craddock, N, Deloukas, P, Duncanson, A. *et al.* Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat. Genet.* **39**, 1329–37 (2007).
153. Reveille, JD, Sims, A, Danoy, P, Evans, DM, Leo, P, Pointon, J. *et al.* Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat. Genet.* **42**, 123–7 (2010).
154. Lin, Z, Bei, JX, Shen, M, Liao, Z, Zhang, Y, Lv, Q *et al.* A genome-wide association study in Han Chinese identifies new susceptibility loci for ankylosing spondylitis. *Nat. Genet.* **44**, 73–77 (2012).
155. Cortes, A, Hadler, J, Pointon, JP, Robinson, PC, Karaderi, T, Leo, P. *et al.* Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat. Genet.* **45**, 730–8 (2013).

156. Saric T, Chang SC, Hattori A, York IA, Markant S, Rock KL, Tsujimoto M, Goldberg AL. An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol.* **3**, 1169–76 (2002).
157. Chang SC, Momburg F, Bhutani N, Goldberg AL. The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a “molecular ruler” mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17107–12 (2005).
158. Cui, X, Hawari, F, Alsaaty, S, Lawrence, M, Combs, CA, Geng, W, Rouhani, FN, Miskinis, D, Levine, SJ. Identification of ARTS-1 as a novel TNFR1-binding protein that promotes TNFR1 ectodomain shedding. *J. Clin. Invest.* **110**, 515–26 (2002).
159. Cui, X., Rouhani, F. N., Hawari, F. & Levine, S. J. Shedding of the type II IL-1 decoy receptor requires a multifunctional aminopeptidase, aminopeptidase regulator of TNF receptor type 1 shedding. *J. Immunol.* **171**, 6814–9 (2003).
160. Cui, X., Rouhani, F. N., Hawari, F. & Levine, S. J. An aminopeptidase, ARTS-1, is required for interleukin-6 receptor shedding. *J. Biol. Chem.* **278**, 28677–85 (2003).
161. Maksymowych WP, Inman RD, Gladman DD, Reeve JP, Pope A, Rahman P, *et al.* Association of a specific ERAP1/ARTS1 haplotype with disease susceptibility in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* **60**, 1317–23 (2009).
162. Tsui FWL, Haroon N, Reveille JD, Rahman P, Chiu B, Tsui HW, Inman RD. Association of an ERAP1 ERAP2 haplotype with familial ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 733–6 (2010).
163. Harvey, D. *et al.* Investigating the genetic association between ERAP1 and ankylosing spondylitis. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 4204–12 (2009).
164. Pimentel-Santos FM, Ligeiro D, Matos M, Mourão AF, Sousa E, Pinto P, Ribeiro A, Sousa M, Barcelos A, Godinho F, Cruz M, Fonseca JE, Guedes-Pinto H, Trindade H, Evans DM, Brown MA, Branco JC, . Association of IL23R and ERAP1 genes with ankylosing spondylitis in a Portuguese population. *Clin Exp Rheumatol.* **27**, 800–6 (2009).
165. Sáfrány E, Pazár B, Csöngéi V, Járomi L, Polgár N, Sipeky C, Horváth IF, Zeher M, Poór G, Melegh B. Variants of the IL23R Gene are Associated with Ankylosing Spondylitis but not with Sjögren Syndrome in Hungarian Population Samples. *Scand J Immunol.* **70**, 68–74 (2009).
166. Cherciu, M, Popa, LO, Bojinca, M, Dutescu, MI, Bojinca, V, Bara, C, Popa, O M. Functional variants of ERAP1 gene are associated with HLA-B27 positive spondyloarthritis. *Tissue Antigens* (2013).
167. Davidson SI, Wu X, Liu Y, Wei M, Danoy PA, Thomas G, Cai Q, Sun L, Duncan E, Wang N, Yu Q, Xu A, Fu Y, Brown MA, Xu H. Association of ERAP1, but not IL23R, with ankylosing spondylitis in a Han Chinese population. *Arthritis Rheum.* **60**, 3263–8 (2009).
