

# Physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde

## Pathogeny of rheumatoid arthritis

● J. Morel

### Points forts

- Les variations alléliques du gène *PTPN22* (C/T) sont associées à la PR, et en particulier aux formes séropositives pour le facteur rhumatoïde.
- Les allèles HLA codant pour l'épitope partagé sont associés aux PR avec anti-CCP, et l'allèle HLA-DRB1\*03 aux PR sans anti-CCP suggérant un mécanisme physiopathologique différent.
- Le gène *RANKL* est un nouveau gène candidat de la PR.
- Le lymphocyte B pourrait jouer un rôle dans la résorption osseuse sous-chondrale.
- L'etanercept modifierait l'architecture des follicules lymphoïdes et l'homéostasie des lymphocytes B par inhibition de la lymphotoxine  $\alpha$ .
- DKK-1, une protéine inhibitrice de la différenciation des ostéoblastes, pourrait jouer un rôle dans la résorption osseuse observée dans la PR.
- Les synoviocytes fibroblastiques de PR (FLS) stimulés par le TNF $\alpha$  produisent DKK-1 et un facteur de survie des lymphocytes B (BAFF).

### GÉNÉTIQUE DE LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE

● La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie multifactorielle impliquant à la fois des facteurs environnementaux et génétiques. La part de la génétique représente, selon les études, entre 13 et 25 % de l'ensemble des facteurs responsables de la PR. Pour identifier des gènes impliqués dans la PR, deux techniques peuvent être utilisées. La première utilise des marqueurs microsatellites de 2 à 4 bases nucléotidiques capables de retrouver des polymorphismes sur les gènes analysés. Cette technique est souvent employée dans les études d'association intrafamiliales pour rechercher une liaison génétique avec une maladie, mais elle apporte peu d'informations si le typage des parents n'est pas disponible

pour plusieurs membres de la famille. Une seconde technique, appelée SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), consiste à rechercher le polymorphisme d'un seul nucléotide. Cette technique est plus facilement applicable depuis que l'ensemble du génome humain est disponible, car, dès qu'une variation nucléotidique est décrite, elle est comparée aux génomes de référence. Cette méthode est plus informative que la première, même en l'absence du typage génétique des parents, mais elle demande d'énormes moyens technologiques et informatiques. L'équipe de Gregersen a lancé, en 1995, une étude génétique NARAC (*North American Rheumatoid Arthritis Consortium*), qui a inclus 783 familles ayant au moins deux membres atteints de PR avec des érosions radiographiques pour au moins l'un d'entre eux. La recherche d'une liaison génétique dans ces familles a été effectuée par la technique du SNP (Gregersen, 1170). Les résultats confirment que la PR est une maladie polygénique et que des gènes d'intérêt se trouvent surtout sur le chromosome 6, ce qui est peu surprenant, car les locus des gènes *HLA* se situent sur ce chromosome. D'autres polymorphismes se situent, par ordre décroissant de probabilité de liaison à la PR, sur les chromosomes 11, 2, 5 et 10. Cette technique a cependant des limites, puisque le polymorphisme du gène *PTPN22*, désormais considéré comme le deuxième gène associé à la PR, n'a pu être identifié avec cette méthode. Le gène *PTPN22*, localisé sur le chromosome 1p13, code pour une protéine tyrosine phosphatase non associée au récepteur (*PTPN22*) appelée Lyp et qui inhibe l'activation des lymphocytes T (figure 1). En effet, la phosphatase Lyp interagit avec une protéine kinase Csk et bloque ainsi la transmission du signal intracellulaire contrôlant l'activation des lymphocytes T. Un polymorphisme au niveau du gène *PTPN22* a été

