HAL
open science

L'ADN mitochondrial, nouvel acteur de l'immunité innée, est-il impliqué dans la polyarthrite rhumatoïde ? Détection, quantification et étude de sa source cellulaire

Anne Contis Chaleuil

To cite this version:

Anne Contis Chaleuil. L'ADN mitochondrial, nouvel acteur de l'immunité innée, est-il impliqué dans la polyarthrite rhumatoïde ? Détection, quantification et étude de sa source cellulaire. Médecine humaine et pathologie. 2014. dumas-01096582

HAL Id: dumas-01096582

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01096582v1

Submitted on 17 Dec 2014

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 de Bordeaux

U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES

Année 2014 N°3077

Thèse pour l'obtention du

DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Le 20 octobre 2014

Par **Anne CONTIS CHALEUIL**

Née le 26 juillet 1984 à GRAULHET (81)

L'ADN mitochondrial, nouvel acteur de l'immunité innée, est-il impliqué dans la polyarthrite rhumatoïde ? Détection, quantification et étude de sa source cellulaire

Directeur de thèse

Monsieur le Docteur Pierre DUFFAU

Rapporteur

Monsieur le Professeur Jean-François VIALLARD

Membres du Jury

Monsieur le Professeur Patrick MERCIE……Président

Monsieur le Docteur Pierre DUFFAU……..Directeur

Monsieur le Professeur Thierry SCHAEVERBEKE…….....Juge

Monsieur le Professeur Christophe RICHEZ…….....Juge

Monsieur le Docteur Emmanuel RIBEIRO……...Juge

« Il n'est pas nécessaire d'espérer pour entreprendre ni de réussir pour persévérer »

Guillaume d'Orange-Nassau

REMERCIEMENTS

A MON JURY DE THESE

Monsieur le Professeur Patrick MERCIE

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse.
Merci de la confiance que vous m'avez accordée tout au long de ces années d'internat, pour vos encouragements, votre aide et votre disponibilité. Mon semestre au sein de votre service a définitivement scellé mon choix en faveur de la médecine interne. J'espère être à la hauteur de vos attentes en continuant à travailler à vos côtés.
Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect

Monsieur le Professeur Thierry SCHAEVERBEKE

Vous me faites l'honneur d'être membre de ce jury de thèse.
Merci pour l'intérêt que vous avez manifesté dès le début de ce projet en m'ouvrant notamment les portes de votre service. J'espère que ce travail aura répondu à vos attentes.
Soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Christophe RICHEZ

Je te remercie de me faire l'honneur d'être membre de ce jury de thèse.
Merci pour avoir initié ce projet, pour ton implication notamment tes réflexions et commentaires concernant les problématiques mais aussi pour ton soutien et ta disponibilité.
Sois assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

Monsieur le Docteur Emmanuel RIBEIRO

Je te remercie de me faire l'honneur d'être membre de ce jury de thèse.
Merci pour ta gentillesse, tes conseils et pour avoir su répondre présent dans cette dernière « ligne droite ».
Sois assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

A MON DIRECTEUR DE THESE

Monsieur le Docteur Pierre DUFFAU

Merci d'avoir dirigé mes travaux depuis le Master 2 jusqu'à cette thèse en passant par le mémoire de DES. C'est un réel plaisir de travailler avec toi depuis 2 ans. Merci pour ta gentillesse, ton enthousiasme, ton humour, ton partage des connaissances et surtout ta disponibilité. Je te suis reconnaissante de la confiance que tu m'as accordée en me proposant ce projet mais aussi en m'impliquant dans tes consultations Rendu-Osler. J'espère pouvoir continuer à apprendre à tes côtés durant les années qui viennent.

A MON RAPPORTEUR DE THESE

Monsieur le Professeur Jean-François VIALLARD

Je vous remercie d'avoir immédiatement accepté d'être mon rapporteur de thèse, de tout l'intérêt que vous y avez porté et de vos conseils avisés.

Merci pour tout ce que vous m'avez appris lors de mon passage au G2, notamment sur le PTI et pour notre article. Merci également pour votre sens de l'humour qui a égayé nos journées de DES, sans oublier la citation de Guillaume d'Orange-Nassau qui m'a servi de mantra tout au long de mon année de recherche.

Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de ma gratitude.

A tous les chefs de service qui m'ont accueillie durant mon internat et qui m'ont permis de parfaire mes connaissances théoriques et pratiques, en particulier

Au Professeur Ragnaud pour son sens clinique inégalable au lit du malade.

Au Professeur Jean-Luc Pellegrin qui le premier, durant mon externat, m'a donné envie d'être interniste. Merci pour tout l'enseignement que j'ai pu recevoir auprès de vous tout au long de mes études de médecine, pour votre confiance et votre soutien.

Au Docteur François Lifferman pour le semestre le plus formateur de mon cursus passé à tes côtés. Merci pour la confiance que tu m'as témoignée et pour m'avoir appris la rigueur, l'esprit critique et l'autonomie. Je ne serai pas le médecin que je suis aujourd'hui sans toi. Je te dois beaucoup et je t'en serai toujours reconnaissante.

Au Docteur Pierre Germain pour m'avoir initiée à la rhumatologie mais surtout pour son humanité et sa bonne humeur constante.

Au Professeur Jean-François Moreau pour sa méthode d'enseignement heuristique et pour m'avoir appris à remettre sans cesse en cause ce qui paraît acquis.

A tous les chefs de clinique rencontrés durant ces 10 semestres qui m'ont appris à gagner en assurance auprès des malades et en autonomie et plus particulièrement à **Julien Roger-Schmeltz** pour avoir fini de me convaincre de choisir la médecine interne et pour ses contre-visites pleines d'humour.

Au laboratoire d'immunologie du CHU pour m'avoir accueillie en stage hors filière, pour toutes ces découvertes techniques et belles rencontres humaines. Merci aux techniciens et techniciennes pour leur patience…

A l'UMR 5164 et au Professeur Patrick Blanco pour leur accueil durant mon Master 2. Merci aux thésards (**Clem, Camille et Lili**) pour leur bonne humeur, à **Isa et à Cécile Contin-Bordes** pour m'avoir initiée au raisonnement scientifique. Merci à tous les ingénieurs qui ont contribué de près ou de loin au projet.

Au labo MRGM pour m'avoir enseigné les bases de la biologie moléculaire. Merci à **Julie Lavie** pour sa patience et sa pédagogie lors de l'apprentissage des PCR, à **Julie, Fanny, Emilie, Rodrigue et au Professeur Cyril Goizet.**

Au service de rhumatologie pour son implication dans le projet et pour tous les prélèvements !! Merci à **Nicolas, Marie-Elise, Nadia et Marie Kostine**, ainsi qu'à **Mathilde**, la plus douce des IDE pour toutes ces prises de sang !!

A toutes les équipes médicales et paramédicales rencontrées durant mon internat. Un immense merci à **l'équipe paramédicale de Dax et à sa secrétaire Isabelle** qui m'ont choyée durant ce semestre par leur bonne humeur, leurs attentions et leurs douceurs locales… (merci pour les pastis d'Ozourt !!!) et à **l'équipe paramédicale de l'unité 28** qui a été ma « seconde famille » pendant 6 mois. J'ai hâte de vous retrouver ainsi que **Mme Lalanne**, sans aucun doute la cadre infirmière la plus marquante de mon internat !

A mes co-internes cotoyés durant ces 5 ans : Céline et Arnaud pour leur solidarité durant ce premier semestre, Lisa et Laure pour nos fous-rires à l'unité 28, Jéjé pour son humour noir, Aurélie pour m'avoir supportée deux semestres, au Bouscat et en réa, les biologistes Nico, Pierre, Marine, Célia et Anne-so pour leur accueil chaleureux et enfin mes supers co-internes de gériatrie Popo, Céline et Nono pour nos sessions radio LDP et youtube !!

A mes co-internes de DES : Irène (merci d'avoir partagé ce master 2 avec moi), Caroline, Etienne, Alex et Alex, Arnaud, Noémie, Didier, Aurélie…

A Stéphane Mitrovic pour avoir partagé ce projet avec moi, avec ses galères, ses doutes et ses réussites.

A mes amis de la fac pour tous ces souvenirs partagés et ces moments inoubliables :

Anaëlle, mon éternelle binôme (de cours, de sous-colle, de TP, de vacations d'histo…), ma confidente, merci pour ta présence,

Seb, mon" Gunther" adoré,

Aurélie, pour nos stages d'externe, d'interne, sous-colles et surtout vacances, férias, w-e, soirées!!!

Pierre,

Maïté, ma première amie Bordelaise, merci pour nos sorties magiques à la Cale sèche…

Vincent, pour ces soirées de fin d'année « déjantées » et les cours de poker !

Mathieu, pour ton sens de la fête,

Thomas, notre Docteur Corazon,

Caroline,

A mes amis creusois, David, Stef, Sbe pour les w-e à Clion et tous les fous-rires et délires partagés.

A la copro Saintongeaise, Sandra, Nico, Caro, Pierre, pour ces moments de réconfort autour du barbecue.

A ma famille et notamment à **Thierry,** pour avoir été un super« coloc » durant 5 ans, conjuguant moments de calme pour me laisser réviser et soirées « décompression » nécessaires.

A mon frère, Didier, pour avoir été un modèle pour moi.

A mes parents, je n'ai pas de mots assez forts pour vous exprimer toute ma gratitude. Merci pour votre présence tout au long de ces années, pour votre soutien inconditionnel, pour vos encouragements, pour les valeurs que vous m'avez inculquées (travail, persévérance…) et pour votre relecture attentive de cette thèse !

A Mickaël, merci pour ta patience et ton soutien. Pour tout ce qu'il nous reste à partager ensemble…

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION....9

I-1- Aspects clinico-biologiques de la PR....9

I-2- Immunopathologie de la PR....11

I-2-1- Phase de déclenchement....12

I-2-2- Phase d'inflammation....13

I-2-3- Phase de destruction ostéo-articulaire....14

I-3- Le rôle central de l'immunité innée....15

I-3-1- Les effecteurs cellulaires....15

I-3-2- Le réseau cytokinique....19

I-4- Activation de l'immunité innée et signaux de danger....20

I-4-1- Généralités sur les Toll like receptors....21

I-4-2- Généralités sur les NOD-like receptors....23

I-4-3- Implication des Toll like receptors et des NOD-like receptors dans la polyarthrite rhumatoïde....24

I-5- L'ADN mitochondrial : un nouveau DAMP....25

I-5-1- Généralités sur l'ADN mitochondrial....25

I-5-2- Détection d'ADN mitochondrial dans des circonstances inflammatoires....26

I-5-3- Le rôle fonctionnel pro-inflammatoire de l'ADN mitochondrial....28

II. OBJECTIFS DE TRAVAIL....32

III. MATERIELS ET METHODES....32

III-1- Population étudiée et recueil des échantillons....32

III-2- Analyse des échantillons par biologie moléculaire....33

III-2-1- Purification des échantillons....33

III-2-2- Analyse des échantillons par PCR....33

III-2-3- Analyse des échantillons par PCR quantitative....34

III-2-4- Isolement des PNN sanguins et articulaires et analyse par qPCR de leur contenu en ADN mt....34

III-3- Paramètres clinico-biologiques d'intérêt....35

III-4- Analyse statistique 36
IV. RESULTATS 37
IV-1- Caractéristiques des patients inclus dans l'étude 37
IV-2- Détection d'ADN mt dans les échantillons 40
IV-3- Quantification de l'ADN mt dans les échantillons 41
IV-4- Analyse de la corrélation entre l'activité de la PR et la quantité d'ADN mt 42
IV-4-1- Activité de la PR et ADN mt synovial 42
IV-4-2- Activité de la PR et ADN mt plasmatique 45
IV-4-3- ADN mt et autres marqueurs de la PR 48
IV-5- Le PNN source d'ADN mt 49
IV-5-1- Le PNN source d'ADN mt dans la PR 49
IV-5-2- Le PNN source d'ADN mt dans l'AM 52
V. DISCUSSION 55
VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 61
BIBLIOGRAPHIE 62
ANNEXES 71
LISTE DES ABREVIATIONS 77
SERMENT D'HIPPOCRATE 79
RESUME EN ANGLAIS 80

I. INTRODUCTION

La polyarthrite rhumatoïde (PR) représente le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques avec une prévalence estimée à 0,8%. C'est aussi la maladie auto-immune dont la physiopathologie est la mieux connue car la plus étudiée. Plusieurs facteurs ont été incriminés dans son déclenchement (génétiques, environnementaux et hormonaux) et contribuent au développement de l'inflammation de la membrane synoviale. Les mécanismes immunopathologiques impliqués sont complexes, faisant intervenir à la fois l'immunité innée et l'immunité adaptative. Toutefois, la surreprésentation d'effecteurs cellulaires comme les polynucléaires neutrophiles (PNN) dans le liquide synovial et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IL1β, IL6 et TNFα), cibles des biothérapies utilisées dans la prise en charge des patients, témoignent du rôle primordial de la réponse innée. Comprendre les mécanismes d'activation de l'immunité innée représente un enjeu important, aussi bien sur le plan physiopathologique que sur le plan thérapeutique. En témoigne la littérature abondante sur les DAMPs (Damaged Associated Molecular Patterns), signaux de danger activateurs des récepteurs de l'immunité innée, dont fait partie l'ADN mitochondrial (ADN mt). Le rôle pro-inflammatoire que cet ADN mt peut exercer dans diverses pathologies nous semblait pertinent à explorer dans le cadre de la PR.

Après de brefs rappels clinico-biologiques sur la PR, nous exposerons les mécanismes immunopathologiques impliqués, en nous focalisant principalement sur le rôle de l'immunité innée et ses voies d'activation. Puis nous détaillerons les connaissances actuelles sur l'ADN mt, en tant que ligand des récepteurs de l'immunité innée et marqueur pro-inflammatoire.

I-1- Aspects clinico-biologiques de la PR

La PR peut survenir à tout âge mais touche avec prédilection les patients entre 40 et 60 ans et préférentiellement les femmes (sex ratio de 4 pour 1 dans cette tranche d'âge) (1). Elle se révèle dans la majorité des cas par une oligoarthrite distale d'apparition progressive, intéressant les poignets, une ou plusieurs articulations métacarpo-phalangiennes et/ou interphalangiennes proximales. Une fois installée, la PR tend vers l'aggravation clinique avec une extension des atteintes articulaires à l'occasion de poussées évolutives, séparées par des phases d'accalmie relative. Les articulations touchées sont le siège d'une inflammation permanente, avec hydarthrose et parfois épaississement considérable de la synoviale (pannus).

L'atteinte des mains est la plus fréquente (90% des cas), suivie de celles des poignets (70%), et des pieds. Epaules, genoux et coudes sont également souvent touchés et le rachis cervical est intéressé dans près de 40% des cas (2). Le risque évolutif est la destruction articulaire responsable des déformations irréversibles si caractéristiques de la maladie (coup de vent cubital, col de cygne, pouces en Z…) et associées à un handicap fonctionnel parfois majeur.

A la phase d'état, peuvent également survenir des manifestations extra-articulaires, reflets du caractère systémique de la maladie. Ainsi, on peut citer la présence de nodules rhumatoïdes, d'une vascularite rhumatoïde à tropisme cutané ou neurologique, des manifestations pleuro-pulmonaires ou encore hématologiques à l'image du syndrome de Felty associant splénomégalie et leuconeutropénie (3).

Sur le plan biologique, il existe dans près de 90% des poussées un syndrome inflammatoire avec élévation de la vitesse de sédimentation (VS) et de la C- Reactive proteine (CRP). Deux marqueurs immunologiques sont classiques dans cette pathologie : le facteur rhumatoïde (FR) et les anticorps anti-peptides citrullinés (ACPA). Le FR est un anticorps anti-gammaglobulinique, qui appartient le plus souvent à la classe des IgM, avec pour cibles les IgG. Au début de la maladie, la recherche de FR est souvent négative mais sa présence à un taux significatif est un élément de mauvais pronostic (4). A la phase d'état, il est retrouvé chez 80% des patients (5). Toutefois, son manque de spécificité ne permet pas d'affirmer le diagnostic de PR quand il est détecté.

Les ACPA sont bien plus spécifiques de la maladie, permettant de distinguer la PR, d'autres rhumatismes inflammatoires. La citrulline est un acide aminé qui n'entre pas dans la composition des protéines lors de leur synthèse. Cependant, elle peut être incorporée dans les protéines via une modification post-transcriptionnelle des résidus arginine par la peptidylarginine deiminase (PAD) (6). Durant la mort cellulaire, notamment induite par l'inflammation, on assiste à une fuite extra-cellulaire de la PAD qui est activée et à l'origine de la citrullination de protéines extra-cellulaires. Les iso-enzymes PAD2 et PAD4 sont les plus pertinentes au cours de la PR. En effet, ils sont exprimés par le tissu synovial et leur expression corrèle à l'intensité de l'inflammation locale (7). Les ACPA ont également une valeur pronostique. Corrélés à la gravité de la PR, ils sont aussi un marqueur du potentiel évolutif destructeur de la PR (8,9).

Sur le plan radiologique, les signes élémentaires caractéristiques sont les érosions péri-articulaires, les géodes intra-osseuses juxta-articulaires puis secondairement les pincements des interlignes articulaires traduisant la destruction du cartilage (2). Ces signes débutent en distalité (mains, poignets, avant-pieds) et leur gravité reflète la sévérité de l'atteinte des grosses articulations.

Le diagnostic de PR est désormais établi par les critères de classification 2010 ACR et EULAR (10). Le patient doit présenter au moins une synovite clinique et des érosions radiologiques typiques de PR ou répondre à des critères avec un score d'au moins 6 sur 10, permettant d'exclure un diagnostic différentiel. Les critères testés comportent quatre catégories d'items pondérés (annexe 1) :

- Le mode d'atteinte articulaire (nombre et types d'articulations touchées)
- Le statut sérologique (FR et ACPA)
- L'inflammation biologique (VS ou CRP)
- La durée d'évolution des symptômes.

I-2- Immunopathologie de la PR

De façon schématique, l'immunopathologie de la PR peut être divisée en trois phases distinctes : une phase de déclenchement impliquant surtout l'immunité innée, une phase d'inflammation de la membrane synoviale impliquant plutôt l'immunité acquise et une phase de destruction articulaire (11).

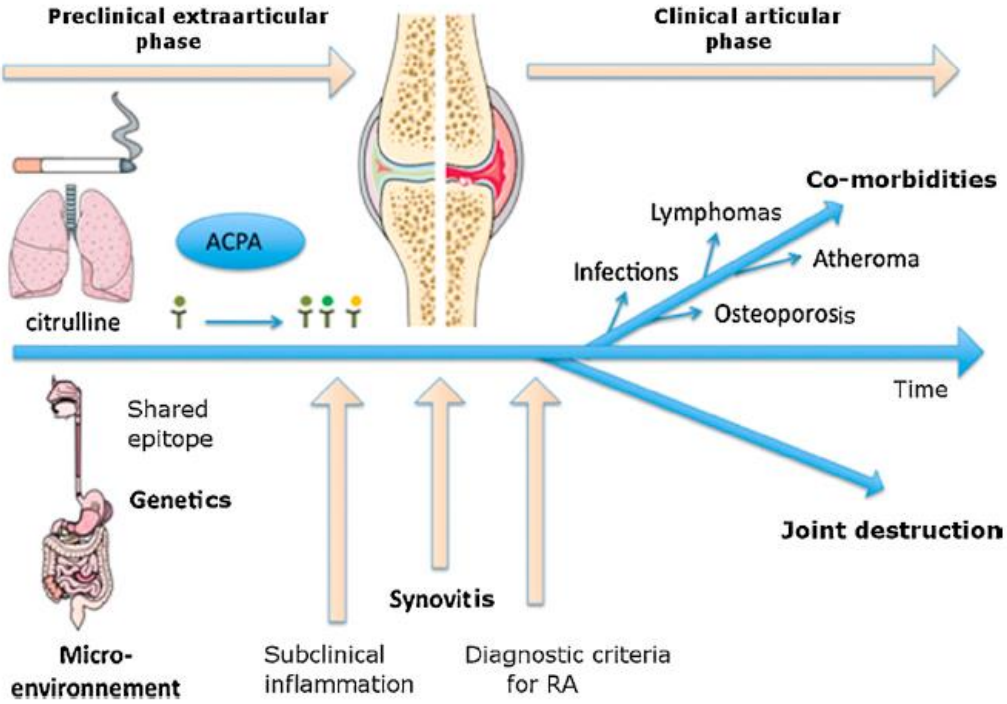


Figure 1 : l'histoire naturelle de la PR avec ses trois phases : phase pré-clinique de déclenchement où interviennent conjointement facteurs génétiques et environnementaux, phase clinique d'inflammation synoviale et phase tardive de destruction ostéo-articulaire associée à la survenue de co-morbidités (d'après (12)).

I-2-1- Phase de déclenchement

La phase de déclenchement est initiée par la conjonction de trois grands types de facteurs : génétiques, environnementaux et hormonaux. Ainsi, il existe une prédisposition génétique à la PR, comme en atteste le taux de concordance chez les jumeaux homozygotes atteints qui est en moyenne de 13 % (13). L'association génétique la plus forte est observée avec les gènes codant pour les molécules HLA (Human Leukocyte Antigen) de classe II et plus particulièrement avec les allèles HLA-DRB1*0401, DRB1*0404, DRB1*0101. Les molécules HLA codées par ces allèles présentent une séquence d'acides aminés commune située entre les positions 70 et 74 de la chaine β, appelée épitope partagé, qui correspond au site impliqué dans la reconnaissance antigénique (14). Cet épitope partagé pourrait être au cœur de la réaction auto-immune médiée par les lymphocytes T et B. En effet, il est plus fréquemment retrouvé chez les patients atteints de PR ayant des taux élevés d'ACPA car la citrullination est à l'origine d'une augmentation de l'affinité des protéines citrullinées pour l'épitope partagé. Trois principaux modèles ont été proposés :

• l'épitope partagé pourrait reconnaître un peptide du soi et favoriser dans le thymus la persistance d'un clone de lymphocytes T autoréactifs par sélection clonale positive ; ce clone T autoréactif pourrait dans certaines conditions être activé et déclencher une réponse immunitaire spécifique contre ce peptide du soi ;

• l'épitope partagé se lierait spécifiquement avec l'antigène responsable de la PR ; une étude a montré une affinité de l'épitope partagé pour les peptides citrullinés (15) ;

• l'épitope partagé interagirait avec un peptide antigénique exogène mais ayant une structure voisine à un peptide du soi. C'est la théorie dite du « mimétisme moléculaire ».