168. Kadi A, Izac B, Said-Nahal R, Leboime A, Van Praet L, de Vlam K, Elewaut D, Chiocchia G, Breban M. Investigating the genetic association between ERAP1 and spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **72**, 608–13 (2013).
169. Haroon, N., Tsui, F. W., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A. & Inman, R. D. Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) exhibits functionally significant interaction with HLA-B27 and relates to subtype specificity in ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* **71**, 589–95 (2012).
170. Yan, J, Parekh, VV, Mendez-Fernandez, Y, Olivares-Villagómez, D, Dragovic, S, Hill, Ti, Roopenian, DC, Joyce, S, Van Kaer, L. In vivo role of ER-associated peptidase activity in tailoring peptides for presentation by MHC class Ia and class Ib molecules. *J. Exp. Med.* **203**, 647–59 (2006).

171. Hammer, G. E., Gonzalez, F., James, E., Nolla, H. & Shastri, N. In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides. *Nat. Immunol.* **8**, 101–8 (2007).
172. Goto, Y., Hattori, A., Ishii, Y. & Tsujimoto, M. Reduced activity of the hypertension-associated Lys528Arg mutant of human adipocyte-derived leucine aminopeptidase (A-LAP)/ER-aminopeptidase-1. *FEBS Lett.* **580**, 1833–8 (2006).
173. Evnouchidou, I, Kamal, RP, Seregin, SS, Goto, Y, Tsujimoto, M, Hattori, A. *et al.* Cutting Edge: Coding single nucleotide polymorphisms of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 can affect antigenic peptide generation in vitro by influencing basic enzymatic properties of the enzyme. *J. Immunol.* **186**, 1909–13 (2011).
174. Kochan, G, Krojer, T, Harvey, D, Fischer, R, Chen, L, Vollmar, M, von Delft, F, Kavanagh, K. & Brown, MA, Bowness, P, Wordsworth, P, Kessler, BM, Oppermann, Udo. Crystal structures of the endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 (ERAP1) reveal the molecular basis for N-terminal peptide trimming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 7745–50 (2011).
175. Pastinen, T, Ge, B, Gurd, S, Gaudin, T, Dore, C, Lemire, M., Lepage, P., Harmsen, E. & Hudson, T. J. Mapping common regulatory variants to human haplotypes. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 3963–71 (2005).
176. Dixon, AL, Liang, L, Moffatt, MF, Chen, W, Heath, S, Wong, K. *et al.* A genome-wide association study of global gene expression. *Nat. Genet.* **39**, 1202–7 (2007).
177. Campbell, E. C. *et al.* Expression of MHC class I dimers and ERAP1 in an ankylosing spondylitis patient cohort. *Immunology* **133**, 379–85 (2011).
178. Nguyen, TT, Chang, SC, Evnouchidou, I, York, IA, Zikos, C, Rock, KL, Goldberg, AL, Stratikos, E, Stern, LJ. Structural basis for antigenic peptide precursor processing by the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 604–13 (2011).
179. Duerr, RH, Taylor, KD, Brant, SR, Rioux, JD, Silberg, MS, Daly, M. J. *et al.* A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* **314**, 1461–3 (2006).
180. Cargill, M, Schrodli, SJ, Chang, M, Garcia, VE, Brandon, R, Callis, K. P. *et al.* A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am. J. Hum. Genet.* **80**, 273–90 (2007).
181. Rahman, P, Inman, RD, Gladman, DD, Reeve, JP, Peddle, L, Maksymowych, WP. Association of interleukin-23 receptor variants with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* **58**, 1020–5 (2008).
182. Rueda, B, Orozco, G, Raya, E, Fernandez-Sueiro, JL, Mulero, J, Blanco, FJ, Vilches, C, González-Gay, M, Martin, J. The IL23R Arg381Gln non-synonymous polymorphism confers susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 1451–4 (2008).
183. Karaderi, T, Harvey, D, Farrar, C, Appleton, LH, Stone, M, Sturrock, RD, Brown, M. a, Wordsworth, P. & Pointon, J. J. Association between the interleukin 23 receptor and ankylosing spondylitis is confirmed by a new UK case-control study and meta-analysis of published series. *Rheumatology (Oxford)*. **48**, 386–9 (2009).