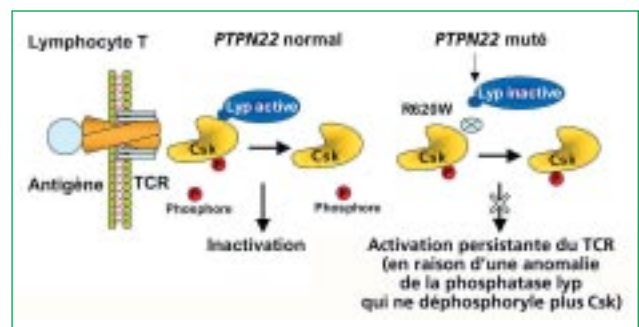


Figure 1. Effet de la mutation *PTPN22* sur l'activation des lymphocytes T. La mutation *PTPN22* (1858 C/T) se traduit, au niveau de la protéine phosphatase Lyp, par le remplacement d'une arginine par un tryptophane qui empêche l'interaction entre Lyp et la protéine kinase Csk. Celle-ci ne peut être inhibée : le lymphocyte T reste donc activé.

récemment décrit et correspond au remplacement d'une cystéine (C) par une tyrosine (T) en position 1858 (1858 C/T). Cette variation nucléotidique se traduit au niveau protéique par le remplacement d'une arginine par un tryptophane en position 620 (R620W). La région dans laquelle se situe cette substitution correspond à un domaine P1 riche en proline qui permet la liaison entre la phosphatase et la kinase Csk. La substitution R620W empêche l'interaction entre la phosphatase Lyp et la kinase Csk, qui ne peut plus, par conséquent, être inhibée. La kinase Csk reste donc activée, ce qui se traduit par une activation anormale et persistante des lymphocytes T. Une association entre le gène *PTPN22* et la PR a été décrite pour la première fois dans une population nord-américaine. Depuis, ce résultat a été confirmé par des études menées chez d'autres populations et, dans certaines de ces études, le variant allélique de *PTPN22* est surtout associé aux PR avec facteur rhumatoïde. Dans une étude anglaise, les fréquences alléliques et génotypiques du variant allélique *PTPN22* (1858 C/T) ont été calculées à partir de 404 patients atteints de PR et de 380 sujets contrôles (Harrison, 298). Les fréquences alléliques et génotypiques sont plus élevées dans la population atteinte de PR. Dans cette dernière, la fréquence allélique est également plus élevée dans le groupe avec facteur rhumatoïde (FR). Cette observation est particulièrement importante, car le variant allélique *PTPN22* (1858 C/T) a été retrouvé dans d'autres maladies auto-immunes associées à des autoanticorps (diabète de type I, thyroïdites auto-immunes, lupus). Si cette association était confirmée, cela signifierait que cette phosphatase joue un rôle important dans la production d'autoanticorps. Cette association *PTPN22* est indépendante des gènes *HLA*. À ce jour, les gènes codant pour les molécules *HLA* de classe II sont le plus fortement associés à la polyarthrite rhumatoïde, et en particulier avec les allèles *HLA-DRB1\*0401*, *DRB1\*0404*, *DRB1\*0405* et *DRB1\*0101*. Les molécules *HLA* codées par ces allèles se caractérisent par une séquence commune d'acides aminés (QKRAA) située entre les positions 70 et 74 de la chaîne  $\beta$  et qui correspond également au site impliqué dans la reconnaissance antigénique. Cette séquence commune, appelée aussi "épitope partagé" (EP), est probablement au cœur de la réaction auto-immune médiée par les lymphocytes. Le FR et les anticorps anti-CCP sont la signature de cette réponse auto-immune. Chez des patients atteints de PR, une association entre les allèles *HLA* codant pour l'EP (*HLA-EP*) et l'un de ces autoanticorps pourrait suggérer que l'antigène reconnu par l'autoanticorps serait aussi celui présenté par la molécule *HLA*. Cette association entre *HLA-EP*, anti-CCP et FR a été recherchée dans une population atteinte de PR diagnostiquée à partir de la cohorte de Leiden de polyarthrites débutantes, un an après l'inclusion (Verpoort, 312). La fréquence des allèles *HLA-EP* a été étudiée en fonction de la positivité des anti-CCP et du FR. Les allèles *HLA-EP* sont fortement associés à la présence des anti-CCP, et cette association est indépendante de la présence du FR. En revanche, l'association *HLA-EP* et FR est dépendante de la présence des anti-CCP. Ces derniers représentent une signature sérologique plus spécifique que le FR chez les patients atteints d'une PR possédant un allèle *HLA-EP*. Ces résultats tendent à conforter l'hypothèse selon laquelle l'antigène présenté par l'EP est un peptide citrulliné. Les mêmes auteurs ont comparé, dans cette même population, la fréquence de l'allèle *HLA-DRB1\*03*, qui est également associé aux maladies auto-immunes, et en parti-