L'implication de ces allèles dans la PR est également soulignée par l'association étroite entre ces allèles et la sévérité de la maladie. L'allèle DRB1*04 est pratiquement constamment retrouvé dans les PR avec destruction ostéo-articulaire précoce (16).

Concernant les facteurs environnementaux, deux semblent particulièrement impliqués de par leur rôle dans la citrullination : les infections et le tabagisme (17). Ainsi les périodontites à Porphyromonas gingivalis sont corrélées à la présence d'ACPA. Cette bactérie est porteuse de l'enzyme PAD4 qui peut citrulliner des peptides humains, la citrullination accrue favorisant la rupture de tolérance à l'égard de ce néo-antigène et l'émergence d'anticorps (18).

Enfin, la plus grande incidence de la PR chez la femme, avec un sex ratio de un homme pour quatre femmes, suggère une implication des hormones dans le déclenchement de la PR.

Lorsque tous ces facteurs sont réunis, s'ensuit une activation incontrôlée de la réponse innée et adaptative, ayant pour cible privilégiée la membrane synoviale.

I-2-2- Phase d'inflammation

L'inflammation de la synoviale implique de nombreux acteurs cellulaires et médiateurs solubles. Quatre types cellulaires sont au premier plan : les cellules présentatrices d'antigènes, les lymphocytes T et B et les synoviocytes (11).

Les macrophages, cellules dendritiques et PNN sont capables, par leurs molécules HLA de classe II, de présenter l'antigène au lymphocyte T (19).

Les lymphocytes T sont recrutés à partir du sang périphérique et migrent dans la synoviale pour s'organiser en agrégats qui ressemblent par leur morphologie à l'architecture folliculaire des ganglions lymphoïdes. Après avoir été activés par les cellules présentatrices d'antigène, via l'engagement de leur TCR (T Cell Receptor) et les molécules de co-stimulation, ils produisent des cytokines de type Th1 et de l'interleukine 17 qui activent les cellules résidentes : lymphocytes B, macrophages résidents, cellules endothéliales et fibroblastes (20). Celles-ci libèrent à leur tour des chimiokines et des molécules d'adhésion qui favorisent le recrutement de monocytes et de polynucléaires neutrophiles circulants.

Les lymphocytes B jouent également un rôle important, comme en témoigne l'efficacité du rituximab, anticorps monoclonal déplétant en LB, dans la PR (21). Ils peuvent se comporter comme des cellules présentatrices d'antigène et activer ainsi les lymphocytes T. En outre, ils produisent les anticorps (FR, anticorps anti-noyaux et surtout ACPA) qui peuvent exercer un effet pathogène (22).

Toutefois, la cellule qui joue le rôle clé dans la pérennisation de l'inflammation est le synoviocyte. Il constitue le principal composant cellulaire de la couche bordante de la membrane synoviale et comprend deux types cellulaires : le synoviocyte fibroblastique et le synoviocyte macrophagique. Ce dernier, une fois activé par les lymphocytes, entretient la réaction inflammatoire en sécrétant deux types de médiateurs: des médiateurs préformés (tels que les prostaglandines, les leucotriènes, les radicaux libres et les enzymes contenues dans les granules et qui participent de façon importante à la destruction tissulaire) et des cytokines pro-inflammatoires dont l'IL1 (Interleukine 1), le TNFα (Tumor necrosis factor α) et l'IL6 (Interleukine 6), capables à leur tour d'induire la synthèse de la plupart des protéines de l'inflammation (11).

La persistance de cette réaction inflammatoire et l'accumulation de cellules et de cytokines dans la synoviale conduit à la phase ultime et irréversible de destruction ostéo-articulaire.

I-2-3- Phase de destruction ostéo-articulaire

Cette phase est donc la conséquence de la prolifération pseudo-tumorale des synoviocytes et de l'action des cytokines. En effet, l'efficacité des biothérapies en termes de réduction de destruction articulaire, souligne l'implication de ces médiateurs solubles (23,24). L'IL1 et le TNFα augmentent la synthèse de facteurs de croissance nécessaires à la prolifération de la synoviale, mais aussi la production par les synoviocytes de

métalloprotéinases, de cathepsines et de collagénases, enzymes responsables de la dégradation des principaux composants du cartilage (11).

Le système RANK/RANKL est également impliqué. RANKL (Receptor Activator of NFκB Ligand) est une molécule membranaire, inductible par les cytokines pro-inflammatoires, exprimée à la surface des ostéoblastes mais aussi des lymphocytes B, des PNN, des cellules endothéliales et des synoviocytes lorsqu'ils sont activés. Elle interagit avec son récepteur membranaire RANK présent à la surface des pré-ostéoclastes, active ces derniers qui se différencient en ostéoclastes, initiant le remodelage ostéo-articulaire (25).

I-3- Le rôle central de l'immunité innée

La fonction principale de l'immunité innée est la reconnaissance de pathogènes. Suite à la rencontre avec le non-soi, les cellules de l'immunité innée sont activées et produisent des cytokines et chemokines inflammatoires permettant le recrutement d'autres effecteurs cellulaires et moléculaires localement. L'immunité innée joue donc un rôle clé dans l'initiation et l'entretien de la réponse inflammatoire, faisant le lien avec l'immunité adaptative. Dans la PR, l'immunité innée est en permanence activée comme en témoignent l'accumulation d'effecteurs cellulaires dans la synoviale et la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL6, l'IL1 et le TNFα (26).

I-3-1- Les effecteurs cellulaires

Parmi les cellules impliquées, on retient les macrophages, les cellules dendritiques et les polynucléaires neutrophiles.

I-3-1-1- Les macrophages

Leur présence a été démontrée dans la couche bordante de la membrane synoviale et autour des vaisseaux synoviaux. L'augmentation locale de ces macrophages est la conséquence du chimiotactisme, de la prolifération locale et d'un retard d'apoptose (27).

Les macrophages sont avant tout des cellules phagocytaires de micro-organismes (bactéries, virus, champignons et parasites) mais aussi des « scavengers », sorte d'éboueurs de corps apoptotiques. La phagocytose, ou tout autre stimulus activateur, induit leur production de chemokines et cytokines pro-inflammatoires afin d'attirer d'autres cellules sur le site de l'inflammation. Ils peuvent également se comporter comme des cellules présentatrices d'antigène et activer les lymphocytes T (26).

I-3-1-2- Les cellules dendritiques

Si le nombre de cellules dendritiques dans la circulation sanguine est bas chez les patients porteurs de PR, les cellules dendritiques matures sont détectées en nombre sur les biopsies synoviales. Dans la synoviale rhumatoïde, elles sont trouvées principalement dans les agrégats lymphocytaires et en périphérie des vaisseaux, suggérant qu'elles proviennent du sang périphérique (28). Les chimiokines CCL19 et CCL21 qui interviennent dans l'adressage des cellules dendritiques, sont retrouvées en abondance dans la synoviale (29). En outre, le nombre de cellules dendritiques plamacytoïdes détecté corrèle avec la production d'ACPA (30).

On distingue deux types de cellules dendritiques qui différent par leurs marqueurs de surface et par les cytokines produites : les mDC (cellules dendritiques myéloïdes) et les pDC (cellules dendritiques plasmacytoïdes). Ce sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, pourvues d'une grande plasticité dépendante de l'environnement (31). En effet, selon le stimulus reçu, elles développeront un phénotype plus ou moins mature. Les cellules immatures, résidentes dans les tissus, capturent l'antigène de manière particulièrement efficace grâce à la phagocytose. Néanmoins, elles sont de piètres présentatrices d'antigènes. Les cellules matures qui migrent vers les organes lymphoïdes secondaires, pour leur part, sont très performantes dans la stimulation des lymphocytes T. Sous l'influence du LPS (lipopolysacharide) ou d'autres stimuli dont les cytokines, elles expriment les molécules de costimulation (CD80 et 86), le CD40 et les molécules HLA de classe II, requises pour activer pleinement les lymphocytes T (32).

Les cellules dendritiques pourraient jouer un rôle essentiel dans l'initiation de l'auto-immunité dans la PR par la présentation d'auto-antigènes citrullinés via l'épitope partagé aux lymphocytes T. Elles seraient susceptibles, également, de participer à la pérennisation de l'inflammation par un défaut de régulation de la présentation antigénique. Ainsi, un défaut d'apoptose de ces cellules, favorisé par des facteurs anti-apoptotiques présents dans l'environnement synovial, pourrait prolonger anormalement leur durée de vie. Le ou les antigènes arthritogènes seraient ainsi présentés de manière anormalement prolongée favorisant, de ce fait, la persistance de l'inflammation (11).

Outre la présentation d'antigènes, ces cellules sont capables, après activation de leurs récepteurs de surface, de produire des cytokines pro-inflammatoires pour activer les macrophages et entretenir le processus inflammatoire local (26).

I-3-1-3- Les polynucléaires neutrophiles

Les PNN sont de loin les cellules immunitaires les plus représentées au sein du liquide synovial d'une arthrite rhumatoïde. Plusieurs modèles animaux ont montré que ce sont les premières cellules à gagner la cavité articulaire, via un gradient de facteurs chimioattractants et que leur déplétion protégeait contre le développement de l'arthrite (33). En outre, l'altération de leur processus de mort programmée par apoptose favorise leur accumulation au sein de la cavité articulaire (34). L'altération des mécanismes de recrutement, d'activation et de mort cellulaire du PNN joue un rôle central dans l'entretien de la réponse inflammatoire et la progression de la maladie.

Activés par les stimuli inflammatoires locaux (complexes immuns, cytokines, facteurs de croissance), les PNN peuvent alors exercer de multiples fonctions en cause dans les dommages tissulaires (figure 2) (35) :

- Synthèse de médiateurs de l'inflammation :

En tant que premières cellules arrivées sur le site de l'inflammation, les PNN sécrètent des cytokines et des chemokines qui exercent un rôle crucial dans l'amplification de la réponse inflammatoire et dans l'induction d'une réponse immune adaptative. Ils produisent ainsi des médiateurs lipidiques de l'inflammation, des cytokines (IL1 β, IL1Ra, IL6, IL12, TNFα…), des chemokines (IL8, CCL3 et 4…) et des facteurs de croissances (GM-CSF) qui vont recruter localement davantage de PNN mais aussi d'autres types cellulaires et moduler leur état d'activation (36).

- Coordination cellulaire :

Grâce à son réseau cytokinique, le PNN interagit avec les cellules environnantes de l'immunité innée (macrophages, cellules dendritiques) et de l'immunité adaptative (lymphocytes B et T). Ainsi via l'IL8, il exerce un effet chimioattractif sur les macrophages et favorise leur différenciation vers un phénotype pro-inflammatoire (37). Il est également capable d'activer les lymphocytes T par sa fonction de cellule présentatrice d'antigène accessoire. Réciproquement, les lymphocytes T, et plus particulièrement la sous population Th17 qui joue un rôle majeur dans l'articulation rhumatoïde, influencent les fonctions neutrophiliques en stimulant la granulopoïèse, le recrutement des PNN et en allongeant leur durée de vie par le biais de l'IL17 (38,39). Enfin, le PNN demeure un partenaire privilégié des

lymphocytes B, en tant que source majeure de cytokines Blys et APRIL cruciales pour leur survie, leur maturation et leur différenciation (38).

- Burst oxydatif

Dans le liquide synovial, l'interaction des PNN (via leurs récepteurs FcγR) avec les complexes immuns et le facteur rhumatoïde induit leur dégranulation et la production de ROS (Reactive Oxygen Species). Ces ROS endommagent les acides nucléiques, oxydent les lipides, les protéines et les lipoprotéines, et semblent être impliqués dans des mutations de gènes codant pour les immunoglobulines, conduisant à la formation du facteur rhumatoïde (40). En outre, l'acide hypochloreux protège les enzymes dégranulées par le PNN de l'action d'anti-protéases. Ces enzymes (collagénases et gélatinases) exercent alors leur activité destructrice sur la matrice collagène du cartilage. Elles sont également des médiateurs de l'inflammation, à l'image de la protéinase 3, qui par son activité protéolytique clive les précurseurs du TNFα, de l'IL1β et de l'IL8 en formes actives. Enfin, les ROS activent la voie NF-κB des PNN, impliquée dans la synthèse de chemokines et de cytokines pro-inflammatoires.

- Résorption osseuse :

Les PNN articulaires de PR surexpriment RANKL. Ainsi, leur présence en nombre à l'interface pannus synovial/os facilite l'interaction de RANKL avec leurs récepteurs RANK exprimés à la surface des ostéoclastes et potentialise le remodelage osseux (38).

- NETose

La perturbation des processus de mort du PNN est également impliquée dans la physiopathologie de la PR. La NETose est une forme de mort cellulaire des PNN, conduisant à la libération de chromatine décondensée, d'histones, de protéines granulaires et cytoplasmiques dans le milieu extracellulaire, formant un réseau appelé NETs (Neutrophil Extracellular Traps) (41). Dans la PR, la NETose des PNN circulants et articulaires apparait significativement augmentée, comparativement à des sujets sains ou atteints d'arthrose. Elle semble corrélée aux marqueurs de l'inflammation systémique mais également à la présence d'ACPA. La citrullination est une modification post-traductionnelle des résidus arginine, catalysée par l'enzyme PAD 4, dont l'histone représente le substrat majeur (42). Par l'exposition au sein des NETs d'auto-antigènes citrullinés (dont les histones), la production d'ACPA mais aussi de chemokines et cytokines (IL6, IL8) est entretenue (43).

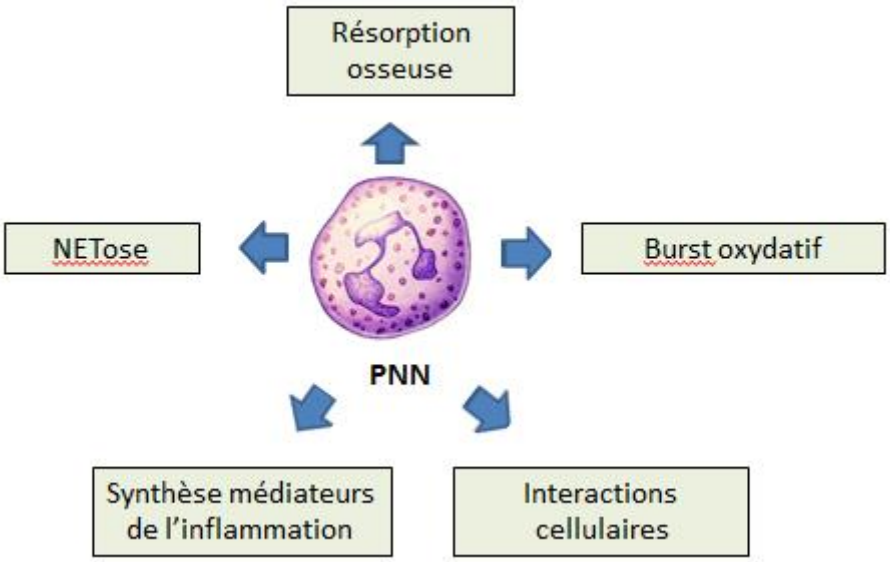


Figure 2 : Les principales fonctions exercées par les PNN dans la PR

L'activation et la communication entre ces effecteurs de l'immunité innée est sous-tendue par l'existence d'un réseau cytokinique efficace.

I-3-2- Le réseau cytokinique

Les cellules sont capables d'interagir entre elles par contact cellulaire direct ou par des molécules solubles : les cytokines. Dans la PR, il existe un déséquilibre entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires, au bénéfice des premières (11). Ainsi, l'IL1, l'IL6 et le TNFα, entre autres, sont présents à des taux élevés dans le sérum et le liquide synovial de patient (44). Le rôle central de ces cytokines dans la pathogénie de la PR a été démontré ces dernières années avec l'utilisation de biothérapies capables de les neutraliser. Leurs actions pro-inflammatoires sont multiples. Ainsi, le TNFα contrôle la sécrétion d'autres cytokines (IL1, IL6, IL23), de chemokines (IL8 notamment), de médiateurs lipidiques de l'inflammation (prostaglandines), de molécules d'adhésion endothéliale et de facteurs de croissance de l'angiogénèse afin de faciliter le recrutement synovial d'autres cellules de l'inflammation. Il est également impliqué, comme cité précédemment, dans le remodelage osseux via la sécrétion de métalloprotéinases par le chondrocyte et l'activation des ostéoclastes (45). L'IL1 induit *in vitro* la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules mononuclées, de métalloprotéinases par les fibroblastes synoviaux et la résorption osseuse par les ostéoclastes

(46). Enfin, l'IL6 a des effets pléiotropiques incluant l'activation et la maturation des lymphocytes B et lymphocytes T, des macrophages, des chondrocytes, des ostéoclastes et des cellules endothéliales (47).

La sécrétion de ces cytokines est la résultante de l'activation des cellules de l'immunité innée par des signaux environnementaux exogènes ou endogènes.

I-4- Activation de l'immunité innée et signaux de danger

L'immunité innée est fondamentale pour la reconnaissance de signaux de danger. En 1994, Matzinger propose la théorie que le système immunitaire n'a pas évolué pour distinguer le soi du non soi mais pour détecter le danger qui peut se présenter sous la forme d'une molécule microbienne exogène ou d'une molécule endogène, altérée ou sécrétée de façon inappropriée (48).

Ainsi, pour initier une réponse précoce de défense de l'hôte, le système immunitaire inné s'est doté d'une série de récepteurs connus sous le nom de pattern recognition receptors (PRRs). Les PRRs reconnaissent des molécules spécifiques portées par des micro-organismes, les pathogen associated molecular patterns (PAMPs) ainsi que des ligands endogènes, les damaged associated molecular patterns (DAMPs). Les principaux DAMPs sont la protéine S100, HMGB1 (High Mobility Group Box 1), les heat shock protein, l'ATP, l'acide urique, ainsi que des ARN et ADN endogènes (26). Oppenheim (49) a également proposé le terme d'alarmines pour désigner ces molécules endogènes, libérées par des cellules viables ou au cours d'un processus de mort cellulaire. Ces alarmines activent les PRR et ont pour vocation de promouvoir la réparation des tissus endommagés (suite à un traumatisme ou une inflammation prolongée) afin de maintenir l'homéostasie. Toutefois, l'expression excessive d'alarmines peut être impliquée dans des situations pathologiques (goutte, lupus…) (50)

La reconnaissance des PAMPs et DAMPs par les PRRs active des voies de signalisations intracellulaires qui permettent l'expression de molécules effectrices, dont les cytokines pro-inflammatoires, faisant le lien avec la réponse immunitaire adaptative spécifique. Parmi les PRR, on distingue deux sous-groupes (51):

- Les récepteurs qui induisent une phagocytose comme les récepteurs scavengers, les récepteurs du β-glucane ou encore les MBL (Mannan Binding Lectin) qui activent la voie lectine du complément.
- Les récepteurs qui n'induisent pas de phagocytose : les TLRs (Toll Like Receptors) et les NLRs (Nucleotide Oligomerization Domain (NOD) Like Receptors).

I-4-1- Généralités sur les Toll like receptors

Le nom de TLR vient de l'homologie avec une famille de molécules retrouvée chez la drosophile, dont le principal membre est Toll, identifié pour son rôle dans la réponse anti-fongique (52). Actuellement, la famille des TLRs est constituée de 10 récepteurs chez l'homme. Ils sont exprimés sur de nombreuses cellules du système immunitaire et plus particulièrement sur celles impliquées dans la première ligne de défense contre les pathogènes : les cellules dendritiques, les macrophages et les PNN. Les ligands des TLRs comprennent divers produits bactériens, viraux et fongiques, mais aussi certains ligands endogènes (53). Ainsi, le TLR2 reconnait le peptidoglycane des cocci Gram positifs et le TLR4 interagit avec le lipopolysaccharide des bacilles Gram négatifs mais aussi avec des DAMPs comme HMGB1 ou des heat shock protein (54).

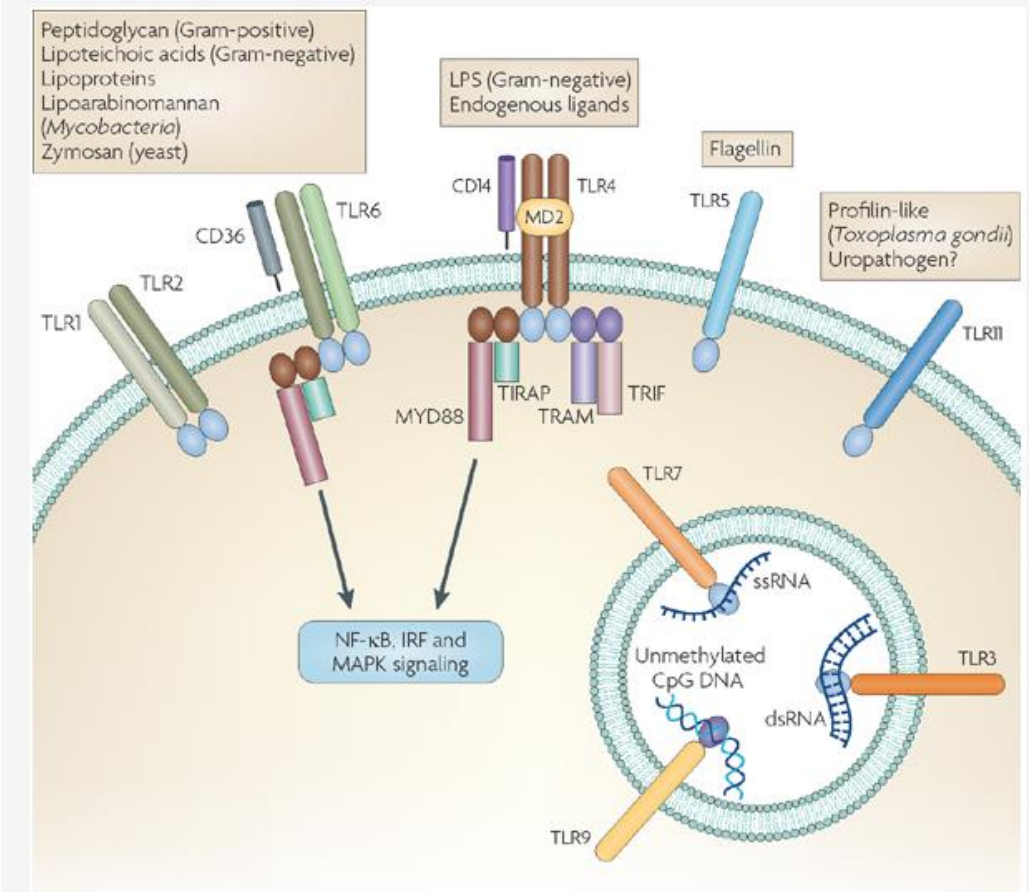


Figure 3 : les différents TLRs chez l'homme et leurs ligands (d'après (55)).