184. Sung IH, Kim TH, Bang SY, Kim TJ, Lee B, Peddle L, Rahman P, Greenwood CM, Hu P, Inman RD. IL-23R polymorphisms in patients with ankylosing spondylitis in Korea. *J Rheumatol* **36**, 1003–5 (2009).
185. Wendling, D., Cedoz, J.-P., Racadot, E. & Dumoulin, G. Serum IL-17, BMP-7, and bone turnover markers in patients with ankylosing spondylitis. *Joint. Bone. Spine* **74**, 304–5 (2007).

186. Jandus, C, Bioley, G, Rivals, JP, Dudler, J, Speiser, D, Romero, P. Increased numbers of circulating polyfunctional Th17 memory cells in patients with seronegative spondylarthritides. *Arthritis Rheum.* **58**, 2307–17 (2008).
187. Coffre, M, Roumier, M, Rybczynska, M, Sechet, E, Law, HKW, Gossec, L., Dougados, M., Bianchi, E. & Rogge, L. Combinatorial control of Th17 and Th1 cell functions by genetic variations in genes associated with the interleukin-23 signaling pathway in spondyloarthritis. *Arthritis Rheum.* **65**, 1510–21 (2013).
188. McGarry F, Neilly J, Anderson N, Sturrock R, Field M. A polymorphism within the interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene is associated with ankylosing spondylitis. *Rheumatol.* **40**, 1359–64 (2001).
189. Jin GX, Duan JZ, Guo WL, Li L, Cui SQ, Wang H. Association between IL-1RN gene polymorphisms and susceptibility to ankylosing spondylitis: a large Human Genome Epidemiology review and meta-analysis. *Genet Mol Res.* **12**, 1720–30 (2013).
190. Djouadi, K, Nedelec, B, Tamouza, R, Genin, E, Ramasawmy, R, Charron, D, Delpuch, M, Laoussadi, S. Interleukin 1 gene cluster polymorphisms in multiplex families with spondylarthropathies. *Cytokine* **13**, 98–103 (2001).
191. Timms, AE, Crane, AM, Sims, AM, Cordell, HJ, Bradbury, L, Abbott, A. *et al.* The interleukin 1 gene cluster contains a major susceptibility locus for ankylosing spondylitis. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 587–95 (2004).
192. Lea, W.-I. & Lee, Y. H. The associations between interleukin-1 polymorphisms and susceptibility to ankylosing spondylitis: a meta-analysis. *Joint. Bone. Spine* **79**, 370–4 (2012).
193. Maksymowych, WP, Rahman, P, Reeve, JP, Gladman, DD, Peddle, Lynette, Inman, RD. Association of the IL1 gene cluster with susceptibility to ankylosing spondylitis: an analysis of three Canadian populations. *Arthritis Rheum.* **54**, 974–85 (2006).
194. Sims, AM, Timms, AE, Bruges-Armas, J, Burgos-Vargas, R, Chou, CT, Doan, T. *et al.* Prospective meta-analysis of interleukin 1 gene complex polymorphisms confirms associations with ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 1305–9 (2008).
195. Monnet D, Kadi A, Izac B, Lebrun N, Letourneur F, Zinovieva E, Said-Nahal R, Chiocchia G, Breban M. Association between the IL-1 family gene cluster and spondyloarthritis.pdf. *Ann Rheum Dis* **71**, 885–90 (2012).
196. Kaluza, W, Leirisalo-Repo, M, Märker-Hermann, E, Westman, P, Reuss, E, Hug, R. *et al.* IL10.G microsatellites mark promoter haplotypes associated with protection against the development of reactive arthritis in Finnish patients. *Arthritis Rheum.* **44**, 1209–14 (2001).
197. Goedecke V, Crane AM, Jaakkola E, Kaluza W, Laiho K, Weeks, D. *et al.* Interleukin 10 polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Genes Immun.* **4**, 74–6. (2003).