culier aux connectivites. L'allèle *HLA-DRB1\*03* est plus fréquemment associé aux PR sans anti-CCP. Ces résultats ont été confirmés dans une population de 1 723 patients atteints de PR provenant des cohortes NARAC et SONORA (*Study of New Onset Rheumatoid Arthritis*) (Irigoyen, F3). Cette association entre les allèles *HLA-EP* avec les PR anti-CCP+ et l'*HLA-DRB1\*03* avec les PR anti-CCP- suggère un mécanisme physiopathologique différent entre les PR avec anti-CCP et celles sans anti-CCP. D'autres gènes impliqués dans la PR restent à identifier.

● Le système *RANK/RANKL* est impliqué dans les phénomènes d'ostéoclastose, ce qui en fait un bon gène candidat pour expliquer les phénomènes de résorption sous-chondrale observés dans la PR. Un polymorphisme du gène *RANKL* a été décrit avec 9 variants nucléotidiques différents nommés *IVS1* à *IVS9*. Une équipe britannique a recherché la fréquence de ces 9 variants nucléotidiques différents dans une population de PR familiale (Steer, 564). Ces analyses portaient sur 295 trios (2 parents et un enfant affecté) et étaient fondées sur des études d'association intrafamiliales, non soumises aux biais de stratification des populations étudiées. Cinq variants nucléotidiques sont très significativement associés à la PR (p entre 0,0061 et  $2,9 \cdot 10^{-5}$ ). Certaines questions restent cependant en suspens : ces polymorphismes sont localisés dans les régions introniques du gène, donc en dehors des régions codantes, et leur caractère fonctionnel n'est à ce jour pas encore connu. Par ailleurs, la possibilité que le polymorphisme de susceptibilité soit en fait localisé en 3' ou 5' de *RANKL* ne peut être exclue. Des études de réplication sur des cohortes indépendantes sont nécessaires.

## RÔLE DU LYMPHOCYTE B DANS LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE

Après quelques années d'oubli, le lymphocyte B revient au premier plan de la physiopathologie de la PR. Une équipe italienne a posé la question du rôle des lymphocytes B dans la résorption osseuse sous-chondrale observée dans la PR. Bugatti *et al.* ont comparé les tissus synoviaux et la moelle osseuse de 8 patients atteints de PR et de 4 patients atteints d'arthrose. Ils ont observé, dans la moelle osseuse de la quasi-totalité des patients atteints de PR, une architecture lymphocytaire comparable à celle observée dans la synoviale. Comme dans la synoviale rhumatoïde, les agrégats lymphocytaires présents dans la moelle osseuse peuvent s'organiser en follicule lymphoïde (figure 2), mais les lymphocytes B (CD20+) représentent la population cellulaire majoritaire et occupent le centre des agrégats, tandis que les lymphocytes T (CD3+) sont plutôt en

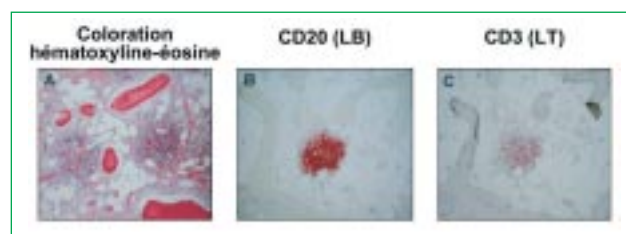


Figure 2. Agrégats lymphocytaires dans la moelle osseuse des PR (A) avec une prédominance des lymphocytes B (CD20+ [B]) par rapport aux lymphocytes T (CD3+ [C]).