Si la majorité des TLRs sont exprimés à la surface cellulaire et interagissent avec l'environnement extra-cellulaire, les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont localisés dans le compartiment cytoplasmique au sein de l'endosome et reconnaissent des acides nucléiques (ARN double brin pour TLR3, ARN simple brin pour TLR 7 et 8 et ADN pour TLR9). Dans les conditions physiologiques, la localisation endosomale de ces TLRs permet d'éviter la reconnaissance de ligands acides nucléiques endogènes au profit d'acides nucléiques bactériens ou viraux (56). La localisation intracellulaire de ces TLRs nécessite donc l'internalisation et l'acheminement jusqu'au compartiment endolysosomal de leurs ligands respectifs. Ceci facilite l'accès des ADN et ARN microbiens aux TLRs. Toutefois, dans certaines situations pathologiques, des fragments d'acide nucléique du soi, couplés à des molécules chaperonnes ou à des récepteurs peuvent être internalisés et responsables de complications auto-immunes.

La stimulation des TLRs par leurs ligands respectifs active des voies de signalisation intracellulaire utilisant des molécules partagées par les voies de signalisation du récepteur de l'IL-1. Les TLRs sont composés de trois régions (57) :

• une région extra-cellulaire, riche en répétition de leucines, responsable de la reconnaissance des pathogènes

• une région transmembranaire

• une région cytoplasmique, comprenant un domaine TIR nécessaire à l'initiation de la signalisation intra-cellulaire.

Ce domaine cytoplasmique est appelé TIR (Toll IL1 receptor) car il est également présent sur le récepteur de l'IL1. La reconnaissance de leurs ligands par les TLRs provoque leur homodimérisation et l'activation de TIR qui va recruter des molécules adaptatrices. Ainsi tous les TLRs interagissent avec MyD88 (Myeloid Differentiation factor 88) sauf TLR3 qui interagit avec TRIF (Toll-interleukin-1-receptor-domain-containing adaptor-inducing interferon β) (58). L'activation de MyD88 conduit à l'activation de la voie NFkB (Nuclear factor κB) et des MAP kinases conduisant à la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation, la prolifération et la protection contre l'apoptose alors que l'activation de TRIF conduit à l'expression des interférons α et β impliqués dans la réponse antivirale (59).

I-4-2- Généralités sur les NOD-like receptors

Les NLRs sont des récepteurs cytosoliques de l'immunité innée divisés en deux sous-familles protéiques : NOD et NALP (Nucleotid binding domain and leucin-rich repeat pyrin domain). La structure de ces NLRs est commune : un domaine central de liaison aux nucléotides, un domaine C-terminal riche en motifs leucines répétés et un domaine N-terminal de recrutement des caspases. Les protéines de type NOD reconnaissent des fragments de parois bactériennes comme le peptidoglycane et activent la voie NFkB (60). Les membres de la famille NALP dont NALP 1, 3 et 12 peuvent former un complexe d'activation de la caspase 1, autrement appelé inflammasome dont la conséquence est la sécrétion d'IL1β et d'IL18. L'inflammasome est un complexe multiprotéique composé d'une protéine NLR comme NALP, d'une molécule adaptatrice ASC (Apoptosis associated speck-like protein containing a CARD) et de la caspase 1, enzyme qui clive la pro-IL1β et la pro-IL18 (61). Ce complexe est assemblé en réponse à une stimulation par des PAMPs mais aussi des DAMPs comme les cristaux d'urate monosodique ou de pyrophosphate de calcium, puisque NLRP3 est impliqué dans la physiopathologie des arthrites microcristallines (62).

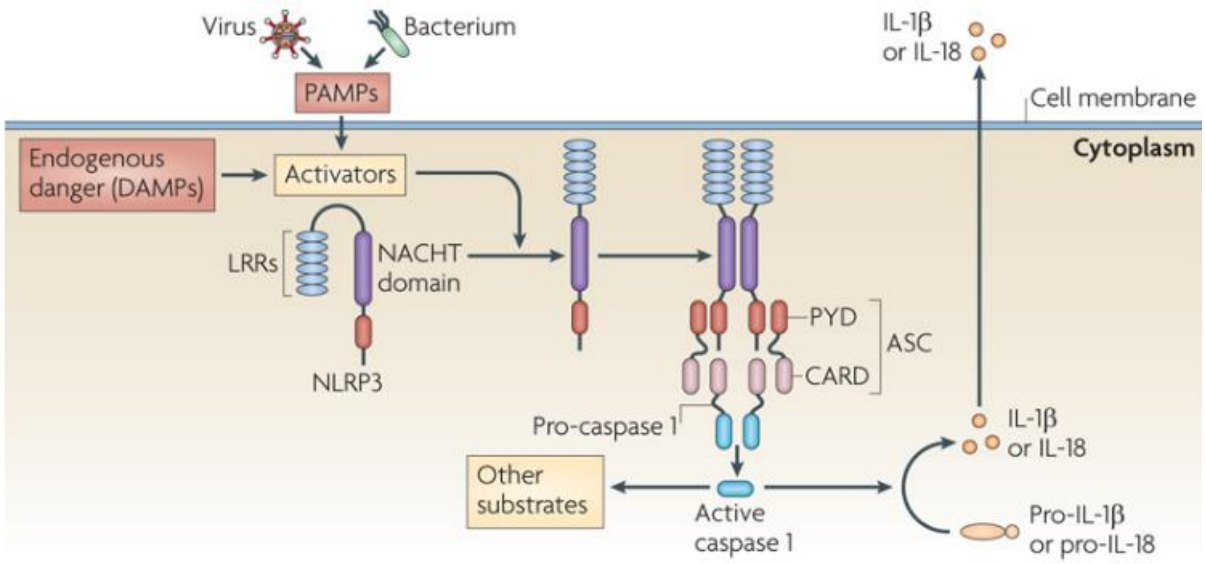


Figure 4 : le complexe de l'inflammasome NLRP3 : activé par des PAMPs ou des DAMPs, le récepteur NLRP3 par son domaine pyrine (PYD) se lie à la molécule adaptatrice ASC qui recrute par son domaine CARD la pro-caspase 1. Celle-ci est alors clivée en caspase 1 fonctionnelle qui convertit la pro-IL1β et la pro-IL18 en cytokines effectrices IL1β et IL18 (d'après (63)).

I-4-3- Implication des Toll like receptors et des NOD-like receptors dans la polyarthrite rhumatoïde

De nombreux modèles animaux d'arthrite inflammatoire nécessitent l'administration de ligands des TLRs pour l'induction de la maladie, par exemple, ADN bactérien, paroi de streptocoque, ou adjuvant de Freund dans le modèle d'arthrite induite par le collagène (64–66). En revanche, *in vitro*, la stimulation des TLRs 3 et 9 par des acides nucléiques endogènes exerce une action anti-inflammatoire, amenant à l'hypothèse que c'est seulement en présence de niveaux élevés de DAMPs et de molécules chaperonnes permettant leur internalisation, telle LL37, que l'activation des TLRs peut conduire à une inflammation pathologique chez des sujets prédisposés (67).

En outre les TLRs 2, 3, 4, 7, 8 et 9 sont exprimés dans la synoviale rhumatoïde à des niveaux plus élevés que dans la synoviale de sujets sains ou arthrosiques et leur stimulation induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dont le TNFα (68–70).

Des ligands des TLRs de type DAMPs ont également été identifiés dans le liquide synovial de patients porteurs de polyarthrite rhumatoïde, comme la serum amyloid A,

HMGB1, des heat shock protein ou des fragments d'acide hyaluronique capables d'activer les TLR 2 et 4 (71).

Enfin, le dernier argument en faveur de leur implication est l'efficacité des antipaludéens de synthèse qui sont des inhibiteurs des TLRs endosomaux (72). Ainsi l'hydroxychloroquine modifie les acides nucléiques empêchant leur interaction avec le TLR9 notamment. In vitro, la culture de cellules synoviales en présence de chloroquine diminue la sécrétion de cytokines (73). Les TLRs endosomaux et de fait leurs ligands représentent donc de nouvelles cibles thérapeutiques intéressantes.

Les NLRs sont également impliqués dans la physiopathologie de la PR. Ainsi, le ligand microbien de NOD2 a été retrouvé dans le liquide synovial de PR mais pas dans celui d'arthrose (74). NOD2 est exprimé par les synoviocytes de type macrophagique et fibroblastique. Sa transcription est augmentée en présence de ligands de TLR, suggérant que l'activation des TLRs induit l'expression de NOD2 et que ces 2 récepteurs agissent en synergie pour promouvoir l'inflammation dans la synoviale rhumatoïde (75). En outre, la voie de l'inflammasome est sollicitée dans la production locale d'IL1 puisque NALP3 est exprimé dans l'articulation de PR (76). En revanche, les ligands à l'origine de la formation de ce complexe dans la PR ne sont pas clairement définis.

I-5- L'ADN mitochondrial : un nouveau DAMP

I-5-1- Généralités sur l'ADN mitochondrial

La mitochondrie est une organelle caractéristique des cellules eucaryotes, fondamentale pour la production énergétique d'ATP par les réactions de phosphorylation oxydative et pour le contrôle de la mort cellulaire par apoptose (77). Son génome, l'ADN mitochondrial (ADN mt) mesure 16,5 kb et comporte 37 gènes : 13 gènes codant pour les sous-unités des complexes de la chaine respiratoire, 22 gènes codant pour des ARN de transfert et 2 ARN ribosomaux (16S et 18S) (78). Les protéines nécessaires à sa réplication et à sa transcription sont donc codées par des gènes nucléaires. Cet ADN mt est complexé à des protéines dont des facteurs de transcription comme TFAM (Mitochondrial Transcription Factor A), qui le compacte en nucléoide. Chaque nucléoide comporte 1 à 10 copies d'ADN

mt. Le nombre total de copies d'ADN mt s'échelonne de 100 à 10000 selon le type cellulaire et les besoins énergétiques (79).

La mitochondrie ayant évolué hypothétiquement à partir d'une bactérie saprophyte ancestrale en endosymbionte puis organelle, il n'est donc pas surprenant que son génome présente de fortes homologies avec l'ADN bactérien : il est circulaire, non protégé par des protéines histones et contient des motifs ADN CpG (Cytosin phosphodiester bond Guanin) non méthylés. Ces motifs, peu présents dans l'ADN génomique, sont reconnus par TLR9, faisant de l'ADN mt un de ses ligands, capable d'activer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par la voie du NF-κB (80).

I-5-2- Détection d'ADN mitochondrial dans des circonstances inflammatoires

De nombreux travaux ont identifié l'ADN mt comme un déterminant de la réponse inflammatoire. Ainsi Zhang et al. ont étudié la présence d'ADN mt circulant chez des patients polytraumatisés, avec défaillance multiviscérale et porteurs d'une inflammation systémique de type SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrom). Les taux d'ADN mt plasmatiques étaient 1000 fois supérieurs à ceux de sujets sains (81). Des études cliniques ultérieures ont permis d'établir la valeur pronostique précoce de cet ADN mt circulant chez des patients polytraumatisés, en sepsis sévère ou hospitalisés en service de soins intensifs, à l'image d'autres marqueurs biologiques comme les lactates ou la procalcitonine (82). Son élévation dès J1 et sa corrélation avec le score de sévérité clinique ISS pour les patients de réanimation semblent témoigner du risque d'évolution vers la défaillance multiviscérale ou le décès pour ceux qui ont les taux plasmatiques les plus élevés, sous réserve des faibles effectifs d'étude (83,84).

Il est également détecté dans d'autres types de choc (modèle de choc hémorragique chez le rat (85)) ou d'autres situations inflammatoires et lésionnelles graves comme les hépatites fulminantes non infectieuses (86) ou les détresses respiratoires post transfusionnelles (TRALI : Transfusion Related Acute Lung Injury) (87).

D'autres situations cliniques impliquant une inflammation systémique sont associées à la présence d'ADN mt plasmatique. Ainsi, il est retrouvé dans de nombreux cancers solides ou hémopathies : sein (88), testicule (89), ORL (il est alors détecté également dans la salive des patients (90)), prostate (91) et lymphomes malin non Hodgkinien (92). Dans le cas du

cancer de la prostate il joue, là encore, le rôle de marqueur pronostique défavorable en termes de survie à 2 ans (93).

Au cours de l'infection par le VIH, il est corrélé au statut de l'infection et à la charge virale. Ainsi, les patients au stade aigu de l'infection ou qui ont une évolution prolongée sans traitements ont des taux d'ADN mt significativement plus élevés que les patients progresseurs lents. La présence d'ADN mt est alors associée à un état inflammatoire chronique (94,95).

L'infarctus du myocarde libère par la nécrose cellulaire des cardiomyocytes des DAMPs dont HMGB1, des heat shock proteins mais aussi de l'ADN mt. Ces DAMPs sont alors pourvoyeurs d'une inflammation systémique (96). L'ADN mt est impliqué dans d'autres pathologies cardiovasculaires. Il a été détecté au sein des plaques d'athérome au contact des LDL oxydés (97) et il est impliqué dans les poussées d'insuffisance cardiaque au cours des cardiopathies hypertrophiques. Ces poussées s'accompagnent dans leur phase initiale d'une myocardite qui semblerait secondaire à la présence d'ADN mt cytosolique (98).

Concernant la polyarthrite rhumatoïde, une publication fait mention de la détection d'ADN mt dans le liquide synovial de patients contrairement à des sujets témoins, porteurs d'arthrose, et d'une présence plus fréquente d'ADN mt dans les plasmas de PR que dans ceux de sujets sains. Aucune quantification précise n'a été, cependant, réalisée. Des formes oxydées de cet ADN mt, témoins du métabolisme oxydatif mitochondrial, ont été également détectées. En revanche, aucune corrélation n'a pu être établie avec les caractéristiques clinique ou biologique des patients (99).

Enfin, s'il est une situation physiologique où l'inflammation est fréquente, il s'agit bien du vieillissement. Le remodelage du compartiment immuno-inflammatoire avec l'âge se manifeste comme un état inflammatoire chronique, une réactivité accrue au soi dont l'ADN et une immuno-sénescence de la réponse adaptative. La vulnérabilité face à l'environnement et au stress endogène se définit, chez la personne âgée, comme la fragilité. Le vieillissement s'associe à une augmentation du stress oxydatif (et donc de la production de ROS qui peuvent oxyder l'ADN mt) et à une diminution de la méthylation de l'ADN. Ces deux modifications augmentent donc le caractère immunogène de l'ADN mt, dont les taux plasmatiques sont une fois encore plus élevés chez la personne âgée que chez les sujets jeunes et corrèlent avec la fragilité (100,101).

La présence d'ADN mt dans ces diverses circonstances pathologiques n'est pas que le simple reflet d'un relargage cellulaire passif, par nécrose notamment, mais témoigne aussi du rôle d'alarmine de ce DAMP qui va activer le système immunitaire inné.

I-5-3- Le rôle fonctionnel pro-inflammatoire de l'ADN mitochondrial

Plusieurs études expérimentales in vitro et animales ont souligné le rôle fonctionnel de l'ADN mt dans l'inflammation.

I-5-3-1- Modèles in vitro

Zhang et al. ont démontré que l'ADN mt est capable de recruter et d'activer des PNN en cultures. Ainsi, en présence d'autres DAMPs mitochondriaux comme les formyl peptides, il stimule la sécrétion d'IL8 par les PNN, chémokine chimioattractante pour les PNN, favorisant leur recrutement sur le site de l'inflammation mais aussi à distance, permettant la diffusion systémique de l'inflammation. En outre, l'ADN mt interagit par ses motifs CpG non méthylés avec le TLR9 des PNN leur permettant d'être pleinement activés et de sécréter leurs enzymes dont les métalloprotéinases, intervenant dans leur migration tissulaire. En présence de chloroquine, cette activation est bloquée témoignant donc de l'implication de la voie des TLRs endosomaux (81,85). En outre, l'activation de la voie TLR9 par les DAMPs mitochondriaux retarde l'apoptose des PNN, favorisant leur accumulation sur le site de l'inflammation et prolongeant leur action pro-inflammatoire (102).

Une autre de ses cibles cellulaires de la réponse immunitaire innée est la cellule dendritique plasmacytoïde (pDC). En présence d'ADN mt, les pDC stimulées sécrètent de l'INFα mais aussi du TNFα, suite à l'activation de la voie TLR9 (103). Cependant, les îlots CpG non méthylés de l'ADN mt ne suffisent pas à activer la voie TLR9. En raison de la petite taille des DAMPs mitochondriaux avec un ADN fragmenté, l'accès à l'endosome et donc au TLR9 leur est impossible. Interviennent alors des protéines chaperonnes dont TFAM. Ce dernier est structurellement et fonctionnellement similaire à un autre DAMP qui joue également le rôle de protéine chaperonne : HMGB1. TFAM, par ses domaines HMGB, est lié à l'ADN mt avec une forte affinité et est capable d'interagir avec les récepteurs de surface des pDCs RAGE (Receptor for advanced glycation end products) permettant l'internalisation du couple TFAM-ADN mt et son acheminement jusqu'à l'endosome, au contact de TLR9 (104). Ainsi, les modèles in vitro de culture de pDCs ont permis la mise en évidence d'une

colocalisation de TFAM, RAGE et TLR9. La présence de TFAM potentialise donc la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par la pDC, en présence d'ADN mt (105,106).

Un dernier modèle d'étude cellulaire est la cellule endothéliale au cours de l'athéromatose. Les LDL oxydés qui s'accumulent dans les cellules endothéliales sont de puissants inducteurs de ROS. Les mitochondries et surtout leur ADN peuvent être endommagés par ce stress oxydatif (97). En effet l'ADN mt, du fait de l'absence d'histone, de système de réparation de l'ADN et de sa proximité immédiate avec les complexes de la phosphorylation oxydative, est plus vulnérable face aux ROS et la fréquence de ses mutations en est accrue. Pour faire face à ces dommages mitochondriaux, la cellule a mis en place un mécanisme protecteur d'autophagie des organites défaillants appelés dans ce contexte, mitophagie. La mitochondrie endommagée est englobée dans un autophagosome qui fusionne secondairement avec un lysosome où la présence de DNAse II permettra la dégradation d'ADN mt. En présence d'un stress oxydatif intense, le processus mitophagique peut être dépassé et l'ADN mt peut s'échapper de l'autophagosome. Ainsi dans les cultures de cellules endothéliales, en présence de LDL oxydés, l'autophagie est certes activée mais en parallèle se produit une fuite d'ADN mt dans le cytosol qui peut gagner secondairement l'endosome et activer la voie TLR9 et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (97,98).

Cet ADN mt peut également activer dans le cytosol un autre récepteur de l'immunité innée : NLRP3 impliqué dans la voie de l'inflammasome (107). NLRP3 est un récepteur cytosolique capable d'interagir avec l'ATP, les ROS et l'ADN mt, conduisant à la formation du complexe de l'inflammasome et à l'activation de la caspase 1. Cette dernière permet le clivage de la pro-IL1β et de la pro-IL18, en IL1β et IL18, responsables de l'inflammation locale et systémique. L'autophagie déficiente est à l'origine de cette activation de l'inflammasome mais les ROS sont également impliqués directement en favorisant l'ouverture de pores de la membrane externe mitochondriale, favorisant le passage de l'ADN mt dans le cytosol au contact de NLRP3 (79).

I-5-3-2- Modèles animaux

L'injection par voie intraveineuse d'ADN mt à un modèle murin génère des lésions inflammatoires systémiques, hépatiques et pulmonaires, caractérisées par un infiltrat neutrophilique précoce et une synthèse locale de cytokines pro-inflammatoires (TNFα, puis IL6) (81,86).

Un autre modèle de rat souligne que l'inflammation pulmonaire s'accompagne d'un œdème et que la production de cytokines pro-inflammatoires induites par l'ADN mt est la

conséquence d'une augmentation de l'expression pulmonaire de TLR9 et de la signalisation par la voie du NFκB (108).

Un modèle murin d'insuffisance cardiaque sur poussée hypertensive souligne l'implication de la mitophagie déficiente dans la survenue de lésions inflammatoires. Des souris déficientes en DNAse II, mimant un phénotype d'autophagie déficiente, développent dans les 10 jours suivant une poussée hypertensive majeure, une myocardite sévère puis une myocardiopathie dilatée avec une mortalité accrue. L'infiltrat myocardique par des cellules inflammatoires et la surexpression locale de cytokines pro-inflammatoire s'associent à une augmentation de dépôts d'ADN mt dans les autophagosomes. Le blocage de TLR9 améliore le phénotype inflammatoire et la dysfonction myocardique témoignant que la mitophagie déficiente favorise un état pro-inflammatoire au cours des poussées d'insuffisance cardiaque par l'interaction de TLR9 et de l'ADN mt (98).