198. Mastrovic Radoncic K, Kaluza-Schilling W, Cikes N, Märker-Hermann E. Association of interleukin-10 G microsatellite polymorphism with the susceptibility of ankylosing spondylitis. *Jt. Bone Spine.* **80**, 113–4 (2013).
199. D’Amato M. The Crohn’s associated NOD2 3020InsC frameshift mutation does not confer susceptibility to ankylosing spondylitis. *J Rheumatol.* **29**, 2470–1 (2002).
200. Beyeler C, Armstrong M, Bird HA, Idle JR, Daly AK. Relationship between genotype for the cytochrome. *Ann. Rheum. Dis.* **55**, 66–8 (1996).

201. Brown, MA, Edwards, S, Hoyle, E, Campbell, S, Laval, S, Daly, A. *et al.* Polymorphisms of the CYP2D6 gene increase susceptibility to ankylosing spondylitis. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1563–6 (2000).
202. Erden G, Acar FS, Inal EE, Soydas AO, Ozoran K, Bodur H, Yildirimkaya MM. Frequency of mutated allele CYP2D6*4 in the Turkish ankylosing spondylitis patients and healthy controls. *Rheumatol Int.* **29**, 1431–4 (2009).
203. Tsui, FWL, Tsui, HW, Cheng, EY, Stone, M, Payne, U, Reveille, JD, Shulman, M. J., Paterson, A. D. & Inman, R. D. Novel genetic markers in the 5'-flanking region of ANKH are associated with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* **48**, 791–7 (2003).
204. Snelgrove T, Lim S, Greenwood C, Peddle L, Hamilton S, Inman R, Rahman P. Association of toll-like receptor 4 variants and ankylosing spondylitis: a case-control study. *J Rheumatol.* **34**, 368–70 (2007).
205. Lopez-Larrea, C, Blanco-Gelaz, MA, Torre-Alonso, JC, Bruges Armas, J, Suarez-Alvarez, B. *et al.* Contribution of KIR3DL1/3DS1 to ankylosing spondylitis in human leukocyte antigen-B27 Caucasian populations. *Arthritis Res. Ther.* **8**, R101 (2006).
206. Tsui HW, Inman RD, Reveille JD, Tsui FW. Association of a TNAP haplotype with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* **56**, 234–43 (2007).
207. Timms, AE, Zhang, Y, Bradbury, L, Wordsworth, BP, Brown, MA. Investigation of the role of ANKH in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* **48**, 2898–902 (2003).
208. Harvey D, Pointon JJ, Sleator C, Meenagh A, Farrar C, Sun JY, Senitzer D, Middleton D, Brown MA, Wordsworth BP, . Analysis of killer immunoglobulin-like receptor genes in ankylosing spondylitis.pdf. *Ann Rheum Dis* **68**, 595–8 (2009).
209. Gergely, P., Blazsek, A., Weiszhár, Z., Pazár, B. & Poór, G. Lack of genetic association of the Toll-like receptor 4 (TLR4) Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms with spondylarthropathies in a Hungarian population. *Rheumatology (Oxford)*. **45**, 1194–6 (2006).
210. Cheng N, Cai Q, Fang M, Duan S, Lin J, Hu J, Chen R, Sun S. No significant association between genetic polymorphisms in the TNAP gene and ankylosing spondylitis in the Chinese Han population. *Rheumatol Int.* **29**, 305–10 (2009).
211. Van der Paardt M, Crusius JB, García-González MA, Dijkmans BA, Peña AS, van der H.-B. I. Susceptibility to ankylosing spondylitis: no evidence for the involvement of transforming growth factor beta 1 (TGFB1) gene polymorphisms. *Ann Rheum Dis* **64**, 616–9 (2005).
212. Orozco, G, García-Porrúa, C, López-Nevot, M a, Raya, E, González-Gay, M a, Martín, J. Lack of association between ankylosing spondylitis and a functional polymorphism of PTPN22 proposed as a general susceptibility marker for autoimmunity. *Ann. Rheum. Dis.* **65**, 687–8 (2006).