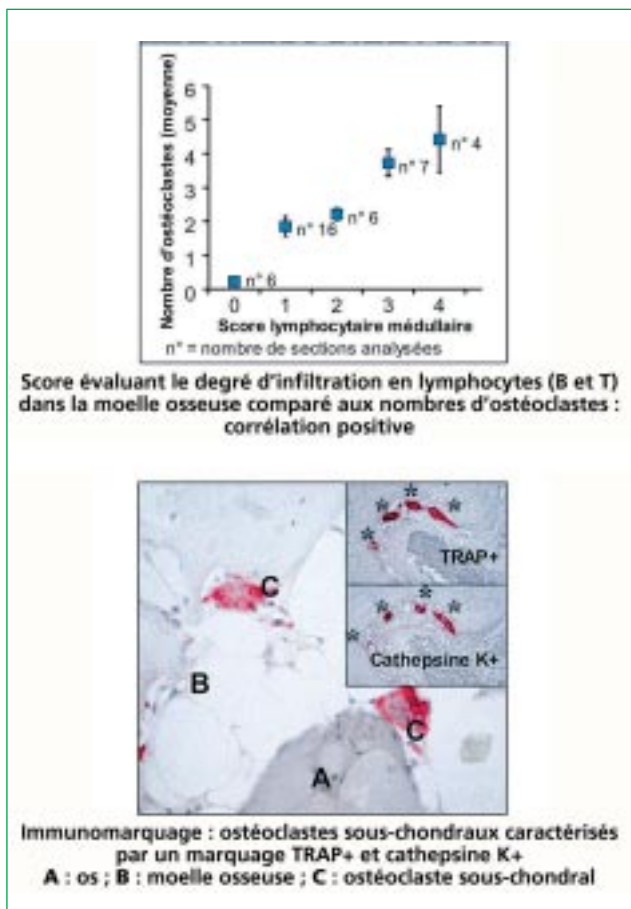


Figure 3. Corrélation entre le nombre de lymphocytes (B et T) et le nombre d'ostéoclastes sous-chondraux. Photo de gauche : le score d'infiltration lymphocytaire (en abscisse) est corrélé au nombre d'ostéoclastes sous-chondraux (ordonnée). Photos encadrées à droite : ostéoclastes sous-chondraux caractérisés par un marquage TRAP+ et cathepsine K+.

périphérie. Dans la synoviale, les chémokines CCL21 et CXCL13, capables d'attirer les lymphocytes, sont présentes dans le tissu synovial rhumatoïde, mais également dans la moelle osseuse. Les ostéoclastes sont présents au niveau des érosions osseuses, aussi bien du côté de la synoviale que du côté de l'os sous-chondral. Plus intéressante encore est la corrélation directe entre le score d'infiltration médullaire en lymphocytes (B et T) et le nombre d'ostéoclastes sous-chondraux (figure 3). Ces observations suggèrent que les lymphocytes B pourraient jouer un rôle dans la résorption osseuse sous-chondrale observée dans la PR, comme le laissent également supposer les premiers résultats structuraux obtenus avec le rituximab. Le rituximab n'est pas la seule biothérapie à avoir un effet sur les populations lymphocytaires B. Anolik *et al.* ont en effet étudié la population lymphocytaire B du sang périphérique et des organes lymphoïdes (biopsies des amygdales) chez 28 patients traités par etanercept seul ou en association avec du méthotrexate, comparativement à des patients ayant une PR sous méthotrexate (n = 17) et à des témoins sains (n = 22) (Anolik, 1829). Dans le sang périphérique, les lymphocytes B mémoires

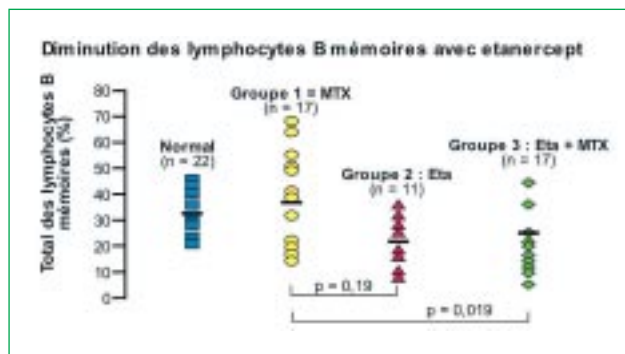


Figure 4. Pourcentage des lymphocytes B mémoires dans le sang périphérique des groupes etanercept (n = 17), méthotrexate + etanercept (n = 11), méthotrexate (n = 17) et des sujets témoins sains (n = 22). MTX = méthotrexate ; Eta = etanercept