Enfin, un modèle murin a souligné le potentiel arthritogène de l'ADN mt. Ainsi, l'injection intra-articulaire d'ADN mt déclenche une poussée d'arthrite médiée principalement par les monocytes (leur déplétion atténuant le profil inflammatoire articulaire) et dans une moindre mesure par les PNN. L'activation des monocytes fait intervenir la voie du NFκB avec pour conséquence la sécrétion locale de TNFα. La présence du motif 8oxoDG sur un oligodésoxynucléotide, témoin de l'oxydation des acides nucléiques par les ROS suffit, indépendamment de la présence d'ADN mt, à déclencher une arthrite, témoignant de l'interaction possible entre ce motif et TLR9 (109).

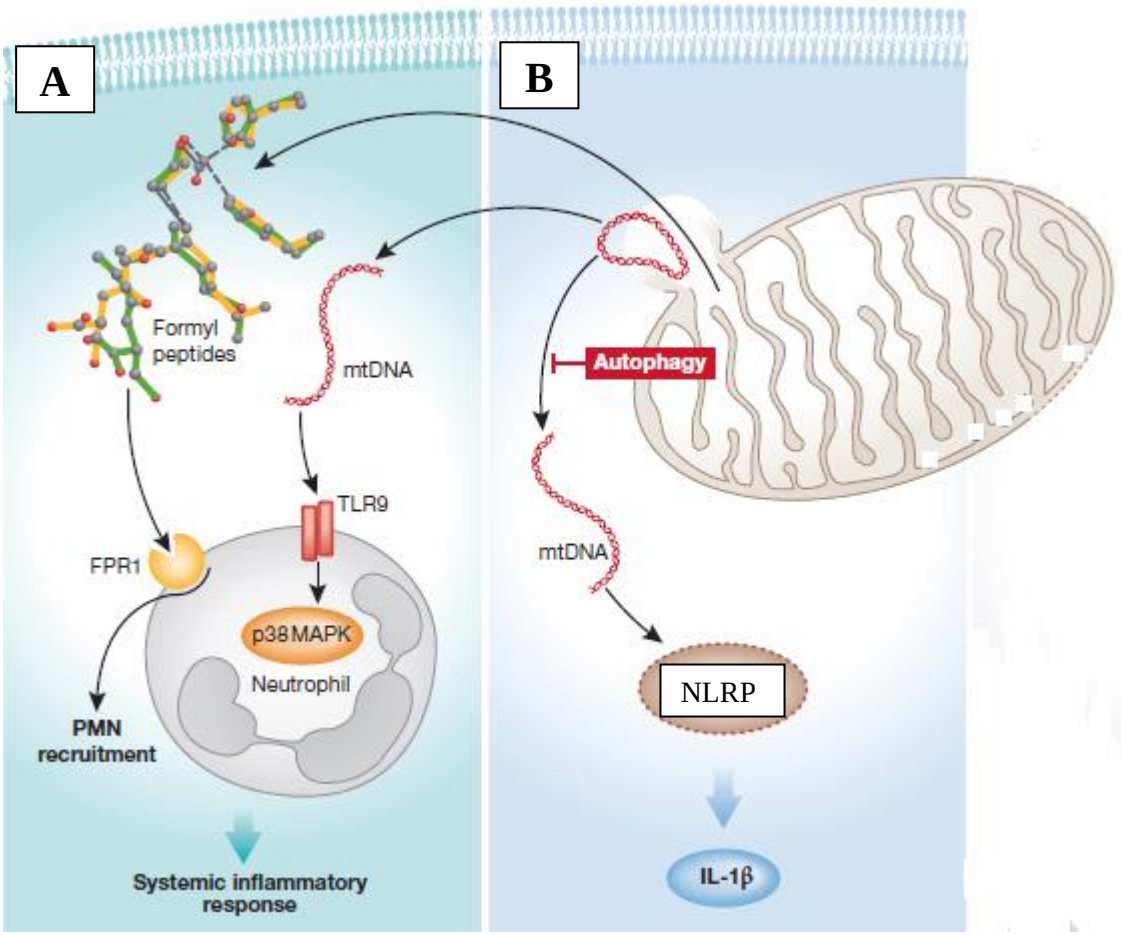


Figure 5 : Le rôle pro-inflammatoire de l'ADN mt est assuré par deux voies : **A** : l'ADN mt libéré dans le milieu extracellulaire peut interagir avec TLR9 et activer la voie du NFκB et des MAP kinases aboutissant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ; **B** : la mitophagie déficiente permet à l'ADN mt libéré dans le cytosol d'interagir avec NLRP3 pour activer la voie de l'inflammasome et permettre la sécrétion d'IL1β (d'après (80)).

L'ADN mt exerce donc le rôle d'alarmine dans de nombreuses situations, activant les récepteurs de l'immunité innée et stimulant ainsi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires nécessaires au recrutement et à l'activation des cellules de l'immunité au premier rang desquelles le PNN. Si ces deux derniers acteurs sont bien connus pour leur rôle central dans la physiopathologie de la PR, peu d'études se sont intéressées à l'ADN mt dans ce rhumatisme inflammatoire.

II. OBJECTIFS DE TRAVAIL

L'ADN mt se comportant comme une alarmine de l'inflammation, l'objectif principal de cette étude est de le détecter et de la quantifier par PCR dans des prélèvements sanguins et articulaires de patients porteurs de PR, comparativement à des sujets contrôles, indemnes de pathologie inflammatoire.

Les objectifs secondaires sont de :

- corréler la présence et la quantité d'ADN mt à l'activité clinico-biologique de la PR et notamment à l'inflammation.
- déterminer si le PNN, cellule principale du liquide synovial de PR, peut être la source de l'ADN mt extra-cellulaire.
- étudier si la présence d'ADN mt extracellulaire, notamment dans le liquide synovial, est propre à la PR ou commune à d'autres rhumatismes inflammatoires.

III. MATERIELS ET METHODES

III-1- Population étudiée et recueil des échantillons

Nous avons mené une étude prospective sur des échantillons sanguins et articulaires prélevés dans le cadre de soins courants, entre les mois de juillet 2012 et mai 2014, chez des patients suivis dans le service de rhumatologie du Pr Schaeverbeke au CHU de Bordeaux. Tous les patients ont donné leur consentement éclairé quant à l'utilisation de leurs échantillons. Le protocole et les modalités de prélèvements ont été approuvés par le Comité de Protection des Personnes (CPP).

Les liquides synoviaux (LS) sont issus de ponctions articulaires diagnostiques et thérapeutiques chez des patients en poussée de PR, en poussée d'arthrite microcristalline (AM) : goutte ou chondrocalcinose articulaire (CCA) et en poussée d'arthrose. L'arthrose étant une pathologie articulaire dégénérative, pas ou peu inflammatoire, est utilisée dans notre étude comme contrôle négatif articulaire. Les prélèvements sanguins (plasmas) ont été réalisés chez des patients en poussée de PR ou d'AM, chez des patients avec une PR inactive ainsi que chez un groupe contrôle comportant 15 volontaires sains.

Les prélèvements obtenus ont fait l'objet d'une préparation immédiate par centrifugations appropriées pour s'affranchir de toute contamination cellulaire des plasmas et LS qui pourrait perturber l'interprétation des résultats par PCR. Puis, ils ont été congelés jusqu'à utilisation afin de préserver l'intégrité de l'ADN mt.

III-2- Analyse des échantillons par biologie moléculaire

La figure 6 reprend les différentes étapes de l'analyse des échantillons exposées ci-dessous. Les protocoles détaillés sont mentionnés en annexes.

III-2-1- Purification des échantillons

Le contenu protéique élevé des échantillons, notamment la richesse en fibrine des LS, pouvant constituer un frein à la détection d'ADN mt par PCR, nous avons choisi de purifier sur colonnes (kit NucleoSpin® Tissue de Macherey Nagel) les LS et plasmas, afin de recueillir leur ADN total concentré. Les protéines sont lysées par des protéases. L'ADN est précipité par de l'éthanol sur une membrane de silice, lavé puis élué.

III-2-2- Analyse des échantillons par PCR

Afin de valider l'observation de la littérature quant à la présence d'ADN mt dans le LS et le plasma de PR, nous avons réalisé sur quelques échantillons sanguins et articulaires purifiés des PCR avec des amorces spécifiques de l'ADN mt humain, reconnaissant le gène UUR codant pour l'ARN de transfert de la leucine. Le mix de PCR contient pour un échantillon, 2µl d'amorces « forward » et 2µl d'amorces « reverse » à la concentration de 10µM, 1µl de dNTPs (mélange des 4 désoxyribonucléotides triphosphates) à 5mM, 2µl de MgCl2 à 2mM, 2,5 µL de tampon 10X, 0,2µL de Taq DNA polymérase (Roche®) et 12,8µL d'eau pour un volume total de 22,5µL.

Le protocole de PCR comporte une étape de dénaturation de 10 minutes à 95°C, puis 40 cycles d'amplification (30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 60°C puis 30 secondes d'élongation à 72°C) suivis d'une d'élongation à 72°C de 7 minutes.

La révélation a été effectuée sur gel d'agarose à 2% par du bromure d'éthidium.

III-2-3- Analyse des échantillons par PCR quantitative

Une étape préliminaire a consisté à établir une gamme d'ADN mt indispensable à la quantification de celui-ci dans nos échantillons. Brièvement, pour cela, nous avons utilisé un amplicon d'ADN mt obtenu par la PCR d'un de nos échantillons de LS de PR. Nous l'avons excisé au scalpel, extrait du gel d'agarose, puis cloné dans un plasmide qui a fait l'objet d'une transformation bactérienne. Les colonies bactériennes transformées ont été amplifiées puis les plasmides ont été extraits. Une digestion enzymatique pour extraire l'ADN mt amplifié a été effectuée. Après s'être assuré par séquençage qu'il s'agissait bien du fragment d'ADN mt d'intérêt (gène UUR), l'ADN mt amplifié a fait l'objet de dilutions successives pour obtenir une gamme de concentrations de 10^6 à 10 copies /ml (110).

La PCR quantitative (qPCR) a utilisé les mêmes amorces qu'en PCR classique. Les échantillons ont été testés en triplicat. Le mix de qPCR contient pour un échantillon, 12,5 µl d'iQ SYBR Green Supermix® (Bio-Rad) à 2X (concentration finale à 1X), 1,25 µl d'amorces « reverse » et « forward » à 10 µM (soit une concentration finale à 0,5µM) et 8µl d'eau pour un volume final de 23 µl.

Le protocole de qPCR comporte une dénaturation initiale de 10 minutes à 95°C ; 40 cycles d'amplification avec une étape de dénaturation de 30 secondes à 95°C et une étape d'hybridation de 1 minute à 60°C ; un cycle de 2 minutes avec 1 minute de dénaturation à 95°C, 30 secondes d'hybridation à 55°C et 30 secondes d'élongation à 95°C pour déterminer le Tm (température de dissociation). Les résultats sont analysés par le logiciel Bio-Rad CFX Manager®.

III-2-4- Isolement des PNN sanguins et articulaires et analyse par qPCR de leur contenu en ADN mt

Afin de déterminer si le PNN pouvait être la source de l'ADN mt circulant du plasma et du LS, nous avons isolé des PNN à partir d'une fraction des prélèvements sanguins et articulaires. Pour cela, nous avons utilisé une technique de séparation des éléments figurés du sang par gradient de densité obtenu par Ficoll et centrifugation. Ainsi les globules rouges et PNN sédimentent au fond du tube, surmontés par le Ficoll puis par les PBMC (peripheral blood mononuclear cells) qui sont à l'interface Ficoll/plasma. Après avoir éliminé le plasma, les PBMC et la moitié du Ficoll, les PNN et hématies restantes sont soumis à une lyse

hypotonique. La lyse des hématies permet alors d'obtenir des échantillons de PNN avec une pureté supérieure à 95%.

Les PNN obtenus sont purifiés pour extraire leur ADN intracellulaire par une technique identique à celle de purification des LS et plasmas (kit NucleoSpin® Tissue de Macherey Nagel). Leur contenu en ADN mt est analysé par qPCR selon un protocole identique à celui utilisé pour les échantillons de plasmas et LS. Néanmoins, afin de normaliser le contenu en ADN mt à un élément référent, le contenu en ADN nucléaire est également analysé (amorces pour le gène codant pour l'ARN 18S) et les résultats sont exprimés en ratio d'ADN mt/ ADN nucléaire.

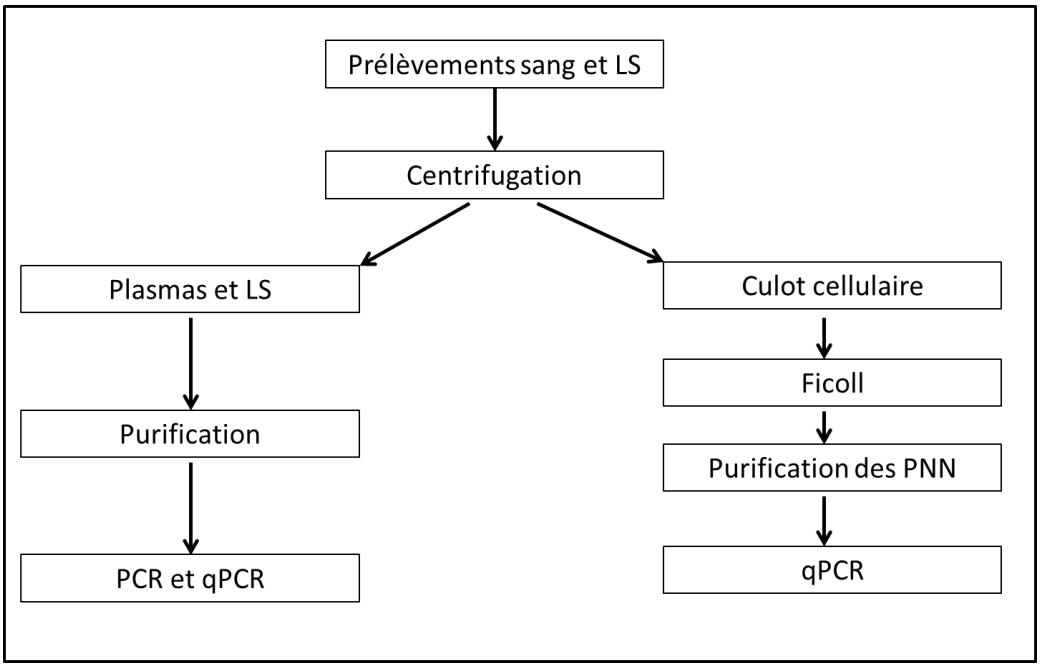


Figure 6 : Schéma récapitulatif de la méthode d'analyse des échantillons

III-3- Paramètres clinico-biologiques d'intérêt

Dans l'optique d'établir une corrélation entre la présence d'ADN mt dans les prélèvements et l'activité de la maladie, nous avons colligé dans une base de données pour chaque patient au moment du prélèvement, les paramètres cliniques et biologiques suivants :

- âge
- sexe
- caractéristiques du LS : nombre d'éléments et formule cytologique pour déterminer le pourcentage de PNN, analyse bactériologique
- taux de PNN sanguins
- CRP
- pour les PR, ont également été recueillis la durée d'évolution de la maladie, l'historique des traitements, les paramètres immunologiques : anticorps anti-peptides citrullinés et facteurs rhumatoïdes, la présence d'érosions radiographiques.

En outre, afin d'évaluer l'activité de la PR, nous avons choisi comme critère objectif le score composite DAS 28- CRP. Ce dernier recense trois paramètres cliniques (le nombre d'articulations douloureuses [ND] et le nombre d'articulations gonflées [NG] sur un total de 28 articulations, ainsi que l'évaluation de l'activité de la maladie par le malade [EVA]) et un paramètre biologique : la CRP, témoin de l'inflammation (DAS 28= 0,56 x ND + 0,28 x NG + 0,36 x [CRP+1] + 0,014 x EVA + 0,96). Ce score, reconnu internationalement (111), permet de définir quatre stades d'activité de la PR :

- < 2,6 : PR en rémission
- Entre 2,6 et 3,2 : activité faible de la PR
- Entre 3,2 et 5,1 : activité modérée de la PR
- > 5,1 : activité forte de la PR

III-4- Analyse statistique

L'analyse a été réalisée avec le logiciel GraphPadPrism version 6®. Le test de Kolmogorov-Smirnov a permis, au préalable, de déterminer la distribution gaussienne ou non de nos effectifs. Pour les valeurs quantitatives non appariées, nous avons utilisé le test non paramétrique de Mann Whitney pour la comparaison de deux effectifs et celui de Kruskall Wallis pour la comparaison de plus de trois effectifs, dans les deux cas de distribution non gaussienne. Pour les valeurs appariées, nous avons utilisé le test de Student quand la distribution était gaussienne et le test de Wilcoxon dans le cas inverse. Enfin pour l'étude de corrélation, nous avons utilisé un test de Pearson (ou son équivalent, test de Spearman, pour les populations non gaussiennes).

Les résultats sont considérés comme statistiquement significatifs au risque alpha de 5% soit une p-value inférieure à 0,05.

IV. RESULTATS

IV-1- Caractéristiques des patients inclus dans l'étude

Nous avons inclus 65 patients porteurs d'un rhumatisme inflammatoire et 27 sujets contrôles. Ils se répartissent de la façon suivante :

- 57 patients porteurs de PR dont nous avons pu analyser 67 échantillons comportant 40 échantillons de plasmas et 27 LS (soit 10 patients pour lesquels nous disposions à la fois des prélèvements sanguins et articulaires)
- 12 patients porteurs d'AM dont nous avons pu analyser 8 LS et 7 plasmas (dont 5 patients pour lesquels nous disposions en parallèle des prélèvements articulaires et sanguins)
- 12 patients porteurs d'arthrose dont nous n'avons obtenu que les LS
- 15 volontaires sains dont nous avons étudié le plasma.

Tous les patients porteurs de PR répondaient aux critères ACR/ EULAR de la maladie. Pour les patients porteurs d'AM (goutte ou chondrocalcinose), le diagnostic était retenu devant la présence de microcristaux dans le LS, la présence de signes radiologiques de chondrocalcinose ou en présence d'un LS très inflammatoire et stérile en l'absence d'arguments pour une autre étiologie, notamment chez le sujet âgé.

Les caractéristiques clinico-biologiques des différents effectifs sont présentées dans le tableau 1. Il est à noter que tous les LS étudiés étaient stériles.

Le groupe de patients PR comportait une majorité de femmes (64,9%) avec un âge médian de 63 ans (30 à 85 ans). Seuls 5 patients (8,7%) étaient séronégatifs (facteur rhumatoïde et anti-CCP négatifs). La durée moyenne d'évolution de la maladie était de 9 ans avec une médiane de 3 lignes thérapeutiques. Six patients étaient naïfs de traitement, avec un diagnostic récent (inférieur à 1 an dans tous les cas). Il s'agissait majoritairement de patients avec une PR active puisque le DAS28 CRP médian était de 5,12, traduisant une activité forte de la maladie, érosive dans près de la moitié des cas (47,3%). Concernant les paramètres de l'inflammation, le nombre médian de PNN était normal à 5,79 G/L (1,27 à 23,8 G/L) avec une CRP médiane augmentée à 27,15 mg/L (0,2 à 188 mg/L). Cette inflammation systémique modérée contrastait avec l'inflammation synoviale. Les 27 LS obtenus étaient de nature

inflammatoire avec une cellularité médiane de 15 000 éléments/mm3. Dans les 15 LS où la formule était réalisée (55,5% des prélèvements), les PNN prédominaient largement avec un nombre médian de 29 308/mm3 (80% des éléments).

Pour le groupe AM, le sex ratio était inversé avec 16,6% de femmes pour 83,4% d'hommes et l'effectif discrètement plus âgé (âge médian de 66 ans – 40 à 92 ans). En revanche, en dépit d'une cellularité médiane plus faible (7760 éléments dont 6518 PNN soit 92% des éléments), l'inflammation systémique était plus marquée avec un nombre médian de PNN à 7,02G/L (3,57 à 22,13) et surtout une CRP médiane très augmentée à 95,6 mg/L (31,5 à 271,9 mg/L).

A l'image du groupe PR, le groupe arthrose (OA) était majoritairement féminin (58,3%) avec un âge médian plus élevé à 74,5 ans. Comme attendu, les LS étaient de nature mécanique avec une cellularité médiane de 200 éléments/mm3, sans formule réalisable dans 80,3% des cas. Aucun stigmate d'inflammation biologique n'a été détecté (nombre médian de leucocytes à 4,19 G/L et CRP médiane à 2,4 mg/L).

Enfin, le groupe de volontaires sains était plus jeune que nos patients avec un âge médian de 28,5 ans, et un sex ratio conservé par rapport aux groupes PR et OA (60% de femmes pour 40% d'hommes).

	PR (n=57)	AM (n=11)	OA (n=12)	Témoins (n=15)
Age (ans)	63 (30 à 85)	66 (40 à 92)	74,5 (38 à 91)	28,5 (23 à 43)
Sex ratio	F 64,9% (n=37) H 35,1% (n=20)	F 16,6% (n=2) H 83,4% (n=10)	F 58,3% (n=7) H 41,7% (n=5)	F 60% (n=9) H 40% (n=6)
Nombre de PNN sanguins (G/L)	5,79 (1,27 à 23,8)	7,02 (3,57 à 22,13)	4,19 (3,01 à 6,65)	
CRP (mg/L)	27,15 (0,2 à 188)	108,9 (31,5 à 271,9)	2,4 (2 à 32,2)	
Nombre d'éléments dans le LS/mm^3	15000 (20 à 600000)	7760 (1200 à 210000)	200 (110 à 1910)	
Nombre de PNN dans le LS/mm^3	29308 (80% des éléments)	6518 (92% des éléments)		
DAS-28 CRP	5,12 (1,5 à 7,68)			
Présence de FR ou ACPA	91,3% (n=52)			
Présence de lésions érosives	47,3% (n= 27)			
Durée d'évolution de la maladie	9 ans (0,5 à 56)			
Traitements antérieurs	89,5% (n= 51)			
Nombre de lignes de traitement	3 (0 à 8)			

Tableau 1 : Résumé des caractéristiques clinico-biologique des patients inclus dans l'étude (résultats exprimés en médiane, min/max)

IV-2- Détection d'ADN mt dans les échantillons

La première étape de cette étude consistait à confirmer l'observation de la littérature, relative à la présence d'ADN mt dans le LS et le plasma de patients atteints de PR, dans le plasma de témoins sains et son absence dans le LS d'arthrose (99). Pour cela, ont été analysés par PCR classique, 10 échantillons de LS de PR, 3 LS d'arthrose, 5 plasmas de PR et 5 plasmas de témoins. Il est à noter qu'aucun prélèvement d'AM n'a été analysé par PCR classique, l'inclusion de ces patients ayant débuté ultérieurement à la réalisation de ces analyses préliminaires.