213. Jin, L, Weisman, M, Zhang, G, Ward, M, Luo, J, Bruckel, J. *et al.* Lack of association of matrix metalloproteinase 3 (MMP3) genotypes with ankylosing spondylitis susceptibility and severity. *Rheumatology (Oxford)*. **44**, 55–60 (2005).
214. Lee, SH, Lee, YA, Woo, DH, Song, R, Park, E. *et al.* Association of the programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphism with ankylosing spondylitis in the Korean population. *Arthritis Res. Ther.* **8**, R163 (2006).
215. Davidson, SI, Liu, Y, Danoy, P, Wu, X, Thomas, GP, Jiang, L, Sun, L. *et al.* Association of STAT3 and TNFRSF1A with ankylosing spondylitis in Han Chinese. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 289–92 (2011).

216. Shehab DK, Al-Jarallah KF, Al-Awadhi AM, Al-Herz A, Nahar I, Haider MZ. Association of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene insertion-deletion polymorphism with spondylarthropathies. *J Biomed Sci.* **15**, 67–8 (2008).
217. Furuichi, T, Maeda, K, Chou, CT, Liu, YF, Liu, TC, Miyamoto, Y, Takahashi, A. *et al.* Association of the MSX2 gene polymorphisms with ankylosing spondylitis in Japanese. *J. Hum. Genet.* **53**, 419–24 (2008).
218. Azizi E, Massoud A, Amirzargar AA, Mahmoudi M, Soleimanifar N, Rezaei N, Jamshidi AR, Nikbin B, Nicknam MH. Association of CTLA4 gene polymorphism in Iranian patients with ankylosing spondylitis. *J Clin Immunol.* **30**, 268–71 (2010).
219. Pointon, JJ, Harvey, D, Karaderi, T, Appleton, LH, Farrar, C, Wordsworth, BP. The histone demethylase JARID1A is associated with susceptibility to ankylosing spondylitis. *Genes Immun.* **12**, 395–8 (2011).
220. Hung YH, Ou TT, Lin CH, Li RN, Lin YC, Tsai WC, Liu HW, Y. J. IkBa promoter polymorphisms in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int.* **30**, 93–7 (2009).
221. Thomas, G. P. & Brown, M. a. Genetics and genomics of ankylosing spondylitis. *Immunol. Rev.* **233**, 162–80 (2010).
222. Rajeevan MS, Ranamukhaarachchi DG, Vernon SD, Unger ER. Use of Real-Time Quantitative PCR to Validate the.pdf. *Methods.* **25**, 443–51 (2001).
223. Rihl M, Baeten D, Seta N, Gu J, De Keyser F, Veys EM, Kuipers JG, Zeidler H, Yu DT. Technical validation of cDNA based microarray as screening technique to identify candidate genes in synovial tissue biopsy specimens from patients with spondyloarthritis.pdf. *Ann Rheum Dis* **63**, 498–507 (2004).
224. Rihl, M, Kellner, H, Kellner, W, Barthel, C, Yu, DTY, Tak, PP Zeidler, H. & Baeten, D. Identification of interleukin-7 as a candidate disease mediator in spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* **58**, 3430–5 (2008).
225. Laukens, D, Peeters, H, Cruyssen, BV, Boonefaes, T, Elewaut, D, De Keyser, F. *et al.* Altered gut transcriptome in spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **65**, 1293–300 (2006).
226. Sharma, SM, Choi, D, Planck, SR, Harrington, Ca, Austin, CR, Lewis, JA, Diebel, T. N., Martin, T. M., Smith, J. R. & Rosenbaum, J. T. Insights in to the pathogenesis of axial spondyloarthritis based on gene expression profiles. *Arthritis Res. Ther.* **11**, R168 (2009).
227. Assassi, S, Reveille, JD, Arnett, FC, Weisman, MH, Ward, MM, Agarwal, S. K. *et al.* Whole-blood gene expression profiling in ankylosing spondylitis shows upregulation of toll-like receptor 4 and 5. *J. Rheumatol.* **38**, 87–98 (2011).