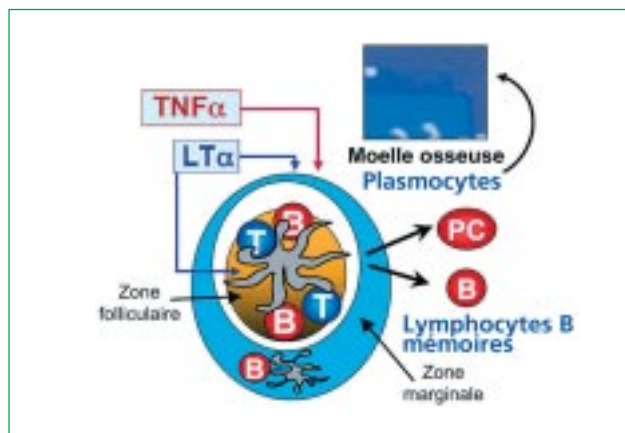


Figure 5. La lymphotoxine  $\alpha$  modifie l'architecture des follicules lymphoïdes en agissant sur les zones marginale et folliculaire des organes lymphoïdes secondaires alors que le TNF n'agit que sur la zone marginale.

étaient abaissés en valeur absolue et en pourcentage à 15,2 % de la population B totale dans le groupe PR traité par etanercept, alors que les pourcentages de B mémoires étaient de 35 % dans le groupe PR traité par méthotrexate et de 29,7 % dans le groupe témoin (figure 4). Dans les organes lymphoïdes, une prédominance des lymphocytes B naïfs était observée dans le groupe PR traité par etanercept : 65 % versus 37 % dans le groupe PR traité par méthotrexate et le groupe témoins sains. L'architecture des tissus lymphoïdes était modifiée dans le groupe traité par etanercept, avec une réduction du nombre de centres germinatifs et des cellules peuplant ces centres germinatifs. Ces modifications architecturales des follicules lymphoïdes et des populations lymphocytaires B n'étaient pas observées avec l'infliximab, suggérant que l'homéostasie B est médiée par la lymphotoxine, car seul l'etanercept a une action inhibitrice sur la lymphotoxine  $\alpha$  (figure 5). Il serait intéressant de confirmer ces résultats avec l'adalimumab, qui n'inhibe pas non plus la lymphotoxine  $\alpha$ . La signification clinique de cette différence entre anti-TNF $\alpha$  n'est actuellement pas connue en termes de risques infectieux et néoplasique.

## RÔLE DES SYNOVIOCYTES DE TYPE FIBROBLASTIQUE (FLS) DANS LA DESTRUCTION OSSEUSE

DKK-1 (*Dickkopf protein*) est une protéine inhibitrice du signal intracellulaire Wnt, qui contrôle, entre autres, la différenciation des ostéoblastes. DKK-1 a été impliquée dans les lésions ostéolytiques observées dans le myélome multiple. Son implication dans la résorption osseuse de l'articulation rhumatoïde a été étudiée en mesurant par une technique ELISA l'expression de cette protéine DKK-1 dans le sérum des patients atteints de PR comparativement à celui de sujets atteints d'arthrose (Ruiz, 1546). La concentration de DKK-1 est plus importante dans le groupe PR que dans le groupe arthrose : 40 ng/ml versus 17,1 ng/ml. L'expression sérique de DKK-1 est étroitement corrélée à celle du TNF $\alpha$  (figure 6). In vitro, les FLS de PR en culture produisent de façon constitutive DKK-1 (ARN et protéine), qui est augmentée après stimulation des FLS avec le TNF $\alpha$ . Ces observations suggèrent une implication de DKK-1 dans la résorption osseuse observée qui pourrait être médiée par les FLS. In vitro, les FLS, extraits de patients atteints de PR, stimulés par les cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$  ou IFN $\gamma$ ) produisent la cytokine BAFF (qui favorise la survie des lymphocytes B mis en coculture) (Goodyear, 715). L'addition de rituximab dans le milieu de ces cellules en coculture induit la mort des lymphocytes B. Cette mort cellulaire est augmentée par l'ajout d'un inhibiteur soluble de BAFF (*BAFF receptor-Ig*), ce qui souligne l'importance de BAFF dans la survie des lymphocytes B (figure 7).