Les PCR (Figures 7 et 8) ont permis de confirmer la présence d'ADN mt dans l'intégralité des LS et plasmas de PR testés et dans les plasmas de témoins. Pour les LS d'arthrose, 2 des 3 échantillons sont revenus positifs, sans toutefois de signe de contamination de notre échantillon, ce qui n'avait pas été retrouvé dans la publication de *Hajizadeh* et al (99).

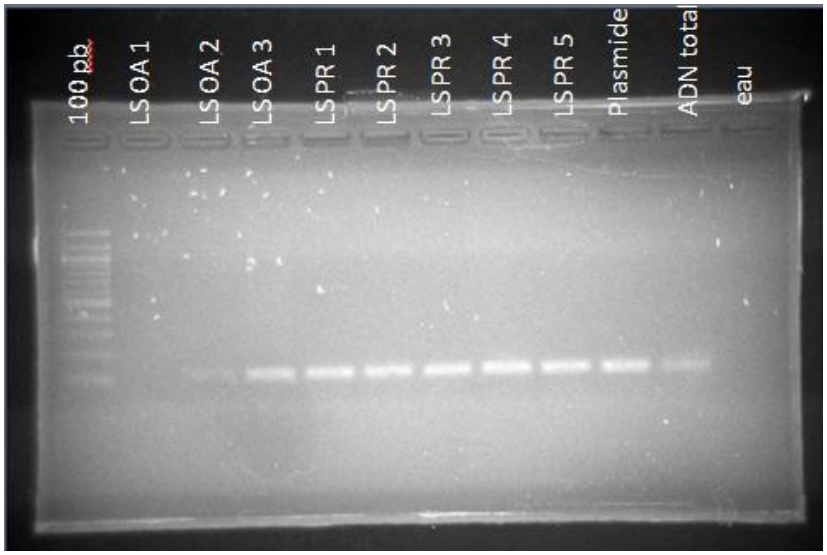


Figure 7 : PCR de LS purifiés de PR (LS PR) et d'arthrose (LS OA)

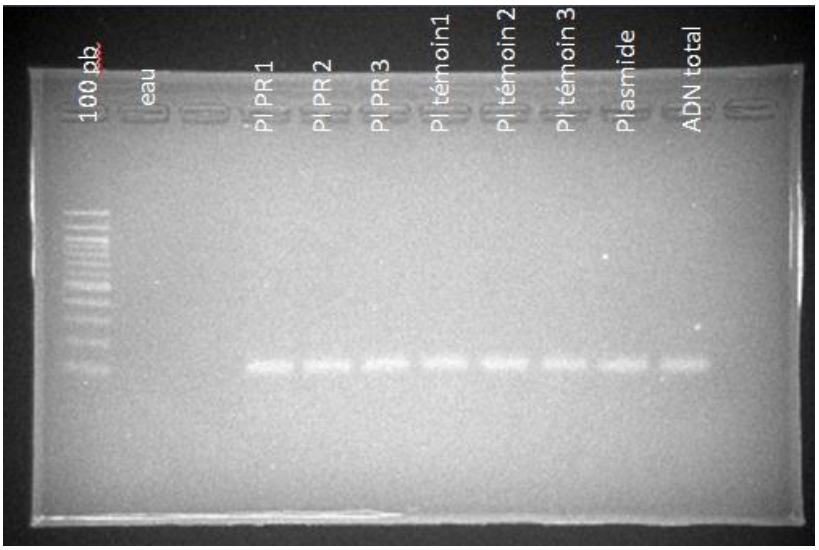


Figure 8 : PCR de plasmas (Pl) purifiés de PR (Pl PR) et de témoins (Pl témoins)

La conclusion de ces PCR préliminaires est qu'il y a bien de l'ADN mt dans les plasmas et LS de PR mais également dans les échantillons des témoins négatifs (arthrose et sang de sujet sains). Dès lors, la nécessité de quantifier l'ADN mt dans ces échantillons s'imposait, à la recherche d'une différence quantitative entre les patients et les témoins.

IV-3- Quantification de l'ADN mt dans les échantillons

Nous avons donc analysé par qPCR 47 LS (27 LS de PR, 8 LS d'AM et 12 LS d'OA) et 62 plasmas (40 plasmas de PR, 7 plasmas d'AM et 15 plasmas de volontaires sains). Les résultats sont représentés sur la figure 9.

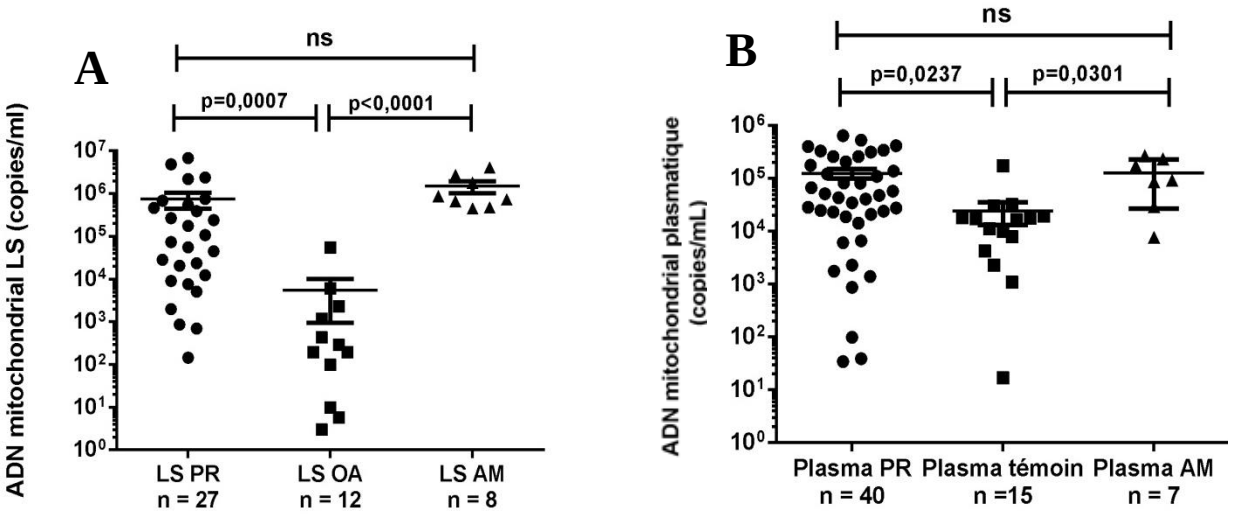


Figure 9 : Quantification comparative d'ADN mt : **A** : dans les LS de PR et d'arthrose (OA) et d'arthrite microcristalline (AM), **B** : dans les plasmas de PR, de témoins sains et d'AM.

Les liquides synoviaux inflammatoires contiennent significativement plus d'ADN mt que les liquides mécaniques d'arthrose. Ainsi, les LS de PR contiennent en moyenne 749 147 copies/mL +/- 310 776 contre 5460 copies/mL +/- 4507 pour les LS d'OA (p=0,0007) et ceux d'AM contiennent en moyenne 1 486 000 copies/mL +/- 468 318 ($p < 0,0001$). En revanche, même si les LS d'AM semblent contenir plus d'ADN mt (près du double si l'on considère les moyennes), il n'y a pas de différence significative entre les 2 groupes de rhumatisme inflammatoire.

Pour les prélèvements sanguins, là encore les patients porteurs de PR et d'AM ont statistiquement plus d'ADN mt dans leurs plasmas (respectivement p= 0,02 et 0,03) que les volontaires sains avec pour moyennes 124 989 copies/mL +/- 25 952 pour les PR, 128 114 copies/mL +/- 38212 pour les AM et 24 210 copies/mL +/- 11067 pour les sujets sains. Les taux moyens d'ADN mt plasmatiques des PR et des AM étant sensiblement identiques, il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes.

Ainsi, ces deux rhumatismes inflammatoires s'accompagnent de la présence d'ADN mt localement, sur le site de l'inflammation mais aussi dans la circulation sanguine.

Toutefois, l'analyse plus fine des résultats retrouve pour la PR, une hétérogénéité des taux d'ADN mt, aussi bien articulaires que plasmatiques, qui pourrait expliquer le constat d'un taux moyen d'ADN mt dans le LS deux fois plus bas que celui d'AM. Le taux d'ADN mt dans le LS de PR s'échelonne ainsi de 0 à 10^6 copies/ml et dans le plasma de 10 à 10^5 copies/ml. A l'inverse, les résultats du groupe AM sont parfaitement homogènes. L'inclusion dans le groupe PR de patients en dehors d'épisode de poussée de la maladie pourrait participer à l'hétérogénéité des résultats pour les échantillons plasmatiques. Une disparité dans l'activité de la maladie serait susceptible également d'être impliquée dans nos résultats articulaires. Aussi, nous avons voulu étudier la corrélation du taux d'ADN mt à l'activité de la PR.

IV-4- Analyse de la corrélation entre l'activité de la PR et la quantité d'ADN mt

IV-4-1- Activité de la PR et ADN mt synovial

Nous avons analysé les dossiers des 27 patients PR pour lesquels nous disposions du LS et nous avons pu déterminer le score DAS 28-CRP chez 23 d'entre eux. Un avait un score < 3,2 (activité faible), 8 avaient un score compris entre 3,2 et 5,1 (activité modérée) et 14 un score > 5,1 (activité forte). Le patient avec une activité faible, présentait en fait une poussée de gonarthrose secondaire avec un liquide mécanique (20 éléments/mm^3). Il a, donc, été exclu

de l'analyse. La figure 10 représente le taux d'ADN mt selon les 2 sous-groupes (activité modérée et activité forte) de PR, comparativement aux liquides d'OA et d'AM.

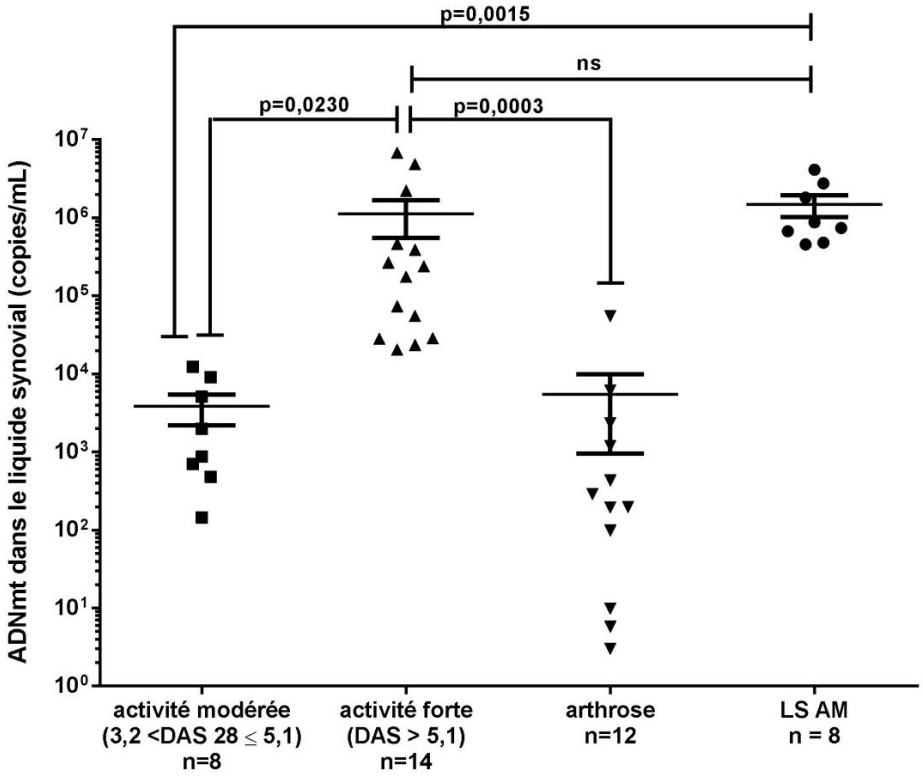


Figure 10 : Quantification de l'ADN mt présent dans les LS d'arthrose, d'AM et de PR en fonction de l'activité de la maladie.

Le nombre de copies d'ADN mt dans les LS de PR augmente avec l'activité de la maladie. Ainsi, les PR avec une activité forte ont un taux d'ADN mt significativement plus élevé que les PR avec activité modérée (moyennes respectives de 1121000 copies/mL +/- 565949 contre 4259 copies/mL +/- 1813, p=0,0230). De même, le nombre de copies d'ADN mt des PR avec activité forte est plus élevé que celui des patients arthrosiques (5460 copies/mL +/- 4507, p= 0,0003). La quantité d'ADN mt moyenne est sensiblement identique dans les groupes arthrose et PR avec activité modérée. Il est donc logique de constater une différence significative entre les groupes AM et PR avec activité modérée (p=0,0015). En revanche, il n'y a pas de différence statistique entre les AM et le sous-groupe activité forte (moyenne de 1 486 000 copies/mL +/- 468 318 vs 1121000 copies/mL +/- 565949, respectivement).

En conclusion, les sous-groupes PR avec activité forte et AM sont comparables en termes de nombre de copies d'ADN mt synovial. Il en est de même pour les sous-groupes

activité faible et arthrose. L'activité inflammatoire locale articulaire semble donc corrélée à la quantité d'ADN mt présente.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé un test de corrélation de Pearson entre le nombre de copies d'ADN mt synovial et le DAS 28-CRP (figure 11).

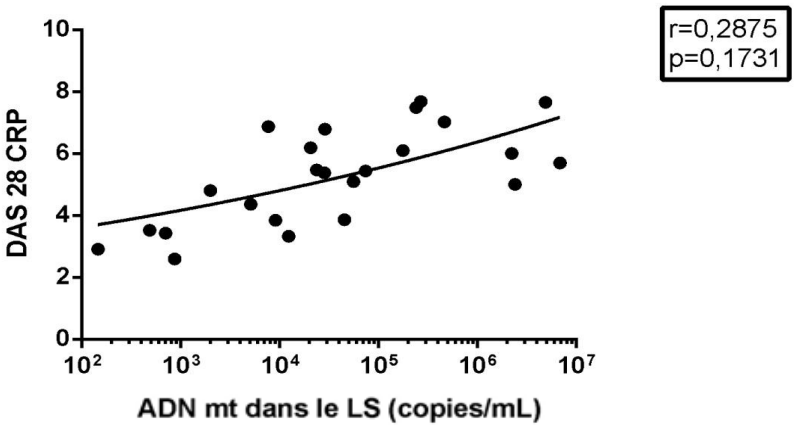


Figure 11 : Corrélation de la quantité d'ADN mt présente dans le LS de PR en fonction du score clinico-biologique d'activité DAS 28-CRP.

Contrairement à ce que laissaient sous-entendre les résultats précédents, il n'y a pas de corrélation entre le score d'activité de la PR, DAS 28-CRP, et la quantité d'ADN mt synovial ($r = 0,28$, $p = 0,17$). Une des explications possibles serait une surévaluation du score DAS 28 par la présence de deux composants subjectifs dans ce score : le nombre d'articulations douloureuses et l'évaluation de l'activité de la maladie par le malade.

Aussi, pour corréler la quantité d'ADN mt dans le LS à l'inflammation, nous avons utilisé un second paramètre objectif de celle-ci, la CRP (figure 12).

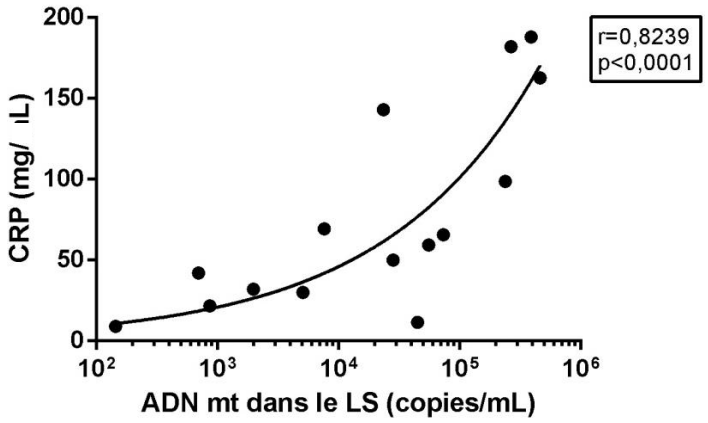


Figure 12 : Corrélation de la quantité d'ADN mt présente dans le LS de PR en fonction du marqueur biologique d'inflammation CRP.

Le test de corrélation de Pearson objective une très forte corrélation ($r = 0,82$, $p < 0,0001$) de l'ADN mt synovial avec la CRP.

L'ADN mt semble donc bien être un biomarqueur de l'activité inflammatoire articulaire dans la PR.

IV-4-2- Activité de la PR et ADN mt plasmatique

Nous avons analysé les dossiers des 40 patients PR pour lesquels nous disposions du plasma et avons pu déterminer le score DAS 28-CRP chez 39 d'entre eux. Neuf patients, prélevés en dehors de toute poussée avaient une activité faible de la maladie (score DAS 28-CRP < 3,2). Les 30 patients restants ont été prélevés en phase de poussée de la maladie et présentaient, par conséquent, une maladie active avec un score DAS 28 – CRP > 3,2. Trois d'entre eux avaient une activité modérée avec un score entre 3,2 et 5,1 et 27, une activité forte avec un score > 5,1. Afin d'établir une comparaison entre les patients actifs et inactifs, nous avons regroupé les 30 patients avec un score DAS 28 > 3,2.

Les résultats sont présentés dans la figure 13, comparativement aux plasmas d'AM et de volontaires sains.

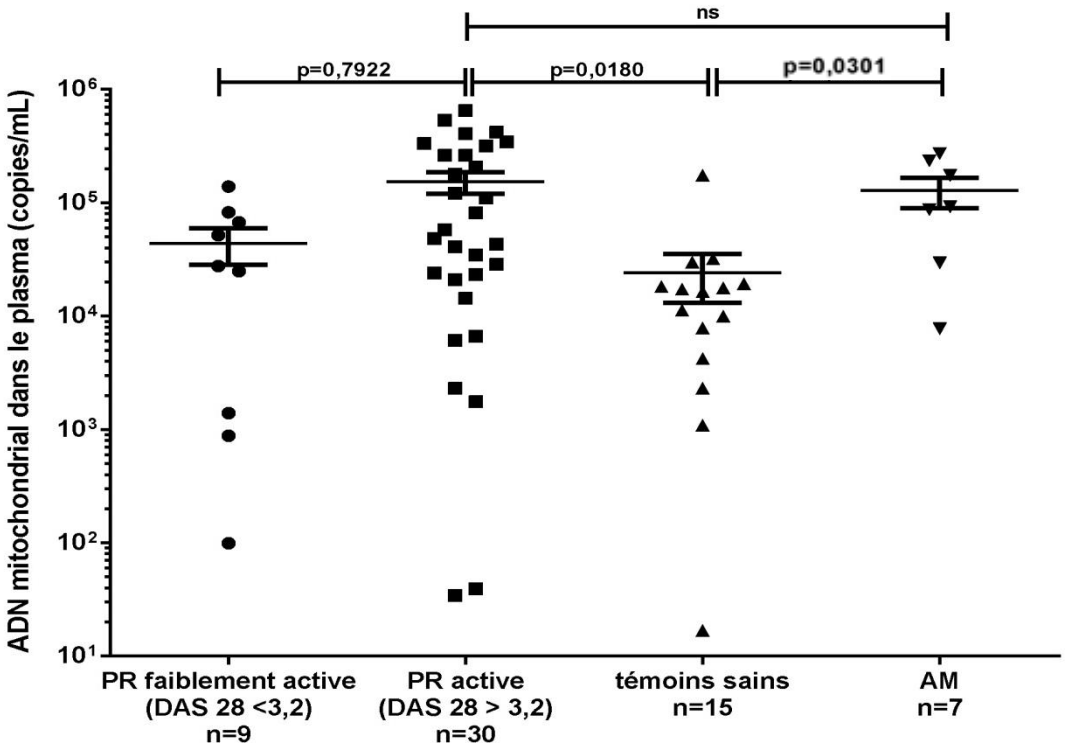


Figure 13 : Quantification de l'ADN mt présent dans les plasmas d'AM, de sujets sains et de PR en fonction de l'activité de la maladie.

La quantité d'ADN mt plasmatique semble indépendante de l'activité de la PR. Ainsi, il n'y a pas de différence significative du nombre de copies d'ADN mt entre les PR actives et les PR faiblement actives (moyennes respectives de 152 827 copies/mL, +/- 32866 et de 43985 +/- 15521, p= 0,79). Le taux moyen d'ADN mt plasmatique des PR actives est sensiblement identique à celui du groupe AM (128 114 copies/mL +/- 38212) expliquant d'une part l'absence de différence significative entre les groupes AM et PR faiblement active, et d'autre part l'existence d'une différence significative entre le groupe PR active et témoins sains (p= 0,018). En revanche, les groupes PR faiblement active et témoins sains ont des taux d'ADN mt proches (43985 +/- 15521 vs 24210 copies/mL +/- 11067).