228. Pimentel-Santos, FM, Ligeiro, D, Matos, M, Mourão, AF, Costa, J. *et al.* Whole blood transcriptional profiling in ankylosing spondylitis identifies novel candidate genes that might contribute to the inflammatory and tissue-destructive disease aspects. *Arthritis Res. Ther.* **13**, R57 (2011).
229. Haroon, N, Tsui, FWL, O’Shea, FD, Chiu, B, Tsui, HW, Zhang, H, Marshall, K. W. & Inman, R. D. From gene expression to serum proteins: biomarker discovery in ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 297–300 (2010).
230. Gu, J, Märker-Hermann, E, Baeten, D, Tsai, WC, Gladman, D, Xiong, M. *et al.* A 588-gene microarray analysis of the peripheral blood mononuclear cells of spondyloarthritis patients. *Rheumatology (Oxford).* **41**, 759–66 (2002).

231. Gu, J, Wei, YL, Wei, JCC, Huang, F, Jan, MS, Centola, M, Frank, MB, Yu, D. Identification of RGS1 as a candidate biomarker for undifferentiated spondylarthritis by genome-wide expression profiling and real-time polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum.* **60**, 3269–79 (2009).
232. Duan, R., Leo, P., Bradbury, L., Brown, M. a & Thomas, G. Gene expression profiling reveals a downregulation in immune-associated genes in patients with AS. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 1724–9 (2010).
233. Smith, Ja, Barnes, MD, Hong, D, DeLay, ML, Inman, RD, Colbert, R. A. Gene expression analysis of macrophages derived from ankylosing spondylitis patients reveals interferon-gamma dysregulation. *Arthritis Rheum.* **58**, 1640–9 (2008).
234. Fert I, Cagnard N, Glatigny S, Letourneur F, Jacques S, Smith J A, Colbert RA, Taurog JD, Chiocchia G, Araujo LM, Breban M. Reverse interferon signature is characteristic of antigen-presenting cells in human and rat spondyloarthritis. *Abstr. ACR*
235. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA.pdf. *Science* **285**, 727–9 (1999).
236. Azuz-Lieberman, N, Markel, G, Mizrahi, S, Gazit, R, Hanna, J, Achdout, H. *et al.* The involvement of NK cells in ankylosing spondylitis. *Int. Immunol.* **17**, 837–45 (2005).
237. Al-Mossawi, M., Ridley, A., Kiedel, S. & Bowness, P. The role of natural killer cells, gamma delta T-cells and other innate immune cells in spondyloarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **25**, 434–9 (2013).
238. Kollnberger, S, Bird, L, Sun, MY, Retiere, C, Braud, VM, McMichael, A. & Bowness, P. Cell-surface expression and immune receptor recognition of HLA-B27 homodimers. *Arthritis Rheum.* **46**, 2972–82 (2002).
239. Chan AT, Kollnberger SD, Wedderburn LR, B. P. Expansion and Enhanced Survival of Natural Killer Cells Expressing the Killer Immunoglobulin-Like Receptor KIR3DL2 in Spondyloarthritis. *Arthritis Rheum.* **52**, 3586–95. (2005).
240. Schett G, Tohidast-Akrad M, Smolen JS, Schmid BJ, Steiner CW, Bitzan P, Zenz, P., Redlich, K., Xu, Q. & Steiner, G. Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-JUN N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **43**, 2501–12 (2000).
241. Böhm, C, Hayer, S, Kilian, A, Zaiss, MM, Finger, S, Hess, A. *et al.* The alpha-isoform of p38 MAPK specifically regulates arthritic bone loss. *J. Immunol.* **183**, 5938–47 (2009).
242. Sahlberg, A. S. *et al.* Evidence that the p38 MAP kinase pathway is dysregulated in HLA-B27-expressing human monocytic cells: correlation with HLA-B27 misfolding. *Arthritis Rheum.* **56**, 2652–62 (2007).