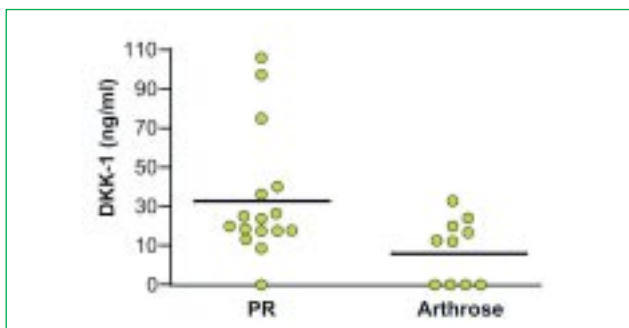


Figure 6. Expression mesurée par technique ELISA de la protéine DKK-1 dans le sérum des patients atteints de PR et d'arthrose.

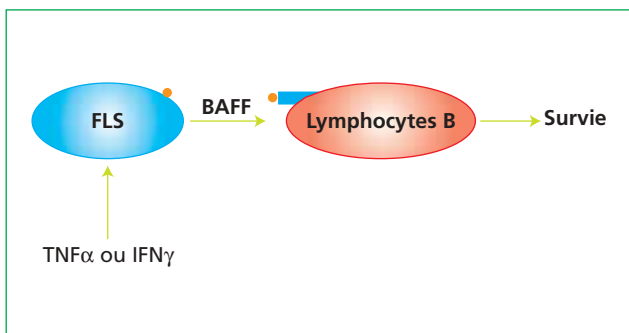


Figure 7. In vitro, la production de BAFF par les FLS stimulés par du TNF $\alpha$  ou de l'IFN $\gamma$  favorise la survie des lymphocytes B en coculture.

## LES POLYNUCLÉAIRES NEUTROPHILES : UN NOUVEAU CONCEPT PHYSIOPATHOLOGIQUE DE L'ARTHRITE JUVÉNILE

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont des cellules de l'immunité innée et interviennent dans l'inflammation non spécifique. Un nouveau concept impliquant les PNN a été proposé dans la physiopathologie des arthrites juvéniles idiopathiques (AJI) sans facteur rhumatoïde. J.N. Narvis *et al.* ont réalisé une étude de l'expression des gènes par *microarray* à partir des PNN extraits du sang périphérique de patients atteints d'AJI (Narvis, 1166). Comparativement à des sujets sains, un profil d'expression génique particulier a été observé dans les PNN, que les patients soient ou non en rémission de leur rhumatisme inflammatoire (figure 8). L'analyse informatique des gènes exprimés dans les PNN des AJI montre une hyperexpression de gènes capables de contrôler l'activation des PNN (*IL-8*, *IFN $\gamma$* ) et les protéines inflammatoires S100, qui facilitent l'adhésion à l'endotélium. De plus, dans le sang des patients atteints d'AJI, le taux de protéine S100 (A8/9) est augmenté, ce qui souligne le rôle des PNN dans l'inflammation observée dans l'AJI. Cette implication des PNN dans cette maladie est également suggérée par la mise en évidence d'une anomalie du mécanisme oxydatif des PNN. L'activité oxydative des PNN a été évaluée par l'enregistrement des ondes oxydatives, qui se caractérisent, comme les ondes radiophoniques, par leur fréquence et leur amplitude. Comparées aux ondes oxydatives de cellules non PNN, les ondes oxydatives des PNN de patients atteints d'AJI ressemblent à celles de PNN stimulés par des cytokines pro-inflammatoires (IFN $\gamma$ , *IL-8*, TNF $\alpha$ ), avec, en particulier, une augmentation de l'amplitude (figure 9). L'ensemble de ces observations suggère que l'activation continue des PNN pourrait intervenir dans la persistance de l'AJI. "Cette signature PNN pourrait définir la forme polyarticulaire sans facteur rhumatoïde de l'AJI". Plusieurs communications ont insisté sur le rôle des PNN au cours des rhumatismes inflammatoires, et aussi des protéines inflammatoires S100. Les protéines S100 (A12, A8/9) sont des protéines de l'inflammation capables de se fixer à un récepteur de l'immunité innée RAGE (*Receptor for Advanced Glycation Endproducts*) et d'induire l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales et de cytokines pro-inflammatoires par les leucocytes. Le taux de ces protéines S100 est augmenté dans le sérum et le liquide synovial des patients atteints de PR et non chez ceux atteints d'arthrose,