Si l'on exclut du groupe PR active, les trois patients avec une activité modérée (DAS 28-CRP entre 3,2 et 5,1), les résultats statistiques ne sont pas modifiés. Les résultats sont hétérogènes dans les deux sous-groupes de PR, s'échelonnant de 10^2 à 10^5 copies/ml pour les PR faiblement actives et de 30 à 10^6 copies/ml pour les PR actives, potentiellement en lien avec des écarts de score de DAS 28 importants au sein de chaque sous-groupe. Aussi, nous avons réalisé un test de corrélation de Spearman entre ces deux paramètres (figure 14).

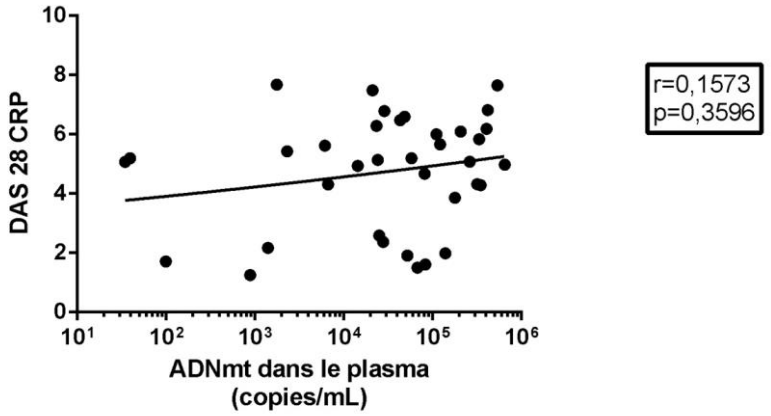


Figure 14 : Corrélation de la quantité d'ADN mt présente dans le plasma de PR en fonction du score clinico-biologique d'activité DAS 28-CRP.

Aucune corrélation n'a été établie entre ces deux paramètres (r = 0,15, p= 0,35). Le score DAS 28-CRP impliquant des paramètres subjectifs et au vu des résultats de corrélation obtenu pour l'ADN mt synovial, nous avons également réalisé un test de corrélation de Spearman entre l'ADN mt plasmatique et la CRP (figure 15).

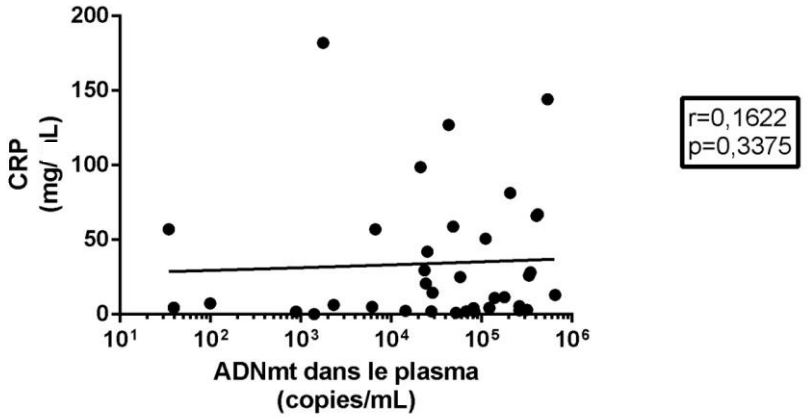


Figure 15 : Corrélation de la quantité d'ADN mt présente dans le plasma de PR en fonction du marqueur biologique d'inflammation CRP.

Contrairement à l'ADN mt du LS, il n'y a pas de corrélation entre la CRP et l'ADN mt plasmatique chez les patients PR (r = 0,16, p= 0,33).

L'ADN mt est donc un marqueur d'inflammation quand il est libéré dans l'articulation mais ne semble pas être un marqueur d'inflammation plasmatique dans la PR, bien que son nombre de copies circulant plasmatique soit plus élevé que chez les témoins sains.

IV-4-3- ADN mt et autres marqueurs de la PR

Se référant à la publication d'*Hajizadeh* (99), nous avons voulu étudier l'association de la présence d'ADN mt extracellulaire à d'autres marqueurs de la PR.

La quasi-totalité de nos patients PR (52 sur 57) étant porteurs de facteur rhumatoïde ou d'anticorps anti-peptides citrullinés, nous n'avons pas pu étudier l'association entre la séropositivité de la maladie et la présence d'ADN mt. De même, six patients seulement étant naïfs de traitement, il était difficile d'étudier l'impact de la prise de médicament sur la présence d'ADN mt, ce d'autant que la nature des traitements était très hétérogène et le nombre de lignes thérapeutiques élevé (médiane à 3).

Un autre paramètre qu'il nous semblait important d'étudier car témoin de l'activité locale de la PR était la présence d'érosions osseuses. Nous avons pu récupérer les données radiologiques de 21 patients sur les 27 dont nous disposions du LS. Seize d'entre eux présentaient une érosion ou plus. Il n'y a, toutefois, pas de différence significative en termes de nombre de copies d'ADN mt dans le LS que les patients aient une PR destructrice, érosive ou non (respectivement 597368+/- 321978 copies/mL vs 453539 +/- 440866 copies/ml, p= p=0,4269), sous réserve d'un effectif d'étude réduit pour les patients sans érosion (figure 16).

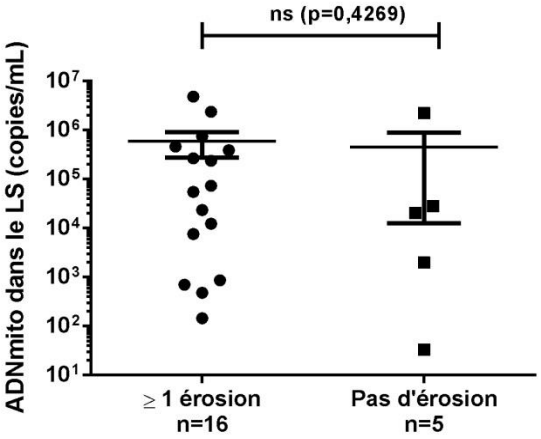


Figure 16 : Quantification du taux d'ADN mt dans le LS de PR en fonction du caractère érosif ou non de la maladie

IV-5- Le PNN source d'ADN mt

IV-5-1- Le PNN source d'ADN mt dans la PR

Le PNN représente le type cellulaire prédominant dans le liquide articulaire de PR. Dans notre population d'étude, il représente 80% des éléments du LS avec un nombre médian de 34760/mm^3 dans les LS où la formule cytologique a été réalisée. En raison de la quantité importante d'ADN mt retrouvée dans le LS de PR, nous avons naturellement émis l'hypothèse que le PNN constituait la source de l'ADN mt libéré.

Nous avons pu obtenir la numération des PNN articulaires pour 14 des 27 LS de PR. Un premier argument indirect en faveur de notre hypothèse est l'existence d'une corrélation entre le nombre de PNN présent dans le LS de PR et la quantité d'ADN mt retrouvée localement (r = 0,75, p= 0,0017) (figure 17).

Concernant les échantillons sanguins, nous avons pu obtenir le nombre de PNN pour 35 prélèvements sur 40. Contrairement au LS, le nombre de PNN sanguins circulants n'est pas corrélé à la quantité d'ADN mt plasmatique (r = 0,09, p= 0,58) (figure 17).

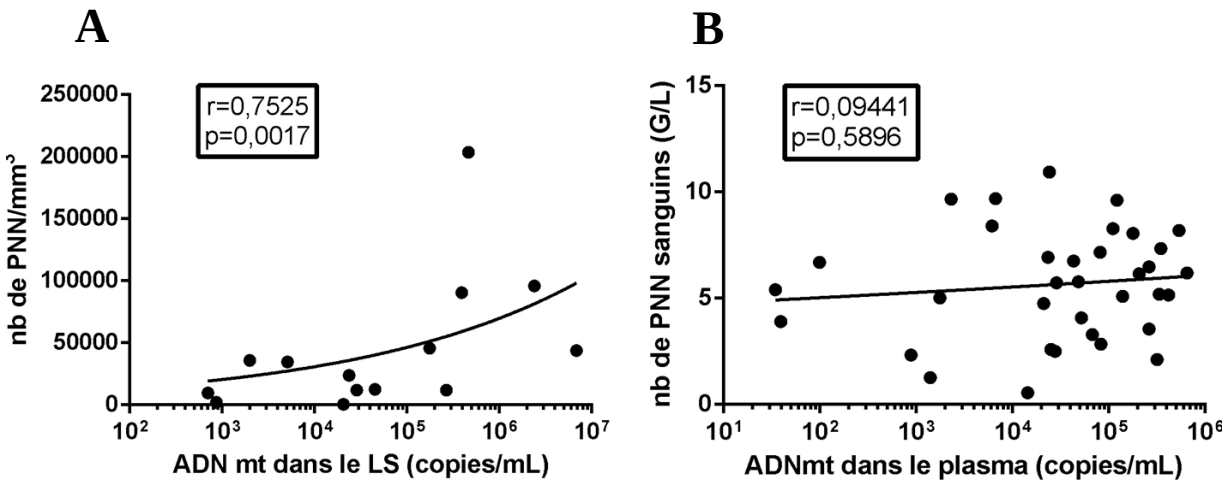


Figure 17 : Corrélation entre la quantité d'ADN mt et le nombre de PNN : **A** : dans le LS ; **B** : dans le plasma, de PR.

Pour préciser notre hypothèse, nous avons étudié le contenu en ADN mt des PNN de PR du sang et du LS comparativement à celui de PNN sanguins de sujets sains. Pour obtenir des données comparables, les échantillons de PNN analysés comportaient tous le même nombre de cellules (10^6 PNN) et nous avons normalisé le contenu en ADN mt à celui d'un gène nucléaire de ménage, exprimant les résultats en ratio d'ADN mt/ ADN nucléaire. Quarante échantillons de PNN sanguins de PR, 9 de PNN articulaires de PR et 11 de PNN sanguins de sujets sains ont pu être analysés par qPCR (figure 18).

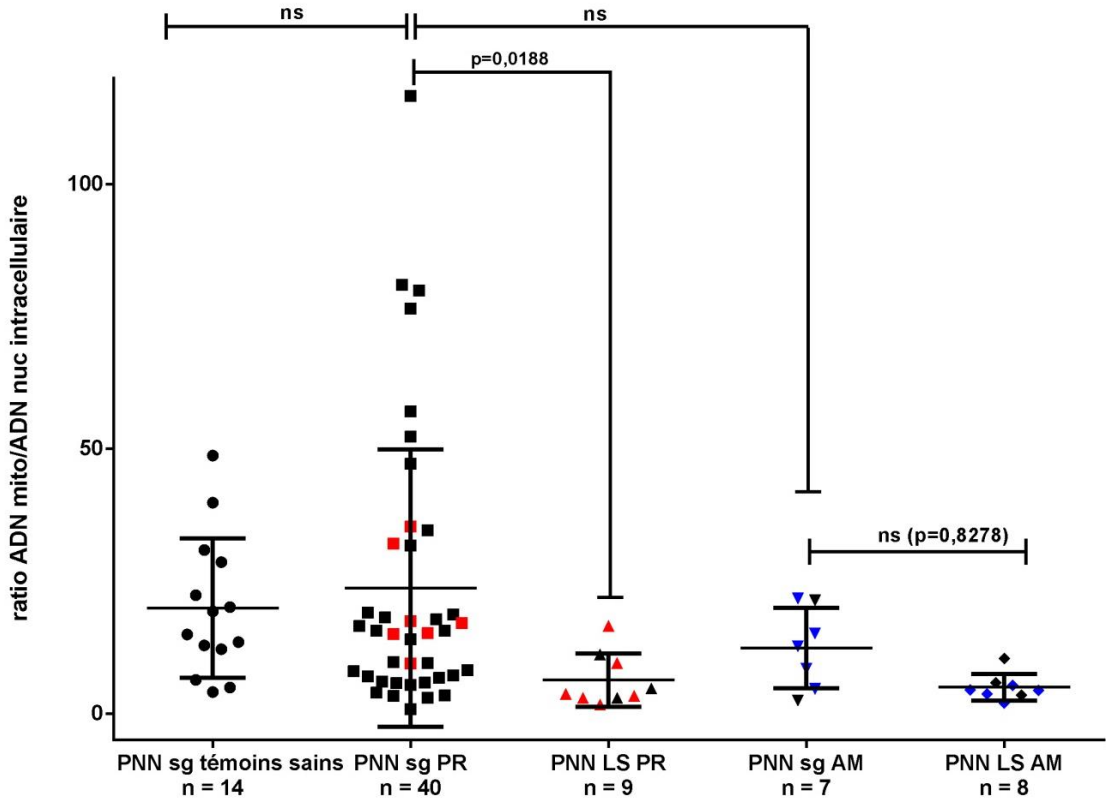


Figure 18 : Estimation du contenu en ADN mt des PNN par la détermination du ratio ADN mt/ ADN nucléaire dans les PNN sanguins de PR, de témoins, d'AM et dans les PNN articulaires de PR et d'AM (les symboles rouges correspondent à des patients PR dont le ratio a pu être déterminé en parallèle dans les PNN sanguins et articulaires ; les symboles bleus correspondent à des patients AM dont le ratio a pu être déterminé en parallèle dans les PNN sanguins et articulaires).

Le ratio ADN mt/ ADN nucléaire des PNN sanguins de PR n'est statistiquement pas différent de celui des PNN sanguins de sujets sains (ratio moyen à 23,73 +/- 4,14 vs 16,14 +/- 2,74, p>0,9999). En revanche, il est significativement supérieur à celui des PNN articulaires (ratio moyen à 6,324 +/- 1,674, p=0,0188), soit près du quadruple. Ceci pourrait traduire une libération par les PNN articulaires d'une partie de leur ADN mt ou une dégradation des mitochondries par mitophagie.

Cette observation est étayée par l'étude de 7 patients porteurs de PR en poussée, pour lesquels nous avons pu analyser en parallèle le contenu en ADN mt des PNN sanguins et des PNN articulaires (symboles rouges sur la figure 18). Le ratio ADN mt/ ADN nucléaire est significativement plus élevé dans leurs PNN sanguins que dans leur PNN articulaires (ratio moyen à 24,47 +/- 6,140 vs 5,331+/- 1,363, p=0,0224) (figure 19).

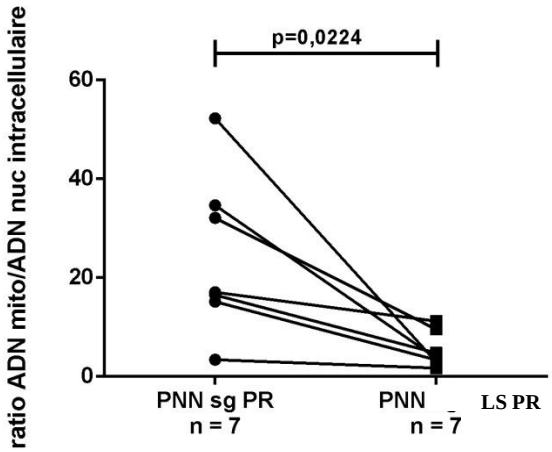


Figure 19 : Evolution du ratio ADN mt/ ADN nucléaire dans des échantillons appariés de PNN sanguins et articulaires de PR.

Chez ces 7 patients, le ratio ADN mt / ADN nucléaire intracellulaire des PNN sanguins est 4,59 fois plus haut que celui des PNN articulaires. De façon surprenante, si l'on considère leur quantité d'ADN mt extracellulaire dans le plasma et le LS, elle est 4,36 plus haute dans le LS que dans le plasma (566 576 copies/ml +/- 288 523 vs 129 955 copies/ml +/- 51 099). Ce rapport conservé d'environ 4,5 pourrait être un argument indirect en faveur d'une libération de l'ADN mt par les PNN au sein de l'articulation (figure 20).

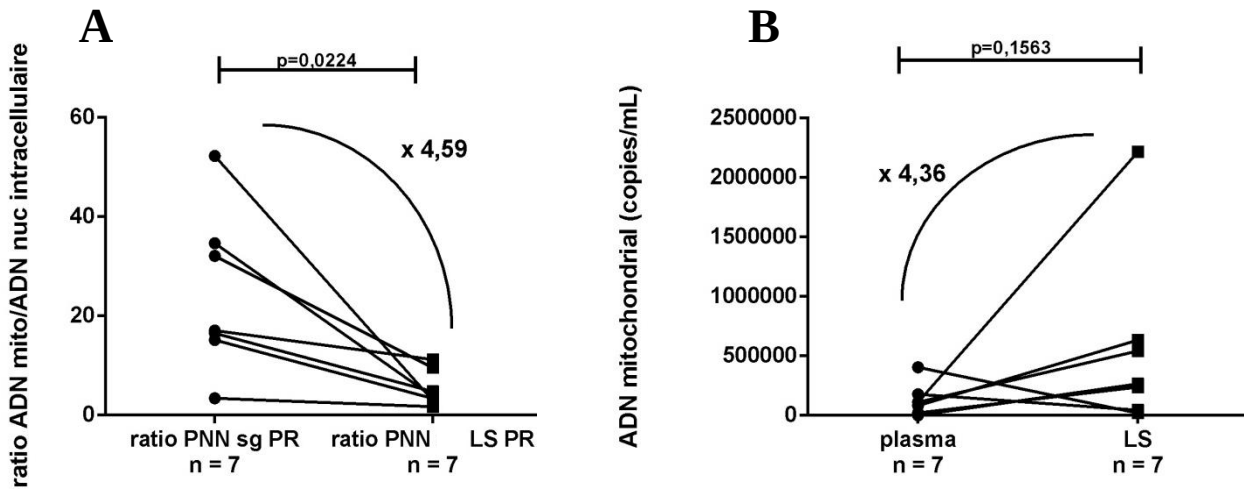


Figure 20 : Comparaison de l'évolution du ratio ADN mt / ADN nucléaire dans les PNN sanguins et articulaires de PR (**A**) et de l'évolution du nombre de copies d'ADN mt extracellulaire, synovial et plasmatique (**B**).

L'ensemble de ces éléments, certes indirects, plaide en faveur d'une implication du PNN dans la libération de l'ADN mt dans l'articulation de PR.

IV-5-2- Le PNN source d'ADN mt dans l'AM

Le PNN étant également le type cellulaire prédominant des liquides synoviaux inflammatoires d'AM (92% des éléments dans notre effectif), nous avons également suspecté son implication en tant que source d'ADN mt dans l'AM.

Nous n'avons pu obtenir la numération des PNN articulaires que pour 5 des 8 LS d'AM. Compte tenu du faible effectif nous n'avons pas pu mettre en évidence de corrélation du nombre de copies d'ADN mt articulaires au nombre de PNN du LS (r= 0,54, p= 0,29) (figure 21). Il en est de même pour les prélèvements sanguins où nous ne disposions du compte de PNN que pour 6 prélèvements sur 7. Là encore, aucune corrélation n'a pu être établie.

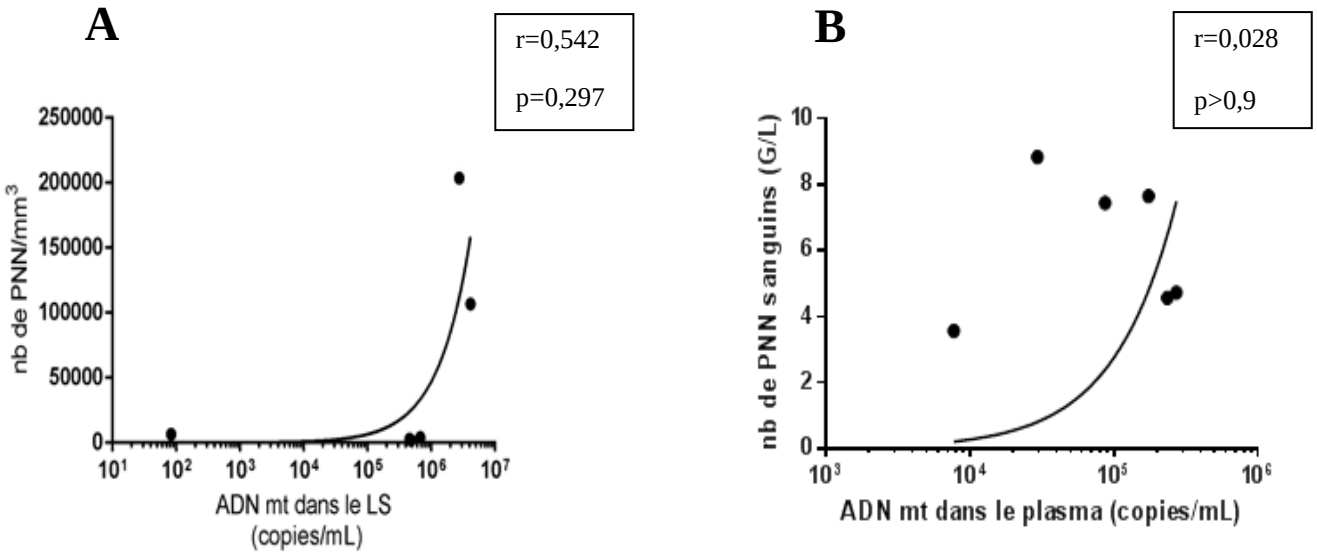


Figure 21 : Corrélation entre : **A :** la quantité d'ADN mt et le nombre de PNN dans le LS d'AM ; **B :** la quantité d'ADN mt plasmatique et le nombre de PNN sanguins

En revanche, nous avons pu analyser par qPCR les ratios d'ADN mt/ADN nucléaire dans 15 prélèvements d'AM : 7 échantillons de PNN sanguins et 8 échantillons de PNN articulaires (figure 18). Comme pour la PR, il apparait que le ratio ADN mt / ADN nucléaire est plus élevé dans les PNN sanguins d'AM que dans les PNN articulaires (ratio moyen à 12,39 +/- 2,883 vs 4,987 +/- 0,8835). Toutefois, cette différence ne ressort pas comme significative (p=0,8278), sans doute en raison de la faible taille des effectifs.