243. Reveille, J. D., Hirsch, R., Dillon, C. F., Carroll, M. D. & Weisman, M. H. The prevalence of HLA-B27 in the US: data from the US National Health and Nutrition Examination Survey, 2009. *Arthritis Rheum.* **64**, 1407–11 (2012).
244. Zervas J, Constantopoulos C, Toubis M, Anagnostopoulos D, Cotsovoulou V. HLA-A and B antigens and pulmonary tuberculosis in Greeks. *Br J Dis Chest.* **81**, 147–9. (1987).
245. Slobodin, G, Kessel, A, Kofman, N, Toubi, E, Rosner, I, Odeh, M. Phenotype of resting and activated monocyte-derived dendritic cells grown from peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis. *Inflammation* **35**, 772–5 (2012).

246. Lin, C.-H. & Hünig, T. Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist. *Eur. J. Immunol.* **33**, 626–38 (2003).
247. Krause, L, Fert, I, Labroquère, K, Andrieu, M, Chiocchia, G, Breban, M. Regulatory T Cells in Spondyloarthritis (SpA) Animal Model and Modulatory Role of Inducible Costimulator (ICOS). **64**, S260–261 (2012).
248. Zhu JYD., Zhu, J. & Yu, DTY. Matrix metalloproteinase expression in the spondyloarthropathies.pdf. *Curr Opin Rheumatol.* **18**, 364–8 (2006).
249. Maksymowych, WP, Landewé, R, Conner-Spady, B, Dougados, M, Mielants, H, van der Tempel, H., Poole, a R., Wang, N. & van der Heijde, D. Serum matrix metalloproteinase 3 is an independent predictor of structural damage progression in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* **56**, 1846–53 (2007).
250. Matthey, DL, Packham, JC, Nixon, NB, Coates, L, Creamer, P, Hailwood, S., Taylor, G. J. & Bhalla, A. K. Association of cytokine and matrix metalloproteinase profiles with disease activity and function in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res. Ther.* **14**, R127 (2012).
251. Johnson, K., Hashimoto, S., Lotz, M., Pritzker, K. & Terkeltaub, R. Interleukin-1 induces pro-mineralizing activity of cartilage tissue transglutaminase and factor XIIIa. *Am. J. Pathol.* **159**, 149–63 (2001).
252. Hoppe, B, Häupl, T, Skapenko, A, Ziemer, S, Tauber, R, Salama, A., Schulze-Koops, H., Burmester, G.-R. & Dörner, T. Fibrinogen and factor XIII A-subunit genotypes interactively influence C-reactive protein levels during inflammation. *Ann. Rheum. Dis.* **71**, 1163–9 (2012).
253. Sarraj, B., Ludányi, K., Glant, T. T., Finnegan, A. & Mikecz, K. Expression of CD44 and L-selectin in the innate immune system is required for severe joint inflammation in the proteoglycan-induced murine model of rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* **177**, 1932–40 (2006).
254. Bhattacharya, S. *et al.* Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1. *Genes Dev.* **13**, 64–75 (1999).
255. Bragança, J, Swingler, T, Marques, FIR, Jones, T, Eloranta, JJ, Hurst, HC, Shioda, T. & Bhattacharya, S. Human CREB-binding protein/p300-interacting transactivator with ED-rich tail (CITED) 4, a new member of the CITED family, functions as a co-activator for transcription factor AP-2. *J. Biol. Chem.* **277**, 8559–65 (2002).
256. Lou, X, Sun, S, Chen, W, Zou, Y, Huang, Y, Liu, Xing, Chan, Y. & Wang, C. Negative feedback regulation of NF-κB action by CITED2 in the nucleus. *J. Immunol.* **186**, 539–548 (2011).
257. Bai, L, Merchant, JL, Longchuan, B, Merchant J. A role for CITED2, a CBP/p300 interacting protein, in colon cancer cell invasion. *FASEB J.* **581**, 5904–5910 (2008).
258. Leong, DJ, Li, YH, Gu, XI, Sun, L, Zhou, Z, Nasser, P, Laudier, DM, Iqbal, J. *et al.* Physiological loading of joints prevents cartilage degradation through CITED2. *FASEB J.* **25**, 182–91 (2011).