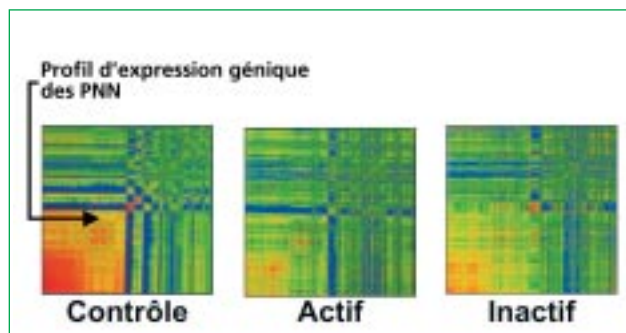


Figure 8. Profil d'expression génique en microarrays entre des sujets sains et des patients atteints d'AJI active ou en rémission.

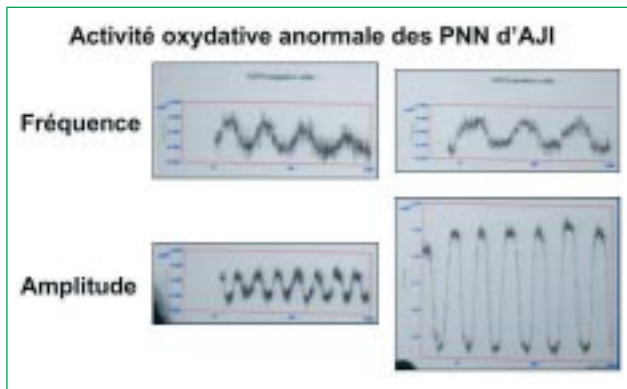


Figure 9. Comparaison des amplitudes et des fréquences des ondes oxydatives entre des cellules non PNN et des PNN de sujets atteints d'AJI.

avec une corrélation positive entre la protéine S100 A8/9 et la CRP (Sunahori, 1520). Contrairement aux cellules de la synoviale obtenues à partir d'articulations arthrosiques, les cellules de la synoviale

rhumatoïde produit la protéine S100 A8/9 de manière constitutive. Dans le tissu synovial, cette protéine est surtout observée autour des macrophages CD68+ et pourrait favoriser la production de cytokines pro-inflammatoires par activation du facteur de transcription NFκB. Enfin, l'efficacité des anti-TNF au cours de la PR pourrait être liée à leurs effets sur les PNN. Une étude clinique a en effet montré que les anti-TNF modulent l'expression des récepteurs du fragment Fc des immunoglobulines des PNN, et notamment la balance des récepteurs activateurs (FCγRIIa)/inhibiteurs (FCγRIIb) (Belostocki, 1263). L'expression de FCγRIIa est augmentée sur les PNN des patients atteints de PR. Après traitement par anti-TNF, Belostocki et al. observent, pour la moitié des patients, une diminution de l'expression de FCγRIIa sur les PNN et une augmentation de FCγRIIb. Cette augmentation d'expression du récepteur FCγRIIb au détriment de FCγRIIa sous anti-TNF pourrait expliquer une diminution de l'activation des PNN et, par conséquent, des lésions tissulaires médiées par ces cellules. L'ensemble de ces études incite à étudier plus précisément les cellules effectrices de l'immunité innée que sont les PNN, avec pour objectif de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. ■