Cette tendance est tout de même étayée par l'observation de 5 patients porteurs d'AM en poussée pour lesquels nous avons pu analyser en parallèle le contenu en ADN mt des PNN sanguins et des PNN articulaires (symboles bleus sur la figure 18). Le ratio ADN mt/ ADN nucléaire des PNN sanguins est significativement plus élevé que celui des PNN articulaires (ratio moyen à 12,56 +/- 2,914 vs 4,011 +/- 0,5588, p= 0,0257) (figure 22).

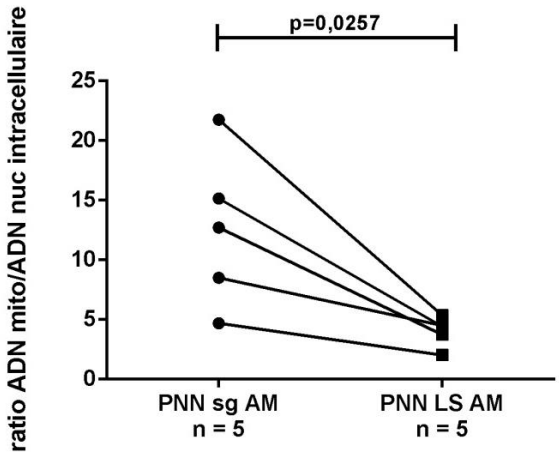


Figure 22 : Evolution du ratio ADN mt/ ADN nucléaire dans des échantillons appariés de PNN sanguins et articulaires d'AM.

Ce ratio 3,14 fois plus bas dans les PNN articulaires pourrait là encore être le témoin indirect d'un relargage d'ADN mt dans l'articulation par les PNN. Ce rapport n'a pu être comparé à celui reliant les taux d'ADN mt extra-cellulaires articulaires et sanguins en raison de données manquantes.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats aussi bien dans la PR que dans l'AM font état d'un lien entre la présence d'ADN mt dans le LS et la présence de PNN articulaires. Bien qu'il ne s'agisse que d'arguments indirects, les variations de ratio ADN mt /ADN nucléaire des PNN articulaires, corrélées dans le cas de la PR aux variations du nombre de copies d'ADN mt extra-cellulaires, soulignent l'implication potentielle du PNN en tant que source d'ADN mt.

V. DISCUSSION

Notre objectif principal était de confirmer l'observation de la littérature relative à la présence d'ADN mt dans les plasmas et LS de PR et de le quantifier. Nous avons, ainsi, pu mettre en évidence de l'ADN mt extracellulaire dans l'intégralité de nos prélèvements de PR mais également chez nos patients contrôles (AM, OA et volontaires sains), ce qui n'avait pas été retrouvé dans l'étude précédente d'*Hajizadeh* et al (99). L'objectif de quantification trouvait là sa pleine justification. Jusqu'alors, dans les travaux portant sur la PR, cet ADN mt n'avait été quantifié que par une approche semi-quantitative, fondée sur l'appréciation de l'intensité des bandes, obtenues par migration en gel d'agarose des produits de PCR. Notre approche a permis une quantification plus précise par qPCR, en réalisant une gamme étalon.

De cette quantification, il ressort un nombre significativement plus important de copies d'ADN mt extra-cellulaire dans les échantillons sanguins et articulaires de PR que dans les prélèvements de sujets contrôles (arthrose pour les LS et volontaires sains pour les plasmas). Une remarque s'impose toutefois à la lumière des caractéristiques cliniques de nos différentes populations d'étude. En effet, si les effectifs PR et AM ont un âge médian comparable (63 et 66 ans), la population arthrosique est plus âgée (74,5 ans) et les volontaires sains beaucoup plus jeunes (28,5 ans). Or, il a été démontré que les populations âgées, en raison d'un remodelage du compartiment immuno-inflammatoire responsable d'une inflammation chronique physiologique, présentaient des taux d'ADN mt plasmatiques plus élevés que des patients jeunes (100). L'âge influençant donc la quantité d'ADN mt plasmatique, il peut expliquer pour partie les différences quantitatives constatées entre notre population PR et les volontaires sains. Il serait donc nécessaire d'inclure dans le groupe témoins sains des patients plus âgés pour s'affranchir du facteur confondant de l'âge et interpréter les différences éventuelles observées à la seule lumière du cadre nosologique. A l'inverse, en dépit d'un âge plus élevé, la population arthrosique a significativement moins d'ADN mt dans son liquide synovial que la population PR, témoignant dans ce cas de l'influence de la pathologie inflammatoire articulaire et non de l'âge dans la présence locale d'ADN mt. En revanche, le sexe ne semble pas être un facteur confondant ni exercer d'influence dans la quantité d'ADN mt détectée puisque la population AM, principalement masculine, a des quantités d'ADN mt similaires dans le sang et le LS à celles de PR, population majoritairement féminine.

De notre objectif principal de quantification, a découlé un objectif de corrélation clinique, l'utilisation de la gamme étalon établie permettant d'obtenir des données quantitatives objectives et précises. La principale question était de savoir si l'activité de la maladie influençait la quantité d'ADN mt détectée. Aussi, nous avons inclus dans notre population d'étude des patients qui n'étaient pas en poussée de leur PR, donc avec une activité de leur maladie considérée comme faible. Plusieurs paramètres clinico-biologiques d'activité de la maladie nous semblaient intéressants à étudier : le score DAS 28-CRP (préféré au score DAS 28-VS, en l'absence de données sur la VS dans la majorité des dossiers consultés), l'inflammation biologique mesurée par la CRP et la présence d'érosions osseuses, témoin de l'activité destructrice locale. Les quelques données de la littérature sur la PR ne relevaient pas de corrélation entre la quantité d'ADN mt et la CRP, ni avec d'autres marqueurs d'activité comme les signes radiologiques de destruction articulaire ou les manifestations cliniques systémiques extra-articulaires (99). Le score DAS-28 n'avait cependant pas été étudié. La seule corrélation rapportée concernait la présence d'ADN mt et la positivité du facteur rhumatoïde. La quasi-totalité des patients PR de notre étude (91,3%) étant séropositive (présence de facteur rhumatoïde et/ ou d'anticorps anti-peptides citrullinés), il était difficile d'étudier l'influence de ce facteur sur la quantité d'ADN mt, ce d'autant que bien souvent, le titre de ces facteurs immunologiques, au moment de la réalisation des prélèvements, n'était pas déterminé.

De nos résultats, il ressort que l'activité de la maladie semble influencer la quantité d'ADN mt du LS. Ainsi, le sous-groupe PR avec activité forte a significativement plus d'ADN mt dans son LS que le sous-groupe PR avec activité modérée. Cette observation n'a cependant pas été confirmée par le test de corrélation de Pearson entre l'ADN mt du LS et le score DAS 28-CRP. Une des explications possibles à cette discordance de résultats serait le choix du score DAS 28-CRP comme marqueur d'activité. Ce dernier n'est pas toujours un reflet fiable de l'activité de la maladie du fait de l'utilisation de paramètres subjectifs dans son calcul. Il n'est pas rare que certains patients surestiment la perception de l'activité de leur maladie et que le nombre d'articulations douloureuses contraste avec le faible nombre d'articulations gonflées ou l'absence de signe biologique objectif d'inflammation.

Aussi, il nous apparaissait légitime de corréler la quantité d'ADN mt à la CRP, paramètre objectif de l'inflammation et donc de l'activité de la maladie. Si la CRP médiane de notre population d'étude est peu élevée (27,15 mg/L), conséquence entre autres de l'inclusion de patients avec une activité faible de la maladie, la CRP est bien corrélée à la quantité

d'ADN dans les LS de PR. L'ADN mt est donc un marqueur d'inflammation dans la PR, à l'image d'autres pathologies ou situations inflammatoires, quand il est présent dans le LS.

Ces résultats n'ont pas été confirmés sur l'étude des échantillons plasmatiques. L'activité ne semble pas influencer la quantité d'ADN mt plasmatique, aucune différence significative n'ayant été constatée entre les sous-groupes PR faiblement actives et actives. De même, il n'a pas été établie de corrélation entre l'ADN mt plasmatique et le score d'activité DAS 28-CRP. Pourtant, la quantité d'ADN mt plasmatique des PR est plus élevée que celle des volontaires sains.

Plusieurs paramètres gênent l'interprétation de ces résultats. Tout d'abord le jeune âge de la population des témoins sains, précédemment évoqué, qui peut sous-estimer la quantité d'ADN mt de la population contrôle. Le faible effectif du sous-groupe PR avec activité faible peut diminuer la puissance statistique de nos tests. Enfin, le choix du score DAS 28-CRP pour la corrélation clinique n'est pas des plus pertinents au vu des raisons mentionnées précédemment. Seule l'inclusion de sujets contrôles plus âgés et de patients supplémentaires avec une PR faiblement active, permettrait de trancher sur une éventuelle influence de l'activité de la maladie. Néanmoins, un argument en faveur d'une influence très modeste de celle-ci est l'absence de corrélation de la CRP et de la quantité d'ADN mt plasmatique.

Au vu de ces résultats, l'ADN mt articulaire parait donc être un marqueur d'inflammation. L'articulation étant le siège précoce de l'expression de la maladie, il apparait logique que l'ADN mt, en tant qu'alarmine de la réponse immunitaire innée, y soit détecté précocement et corrélé à l'activité inflammatoire locale.

Un autre marqueur d'activité locale de la maladie est la présence d'érosions osseuses, témoin précoce d'une évolution vers une PR destructrice sur le plan ostéo-articulaire. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de lien entre la quantité d'ADN mt et le caractère destructeur local, notamment en raison d'un effectif faible du sous-groupe sans érosion. Les données radiologiques étaient manquantes dans de nombreux dossiers. L'absence de prise en compte de l'ancienneté de la maladie et des traitements utilisés dans le sous-groupe avec lésions érosives, peut aussi entraver l'interprétation des résultats, certains patients ayant des lésions ostéo-articulaires anciennes et ayant reçu de multiples lignes thérapeutiques.

Si la présence d'ADN mt dans le LS et le plasma de PR était établie, restait à étudier la source cellulaire potentielle de cet ADN mt. En l'absence de littérature sur le sujet, le PNN

nous semblait être un candidat intéressant car constituant le type cellulaire prédominant dans nos échantillons (80% des cellules du LS). L'existence d'une corrélation entre le nombre de PNN articulaires et la quantité d'ADN mt dans le LS était un argument fort, bien qu'indirect, en faveur de notre hypothèse. Pour aller plus loin dans notre raisonnement, nous avons quantifié le contenu en ADN mt des PNN par l'intermédiaire du ratio ADN mt/ ADN nucléaire. Une augmentation de ce ratio pourrait être le témoin d'une biogénèse mitochondriale et une diminution, celui d'une biogénèse déficiente, d'une mitophagie importante ou encore d'une libération d'ADN mt dans le milieu extracellulaire. Le ratio des PNN sanguins de PR est similaire à celui de sujet sains, traduisant vraisemblablement une biogénèse mitochondriale similaire. En revanche le ratio des PNN articulaires significativement plus bas que celui des PNN sanguins est en faveur soit d'une mitophagie soit d'un processus de libération au sein de l'articulation. Un argument pour trancher entre ces deux mécanismes est fourni par l'analyse des prélèvements appariés de sept patients. Leur ratio dans les PNN sanguins est 4,59 fois plus haut que celui des PNN articulaires. Ce rapport de 4,5 concorde avec celui séparant le nombre de copies d'ADN mt du LS de celui du plasma (x 4,36). Ce dernier élément parait aller à l'encontre d'un processus de mitophagie accéléré mais étaye l'hypothèse d'une libération locale d'ADN mt par le PNN. Le PNN de PR, une fois arrivé dans l'articulation, semble libérer une partie de son contenu en ADN mt dans le LS, diminuant ainsi son ratio intracellulaire. Ceci reste néanmoins une simple hypothèse, en l'absence de réalisation d'expériences *in vitro* confirmant ce processus.

En outre, si un lien semble établi entre PNN articulaire et ADN mt, l'absence de corrélation entre le nombre de PNN sanguins et la quantité d'ADN mt plasmatique peut, en revanche, amener à s'interroger sur une source cellulaire autre. D'autres cellules circulantes de l'immunité innée (monocytes) ou adaptative (lymphocytes) impliquées dans la physiopathologie de la PR pourraient représenter de bons candidats et faire l'objet d'investigations complémentaires.

Par ailleurs, demeure une question cruciale relative au mécanisme de libération d'ADN mt dans le milieu extracellulaire. Divers mécanismes, dépendants ou non de la mort cellulaire, ont été impliqués dans la libération d'ADN mt (112). Le premier mécanisme évoqué par les auteurs qui se sont intéressés au polytraumatisme et à l'ADN mt est la nécrose. En effet, la rhabdomyolyse est fréquente dans ces situations et le myocyte est une source importante d'ADN mt compte tenu de sa masse mitochondriale élevée. Il a ainsi été mis en évidence une corrélation entre le taux de CPK, reflet de la rhabdomyolyse et la quantité d'ADN mt plasmatique (84). Si la nécrose est le principal mécanisme de libération dans le

polytraumatisme, il est transposable aux autres situations cliniques où a été détecté de l'ADN mt : l'infarctus du myocarde avec sa lyse des cardiomyocytes, le cancer associé à un turn over important de la masse tumorale, l'infection par le VIH avec la mort des cellules infectées, le vieillissement avec l'augmentation du stress oxydatif… Dans la PR, l'afflux des PNN dans le LS est tel, qu'en présence d'une apoptose déficiente, nombreux sont ceux à mourir par nécrose.

D'autres mécanismes de libération par mort cellulaire, impliquant notamment le PNN ont été évoqués. C'est le cas de la NETose. Il s'agit d'un mécanisme de mort cellulaire différent de l'apoptose et de la nécrose où le PNN émet des filets, autrement appelés NETs (Neutrophil Extracellular Traps), comportant de la chromatine décondensée, des histones, des enzymes granulaires et des peptides anti-microbiens (41). Ce mécanisme initialement découvert dans le contexte de la défense anti-microbienne a été mis en évidence dans de nombreuses pathologies auto-immunes comme le lupus érythémateux systémique ou la PR (113). L'exposition d'antigènes nucléaires et cytosoliques favorise la rupture de tolérance vis-à-vis du soi.

Ainsi, les PNN de PR, circulants et articulaires, sont plus sensibles *in vitro* à la NETose, spontanée ou induite, que les PNN d'arthrose ou de sujets sains. De même, des Nets ont été mis en évidence dans la synoviale et les nodules rhumatoides. Cette NETose est précoce et corrélée à la présence d'anticorps anti-peptides citrullinés et à la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα ou l'IL6 (43). Si l'on a longtemps considéré que les NETs contenaient principalement de l'ADN nucléaire, il est maintenant clairement établi qu'ils exposent également de l'ADN mt. La nature du stimulus inducteur de Netose influence le contenu en acide nucléique. Ainsi, une stimulation des PNN par du NO ou par du LPS ou C5a induit des NETs contenant de l'ADN mt (114).

Toutefois, il semble que la mort cellulaire n'est pas nécessairement requise pour libérer de l'ADN mt. Le polynucléaire éosinophile (PNE) est égalemement capable d'émettre des EET (Eosinophil Extracellular Traps) contenant de l'ADN mt et des peptides granulaires, participant à la défense anti-infectieuse digestive, notamment anti-parasitaire (115). Il a ainsi été décrit un phénomène de catapultage de l'ADN mt couplé au contenu enzymatique granulaire en moins d'une seconde et à la vitesse de 20 µm/s. Au décours de cette expulsion d'ADN mt, les PNE ne montrent aucun stigmate de mort cellulaire (116). Ce mécanisme a pu être extrapolé au PNN. *In vitro*, des PNN viables, mais préalablement activés par du GM-CSF, sont ainsi capables après stimulation par du LPS ou du C5a d'émettre des NETs,

libérant leur ADN mt dans l'environnement. Non seulement cette émission de NETs ne requiert pas de mort cellulaire, mais il s'avère que ces PNN ont une durée de vie allongée (117). Ce mécanisme pourrait être transposable à la PR. En effet, dans notre étude, les PNN articulaires qui ont un ratio ADN mt/ ADN nucléaire bas, étaient des PNN viables au moment où ils ont été isolés (mortalité en coloration Trypan bleu < 10%). La baisse du ratio comparativement aux PNN sanguins peut donc rendre compte d'une libération sans mort cellulaire obligatoire.

Enfin, pour certains, la libération d'ADN mt dans le milieu extracellulaire n'est pas indispensable pour exercer une action pro-inflammatoire. En témoigne l'activation de l'inflammasome par l'intéraction de NLRP3 avec l'ADN mt qui échappe au processus d'autophagie et est libéré dans le cytosol (80). Ce mécanisme, impliqué notamment dans les pathologies cardio-vasculaires (98), peut rendre compte d'une partie de l'inflammation engendrée par l'ADN mt dans la PR mais n'explique pas pour autant la présence d'autant d'ADN mt dans le LS.

Si l'ADN mt du LS est un marqueur de l'activité inflammatoire, il n'est pas l'apanage de la PR puisqu'il est également retrouvé dans d'autres rhumatismes inflammatoires comme l'arthrite microcristalline. En effet, la quantité d'ADN mt est significativement plus élevée dans les échantillons sanguins et articulaires comparativement aux contrôles, avec des taux moyens sensiblement similaires à ceux de la PR. Le faible effectif n'a cependant pas permis de mettre en évidence une corrélation avec l'activité inflammatoire mesurée par la CRP. Quant à sa source, là encore l'importante prédominance de PNN (92% des éléments) a fait de ce dernier un candidat de choix. Si le faible effectif, par suite d'un manque de données dans les dossiers, n'a pas permis d'établir de corrélation entre le nombre de PNN articulaires et la quantité d'ADN mt dans le LS, en revanche, la variation des ratio ADN mt/ ADN nucléaire semble encore incriminer le PNN comme source cellulaire. En effet, à l'image de cinq patients dont les prélèvements ont été appariés, ce ratio est significativement plus bas dans les PNN articulaires que dans les PNN sanguins. L'hypothèse d'une libération d'ADN mt dans le LS par le PNN est également soulevée.

VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'ADN mt, DAMP mitochondrial et alarmine de l'inflammation, est donc impliqué dans la PR et de façon plus globale dans les rhumatismes inflammatoires, comme en atteste sa présence dans le plasma et le LS de patients. Son taux articulaire augmentant avec l'activité clinique de la maladie et corrélant avec la CRP, il constitue un marqueur de l'activité inflammatoire synoviale.

L'étude de sa source cellulaire a longtemps été négligée. Il semble toutefois que le PNN soit un bon candidat, comme en témoignent sa corrélation avec l'ADN mt articulaire ou encore les variations de son contenu mitochondrial intracellulaire. Ainsi, la présence d'ADN mt pourrait être la conséquence d'un phénomène de libération intra-articulaire par le PNN dont les mécanismes intrinsèques (mort cellulaire ou expulsion par des cellules viables) restent à préciser par des investigations complémentaires.

La fonction de cet ADN mt demeure également à explorer. Des études antérieures ont souligné son rôle pro-inflammatoire par ses interactions avec la voie des TLRs ou de l'inflammasome. Il reste donc à démontrer qu'il n'est pas qu'un simple marqueur de l'inflammation mais un authentique acteur dans l'immunopathologie de la PR, en déterminant sa ou ses cible(s) cellulaire(s) et son implication dans la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires par des études fonctionnelles.

BIBLIOGRAPHIE

1. Guillemin F, Saraux A, Guggenbuhl P, Roux CH, Fardellone P, Le Bihan E, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in France: 2001. Ann Rheum Dis. oct 2005;64(10):1427‑30.

2. Sany J, La polyarthrite rhumatoïde de l'adulte, John Libbey Eurotext Ed., 2003,pp 298

3. Campion G, Maddison PJ, Goulding N, James I, Ahern MJ, Watt I, et al. The Felty syndrome: a case-matched study of clinical manifestations and outcome, serologic features, and immunogenetic associations. Medicine (Baltimore). mars 1990;69(2):69‑80.

4. Morel J, Combe B. How to predict prognosis in early rheumatoid arthritis. Best Pract Res Clin Rheumatol. févr 2005;19(1):137‑46.

5. Aho K, Palusuo T, Kurki P. Marker antibodies of rheumatoid arthritis: diagnostic and pathogenetic implications. Semin Arthritis Rheum. juin 1994;23(6):379‑87.

6. Klareskog L, Rönnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. Annu Rev Immunol. 2008;26:651‑75.

7. Foulquier C, Sebbag M, Clavel C, Chapuy-Regaud S, Al Badine R, Méchin M-C, et al. Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. Arthritis Rheum. nov 2007;56(11):3541‑53.

8. Meyer O, Labarre C, Dougados M, Goupille P, Cantagrel A, Dubois A, et al. Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. Ann Rheum Dis. févr 2003;62(2):120‑6.

9. Kastbom A, Strandberg G, Lindroos A, Skogh T. Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). Ann Rheum Dis. sept 2004;63(9):1085‑9.

10. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis Rheum. sept 2010;62(9):2569‑81.

11. Morel J, Miossec P, Combe B. Immunopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. EMC - Rhumatol-Orthopédie. mai 2004;1(3):218‑30.

12. Schaeverbeke T, Truchetet M-É, Richez C. When and where does rheumatoid arthritis begin? Jt Bone Spine Rev Rhum. déc 2012;79(6):550‑4.

13. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. Arthritis Rheum. janv 2000;43(1):30‑7.

14. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. nov 1987;30(11):1205‑13.

15. Hill JA, Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E. Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. J Immunol Baltim Md 1950. 15 juill 2003;171(2):538‑41.

16. Gough A, Faint J, Salmon M, Hassell A, Wordsworth P, Pilling D, et al. Genetic typing of patients with inflammatory arthritis at presentation can be used to predict outcome. Arthritis Rheum. août 1994;37(8):1166‑70.

17. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Källberg H, Bengtsson C, Grunewald J, et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. Arthritis Rheum. janv 2006;54(1):38‑46.

18. Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen K-A, Lundberg K, et al. Peptidylarginine deiminase from Porphyromonas gingivalis citrullinates human fibrinogen and α-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. sept 2010;62(9):2662‑72.