259. Goldring, S. R. & Goldring, M. B. Eating bone or adding it: the Wnt pathway decides. *Nat. Med.* **13**, 133–4 (2007).
260. Laine, CM, Joeng, KS, Campeau, PM, Kiviranta, R, Tarkkonen, K, Grover, M, Lu, JT, Pekkinen, M. *et al.* WNT1 mutations in early-onset osteoporosis and osteogenesis imperfecta. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1809–16 (2013).

261. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, MacDougald OA. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 3324–3329 (2005).
262. Manicassamy, S, Reizis, B, Ravindran, R, Nakaya, H, Salazar-Gonzalez, RM, Wang, Y. & Pulendran, B. Activation of beta-catenin in dendritic cells regulates immunity versus tolerance in the intestine. *Science* **329**, 849–53 (2010).
263. Baeten, D., Breban, M., Lories, R., Schett, G. & Sieper, J. Are spondylarthritides related but distinct conditions or a single disease with a heterogeneous phenotype? *Arthritis Rheum.* **65**, 12–20 (2013).
264. Nishita, M, Yoo, SK, Nomachi, A, Kani, S, Sougawa, N, Ohta, Y, Takada, S., Kikuchi, A. & Minami, Y. Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase Ror2 is required for Wnt5a-induced cell migration. *J. Cell Biol.* **175**, 555–62 (2006).
265. Lo HS, Wang Z, Hu Y, Yang HH, Gere S, Buetow KH, L. M. Allelic variation in gene expression is common in the human genome.pdf. *Genome Res.* **13**, 1855–62 (2003).
266. Seregin, SS, Rastall, DPW, Evnouchidou, I, Aylsworth, CF, Quiroga, D, Kamal, R. *et al.* Endoplasmic reticulum aminopeptidase-I alleles associated with increased risk of ankylosing spondylitis reduce HLA-B27 mediated presentation of multiple antigens. *Autoimmunity* (2013).
267. Reeves, E., Edwards, C. J., Elliott, T. & James, E. Naturally occurring ERAP1 haplotypes encode functionally distinct alleles with fine substrate specificity. *J. Immunol.* **191**, 35–43 (2013).
268. Serwold T, Gonzalez F, Kim J, Jacob R, S. N. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum.pdf. *Nature* **3**, 480–3 (2002).
269. Fruci D, Ferracuti, S, Limongi, MZ, Cunsolo, V, Giorda, E, Fraioli, R. *et al.* Expression of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidases in EBV-B Cell Lines from Healthy Donors and in Leukemia/Lymphoma, Carcinoma, and Melanoma Cell Lines. *J. Immunol.* **176**, 4869–79 (2006).
270. Saveanu L, Carroll O, Lindo V, Del Val M, Lopez D, Lepelletier Y, Greer F, Schomburg L, Fruci D, Niedermann G, van E. P. Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum.pdf. *Nat Immunol.* **6**, 689–97 (2005).
271. York IA, Chang SC, Saric T, Keys JA, Favreau JM, Goldberg AL, R. K. The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues.pdf. *Nat Immunol.* **3**, 1177–84. (2002).
272. Vandooren, B, Kruithof, E, Yu, DTY, Rihl, M, Gu, J, Rycke, LD, Bosch, FVD, Veys, Eric, M, Keyser, FD, Baeten, D. Involvement of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Peripheral Synovitis and Down-Regulation by Tumor Necrosis Factor alpha Blockade in Spondylarthropathy. *Arthritis Rheum.* **50**, 2942–2953 (2004).
273. Yokota, H., Goldring, M. B. & Sun, HB. CITED2-mediated regulation of MMP-1 and MMP-13 in human chondrocytes under flow shear. *J. Biol. Chem.* **278**, 47275–80 (2003).
274. Lee, J. Y. *et al.* Identification of CITED2 as a negative regulator of fracture healing. *Biochem Biophys Res Commun.* **387**, 641–5 (2010).
275. Sun, H. B. CITED2 mechanoregulation of matrix metalloproteinases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1192**, 429–36 (2010).