19. Aarvak T, Natvig JB. Cell-cell interactions in synovitis: antigen presenting cells and T cell interaction in rheumatoid arthritis. Arthritis Res. 2001;3(1):13‑7.

20. Panayi GS, Corrigall VM, Pitzalis C. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. The role of T cells and other beasts. Rheum Dis Clin North Am. mai 2001;27(2):317‑34.

21. De Vita S, Zaja F, Sacco S, De Candia A, Fanin R, Ferraccioli G. Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis: evidence for a pathogenetic role of B cells. Arthritis Rheum. août 2002;46(8):2029‑33.

22. Kim HJ, Berek C. B cells in rheumatoid arthritis. Arthritis Res. 2000;2(2):126‑31.

23. Jiang Y, Genant HK, Watt I, Cobby M, Bresnihan B, Aitchison R, et al. A multicenter, double-blind, dose-ranging, randomized, placebo-controlled study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis: radiologic progression and correlation of Genant and Larsen scores. Arthritis Rheum. mai 2000;43(5):1001‑9.

24. Genovese MC, Bathon JM, Martin RW, Fleischmann RM, Tesser JR, Schiff MH, et al. Etanercept versus methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis: two-year radiographic and clinical outcomes. Arthritis Rheum. juin 2002;46(6):1443‑50.

25. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. J Mol Med Berl Ger. juin 2001;79(5-6):243‑53.

26. Gierut A, Perlman H, Pope RM. Innate immunity and rheumatoid arthritis. Rheum Dis Clin North Am. mai 2010;36(2):271‑96.

27. Tak PP, Bresnihan B. The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis: advances from synovial biopsy and tissue analysis. Arthritis Rheum. déc 2000;43(12):2619‑33.

28. Thomas R, Davis LS, Lipsky PE. Rheumatoid synovium is enriched in mature antigen-presenting dendritic cells. J Immunol Baltim Md 1950. 1 mars 1994;152(5):2613‑23.

29. Page G, Lebecque S, Miossec P. Anatomic localization of immature and mature dendritic cells in an ectopic lymphoid organ: correlation with selective chemokine expression in rheumatoid synovium. J Immunol Baltim Md 1950. 15 mai 2002;168(10):5333‑41.

30. Lebre MC, Jongbloed SL, Tas SW, Smeets TJM, McInnes IB, Tak PP. Rheumatoid arthritis synovium contains two subsets of CD83-DC-LAMP- dendritic cells with distinct cytokine profiles. Am J Pathol. avr 2008;172(4):940‑50.

31. Ju X-S, Zenke M. Differentiation of human antigen-presenting dendritic cells from CD34+ hematopoietic stem cells in vitro. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2003;215:399‑407.

32. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2000;18:767‑811.

33. Wipke BT, Allen PM. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. J Immunol Baltim Md 1950. 1 août 2001;167(3):1601‑8.

34. Raza K, Scheel-Toellner D, Lee C-Y, Pilling D, Curnow SJ, Falciani F, et al. Synovial fluid leukocyte apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther. 2006;8(4):R120.

35. Wright HL, Moots RJ, Edwards SW. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. Nat Rev Rheumatol. 10 juin 2014;

36. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. Rheumatol Oxf Engl. sept 2010;49(9):1618‑31.

37. Kumar V, Sharma A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. Int Immunopharmacol. nov 2010;10(11):1325‑34.

38. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. Nat Rev Immunol. août 2011;11(8):519‑31.

39. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C, et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. Blood. 14 janv 2010;115(2):335‑43.

40. Rasheed Z. Hydroxyl radical damaged immunoglobulin G in patients with rheumatoid arthritis: biochemical and immunological studies. Clin Biochem. juin 2008;41(9):663‑9.

41. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 5 mars 2004;303(5663):1532‑5.

42. Leshner M, Wang S, Lewis C, Zheng H, Chen XA, Santy L, et al. PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. Front Immunol. 2012;3:307.

43. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. Sci Transl Med. 27 mars 2013;5(178):178ra40.

44. Firestein GS, Alvaro-Gracia JM, Maki R, Alvaro-Garcia JM. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. J Immunol Baltim Md 1950. 1 mai 1990;144(9):3347‑53.

45. Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. J Clin Invest. nov 2008;118(11):3537‑45.

46. Dayer JM. The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. Rheumatol Oxf Engl. mai 2003;42 Suppl 2:ii3‑10.

47. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. Annu Rev Immunol. 2005;23:1‑21.

48. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. Annu Rev Immunol. 1994;12:991‑1045.

49. Oppenheim JJ, Tewary P, de la Rosa G, Yang D. Alarmins initiate host defense. Adv Exp Med Biol. 2007;601:185‑94.

50. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. J Leukoc Biol. janv 2007;81(1):1‑5.

51. Medzhitov R, Janeway C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. Immunol Rev. févr 2000;173:89‑97.

52. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature. 24 juill 1997;388(6640):394‑7.

53. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat Immunol. mai 2010;11(5):373‑84.

54. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. Nat Rev Immunol. déc 2010;10(12):826‑37.

55. Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. Nat Rev Cancer. janv 2009;9(1):57‑63.

56. Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. Immunity. 26 mars 2010;32(3):305‑15.

57. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol. juill 2004;4(7):499‑511.

58. Kenny EF, O'Neill LAJ. Signalling adaptors used by Toll-like receptors: an update. Cytokine. sept 2008;43(3):342‑9.

59. Kawai T, Akira S. TLR signaling. Semin Immunol. févr 2007;19(1):24‑32.

60. Kersse K, Bertrand MJM, Lamkanfi M, Vandenabeele P. NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death. Cytokine Growth Factor Rev. déc 2011;22(5-6):257‑76.

61. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. Mol Cell. août 2002;10(2):417‑26.

62. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. Nature. 9 mars 2006;440(7081):237‑41.

63. Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? Nat Rev Immunol. mars 2010;10(3):210‑5.

64. Deng GM, Nilsson IM, Verdrengh M, Collins LV, Tarkowski A. Intra-articularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis. Nat Med. juin 1999;5(6):702‑5.

65. Cromartie WJ, Craddock JG, Schwab JH, Anderle SK, Yang CH. Arthritis in rats after systemic injection of streptococcal cells or cell walls. J Exp Med. 1 déc 1977;146(6):1585‑602.

66. Kannan K, Ortmann RA, Kimpel D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. Pathophysiol Off J Int Soc Pathophysiol ISP. oct 2005;12(3):167‑81.

67. Miles K, Heaney J, Sibinska Z, Salter D, Savill J, Gray D, et al. A tolerogenic role for Toll-like receptor 9 is revealed by B-cell interaction with DNA complexes expressed on apoptotic cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 17 janv 2012;109(3):887‑92.

68. Thwaites R, Chamberlain G, Sacre S. Emerging role of endosomal toll-like receptors in rheumatoid arthritis. Front Immunol. 2014;5:1.

69. Ospelt C, Brentano F, Rengel Y, Stanczyk J, Kolling C, Tak PP, et al. Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis. Arthritis Rheum. déc 2008;58(12):3684‑92.

70. Seibl R, Birchler T, Loeliger S, Hossle JP, Gay RE, Saurenmann T, et al. Expression and regulation of Toll-like receptor 2 in rheumatoid arthritis synovium. Am J Pathol. avr 2003;162(4):1221‑7.

71. Piccinini AM, Midwood KS. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. Mediators Inflamm. 2010;2010.

72. Aviña-Zubieta JA, Galindo-Rodriguez G, Newman S, Suarez-Almazor ME, Russell AS. Long-term effectiveness of antimalarial drugs in rheumatic diseases. Ann Rheum Dis. oct 1998;57(10):582‑7.

73. Kuznik A, Bencina M, Svajger U, Jeras M, Rozman B, Jerala R. Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. J Immunol Baltim Md 1950. 15 avr 2011;186(8):4794‑804.

74. Joosten LAB, Heinhuis B, Abdollahi-Roodsaz S, Ferwerda G, Lebourhis L, Philpott DJ, et al. Differential function of the NACHT-LRR (NLR) members Nod1 and Nod2 in arthritis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1 juill 2008;105(26):9017‑22.

75. Ospelt C, Brentano F, Jüngel A, Rengel Y, Kolling C, Michel BA, et al. Expression, regulation, and signaling of the pattern-recognition receptor nucleotide-binding oligomerization domain 2 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Arthritis Rheum. févr 2009;60(2):355‑63.

76. Kolly L, Busso N, Palmer G, Talabot-Ayer D, Chobaz V, So A. Expression and function of the NALP3 inflammasome in rheumatoid synovium. Immunology. févr 2010;129(2):178‑85.

77. Chinnery PF, Hudson G. Mitochondrial genetics. Br Med Bull. 2013;106:135‑59.

78. Wallace DC, Chalkia D. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. Cold Spring Harb Perspect Med. oct 2013;3(10):a021220.

79. Escames G, López LC, García JA, García-Corzo L, Ortiz F, Acuña-Castroviejo D. Mitochondrial DNA and inflammatory diseases. Hum Genet. févr 2012;131(2):161‑73.

80. Arnoult D, Soares F, Tattoli I, Girardin SE. Mitochondria in innate immunity. EMBO Rep. sept 2011;12(9):901‑10.

81. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. Nature. 4 mars 2010;464(7285):104‑7.

82. Nakahira K, Kyung S-Y, Rogers AJ, Gazourian L, Youn S, Massaro AF, et al. Circulating mitochondrial DNA in patients in the ICU as a marker of mortality: derivation and validation. PLoS Med. déc 2013;10(12):e1001577; discussion e1001577.

83. Simmons JD, Lee Y-L, Mulekar S, Kuck JL, Brevard SB, Gonzalez RP, et al. Elevated levels of plasma mitochondrial DNA DAMPs are linked to clinical outcome in severely injured human subjects. Ann Surg. oct 2013;258(4):591‑6; discussion 596‑8.

84. Yamanouchi S, Kudo D, Yamada M, Miyagawa N, Furukawa H, Kushimoto S. Plasma mitochondrial DNA levels in patients with trauma and severe sepsis: time course and the association with clinical status. J Crit Care. déc 2013;28(6):1027‑31.

85. Zhang Q, Itagaki K, Hauser CJ. Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase. Shock Augusta Ga. juill 2010;34(1):55‑9.

86. Marques PE, Amaral SS, Pires DA, Nogueira LL, Soriani FM, Lima BHF, et al. Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. Hepatol Baltim Md. nov 2012;56(5):1971‑82.

87. Lee Y-L, King MB, Gonzalez RP, Brevard SB, Frotan MA, Gillespie MN, et al. Blood transfusion products contain mitochondrial DNA damage-associated molecular patterns: a potential effector of transfusion-related acute lung injury. J Surg Res. 19 juin 2014;

88. Shen J, Platek M, Mahasneh A, Ambrosone CB, Zhao H. Mitochondrial copy number and risk of breast cancer: a pilot study. Mitochondrion. janv 2010;10(1):62‑8.

89. Ellinger J, Albers P, Müller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. Circulating mitochondrial DNA in the serum of patients with testicular germ cell cancer as a novel noninvasive diagnostic biomarker. BJU Int. juill 2009;104(1):48‑52.

90. Jiang W-W, Masayesva B, Zahurak M, Carvalho AL, Rosenbaum E, Mambo E, et al. Increased mitochondrial DNA content in saliva associated with head and neck cancer. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 1 avr 2005;11(7):2486‑91.

91. Mizumachi T, Muskhelishvili L, Naito A, Furusawa J, Fan C-Y, Siegel ER, et al. Increased distributional variance of mitochondrial DNA content associated with prostate cancer cells as compared with normal prostate cells. The Prostate. 1 mars 2008;68(4):408‑17.

92. Lan Q, Lim U, Liu C-S, Weinstein SJ, Chanock S, Bonner MR, et al. A prospective study of mitochondrial DNA copy number and risk of non-Hodgkin lymphoma. Blood. 15 nov 2008;112(10):4247‑9.

93. Mehra N, Penning M, Maas J, van Daal N, Giles RH, Voest EE. Circulating mitochondrial nucleic acids have prognostic value for survival in patients with advanced prostate cancer. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 15 janv 2007;13(2 Pt 1):421‑6.

94. Cossarizza A, Pinti M, Nasi M, Gibellini L, Manzini S, Roat E, et al. Increased plasma levels of extracellular mitochondrial DNA during HIV infection: a new role for mitochondrial damage-associated molecular patterns during inflammation. Mitochondrion. sept 2011;11(5):750‑5.

95. Pinti M, Mussini C, Cossarizza A. Mitochondrial DNA: a proinflammatory « enemy from within » during HIV infection? Cell Death Dis. 2012;3:307.

96. De Haan JJ, Smeets MB, Pasterkamp G, Arslan F. Danger signals in the initiation of the inflammatory response after myocardial infarction. Mediators Inflamm. 2013;2013:206039.

97. Ding Z, Liu S, Wang X, Khaidakov M, Dai Y, Mehta JL. Oxidant stress in mitochondrial DNA damage, autophagy and inflammation in atherosclerosis. Sci Rep. 2013;3:1077.

98. Oka T, Hikoso S, Yamaguchi O, Taneike M, Takeda T, Tamai T, et al. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. Nature. 10 mai 2012;485(7397):251‑5.

99. Hajizadeh S, DeGroot J, TeKoppele JM, Tarkowski A, Collins LV. Extracellular mitochondrial DNA and oxidatively damaged DNA in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther. 2003;5(5):R234‑40.

100. Jylhävä J, Nevalainen T, Marttila S, Jylhä M, Hervonen A, Hurme M. Characterization of the role of distinct plasma cell-free DNA species in age-associated inflammation and frailty. Aging Cell. juin 2013;12(3):388‑97.

101. Salminen A, Ojala J, Kaarniranta K, Kauppinen A. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress activate inflammasomes: impact on the aging process and age-related diseases. Cell Mol Life Sci CMLS. sept 2012;69(18):2999‑3013.

102. Pittman K, Kubes P. Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment. J Innate Immun. 2013;5(4):315‑23.

103. Ries M, Schuster P, Thomann S, Donhauser N, Vollmer J, Schmidt B. Identification of novel oligonucleotides from mitochondrial DNA that spontaneously induce plasmacytoid dendritic cell activation. J Leukoc Biol. juill 2013;94(1):123‑35.

104. Campbell CT, Kolesar JE, Kaufman BA. Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number. Biochim Biophys Acta. oct 2012;1819(9-10):921‑9.

105. Julian MW, Shao G, Bao S, Knoell DL, Papenfuss TL, VanGundy ZC, et al. Mitochondrial transcription factor A serves as a danger signal by augmenting plasmacytoid dendritic cell responses to DNA. J Immunol Baltim Md 1950. 1 juill 2012;189(1):433‑43.

106. Julian MW, Shao G, Vangundy ZC, Papenfuss TL, Crouser ED. Mitochondrial transcription factor A, an endogenous danger signal, promotes TNFα release via RAGE- and TLR9-responsive plasmacytoid dendritic cells. PloS One. 2013;8(8):e72354.

107. Martinon F. Dangerous liaisons: mitochondrial DNA meets the NLRP3 inflammasome. Immunity. 23 mars 2012;36(3):313‑5.

108. Zhang J-Z, Liu Z, Liu J, Ren J-X, Sun T-S. Mitochondrial DNA induces inflammation and increases TLR9/NF-κB expression in lung tissue. Int J Mol Med. avr 2014;33(4):817‑24.

109. Collins LV, Hajizadeh S, Holme E, Jonsson I-M, Tarkowski A. Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. J Leukoc Biol. juin 2004;75(6):995‑1000.

110. Chiu RWK, Chan LYS, Lam NYL, Tsui NBY, Ng EKO, Rainer TH, et al. Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma. Clin Chem. mai 2003;49(5):719‑26.

111. Van der Heijde DM, van ’t Hof M, van Riel PL, van de Putte LB. Validity of single variables and indices to measure disease activity in rheumatoid arthritis. J Rheumatol. mars 1993;20(3):538‑41.

112. Balogh ZJ, McIlroy DJ, Smith DW, Hansbro PM. The origin and the role of mitochondrial DNA in postinjury inflammation. J Crit Care. déc 2013;28(6):1099‑100.

113. Cooper PR, Palmer LJ, Chapple ILC. Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity: friend or foe? Periodontol 2000. oct 2013;63(1):165‑97.

114. Keshari RS, Jyoti A, Kumar S, Dubey M, Verma A, Srinag BS, et al. Neutrophil extracellular traps contain mitochondrial as well as nuclear DNA and exhibit inflammatory potential. Cytom Part J Int Soc Anal Cytol. mars 2012;81(3):238‑47.

115. Yousefi S, Simon D, Simon H-U. Eosinophil extracellular DNA traps: molecular mechanisms and potential roles in disease. Curr Opin Immunol. déc 2012;24(6):736‑9.

116. Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. Nat Med. sept 2008;14(9):949‑53.

117. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. Cell Death Differ. nov 2009;16(11):1438‑44.

ANNEXES

Annexe 1 :

Critères ACR/EULAR de la PR d'après (10)

Atteinte articulaire (0-5)	
1 grosse articulation	0
2-10 grosses articulations	1
1-3 petites articulations (grosses articulations non comptées)	2
4-10 petites articulations (grosses articulations non comptées)	3
> 10 articulations (au moins 1 petite articulation)	5
Sérologie (0-3)	
FR négatif et ACPA négatif	0
FR faiblement positif (1 à 3 × normale) ou ACPA faiblement positif (1 à 3 × normale)	2
FR fortement positif (> 3 × normale) ou ACPA fortement positif (> 3 × normale)	3
Durée des symptômes (0-1)	
< 6 semaines	0
≥ 6 semaines	1
Biologie inflammatoire (0-1)	
CRP normale et VS normale	0
CRP anormale ou VS anormale	1

En présence d'une ou plusieurs articulation(s) gonflée(s) et en l'absence d'autres explications et de lésions érosives typiques de PR, le diagnostic de PR est retenu lorsque les critères sont remplis avec un score ≥ 6.

Annexe 2 :

Protocole de purification des LS et plasmas kit NucleoSpin® Tissue de Macherey Nagel :

Pour les LS, 400µl sont d'abord soumis à une étape de pré-lyse nécessitant 25µl de protéinase K et 180µl de tampon T1 ainsi qu'une incubation d'une heure à 56°C ; puis à une étape de lyse par 200µl de tampon B3 avec incubation à 70°C pendant 15 minutes. L'ADN contenu dans l'échantillon est ensuite précipité par l'ajout de 210µl d'éthanol absolu. L'échantillon est transféré dans la colonne NucleoSpin® Tissue puis centrifugé à 11000g pendant 1 minute afin de permettre à l'ADN de se fixer sur la membrane de silice de la colonne. Un premier lavage de la membrane de silice est réalisé par l'ajout de 500µl de tampon BW, afin d'éliminer toute contamination de l'ADN, suivi d'une centrifugation de 11000g pendant 1 minute. Puis vient un 2ème lavage par 600µl de tampon B5, suivi d'une centrifugation de 11000g pendant 1 minute. La membrane de silice est ensuite séchée par une nouvelle centrifugation de 11000g pendant 1 minute afin d'enlever les traces résiduelles d'éthanol. La colonne est alors placée dans un eppendorf et l'ADN élué par l'ajout de 50µl d'eau préchauffée, suivi d'une centrifugation de 11000g pendant 1 minute. Le résultat de cette purification est évalué par la quantification d'ADN par spectrophotométrie (Nanodrop®).

Pour les plasmas, en raison de l'absence d'un contenu élevé en fibrine, l'étape de pré-lyse n'est pas nécessaire. Les 25 µl de protéinase K sont ajoutés au tampon de lyse B3 et aux 400µl de plasma, puis incubés 15 minutes à 70°C. La suite du protocole est identique à celui du LS.

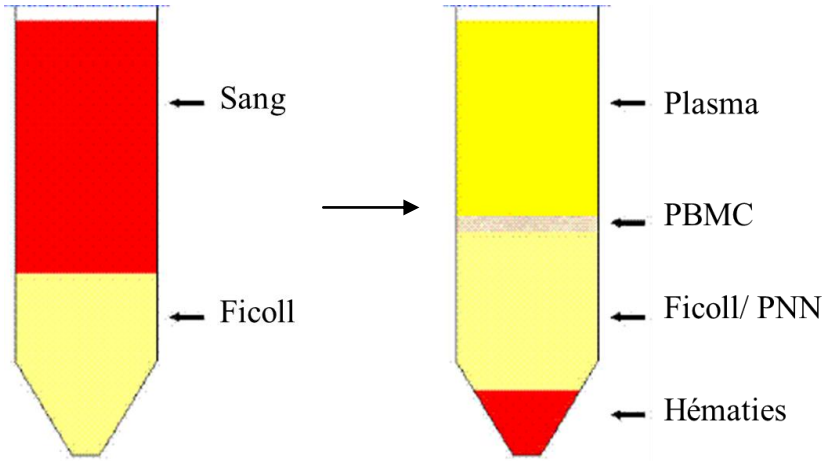
Récapitulatif des étapes de purification (extrait du manuel d'utilisateur du kit NucleoSpin® Tissue de Macherey Nagel)

1	Prepare sample		Cut 25 mg into small pieces
2	Pre-lyse sample		180 µL T1 25 µL Proteinase K 56 °C, 1–3 h
3	Lyse sample		200 µL B3 70 °C, 10 min
4	Adjust DNA binding conditions		210 µL 96–100 % ethanol
5	Bind DNA		Load all 11,000 x *g*, 1 min
6	Wash silica membrane	1st and 2nd	1st wash 500 µL BW 2nd wash 600 µL B5 11,000 x *g*, 1 min
7	Dry silica membrane		11,000 x *g*, 1 min
8	Elute highly pure DNA		100 µL BE (70 °C) RT, 1 min 11,000 x *g*, 1 min

Annexe 3 :

Protocole d'isolement des PNN articulaires et sanguins :

Après transfert de l'échantillon sanguin dans un tube de 50 ml, une solution de Dextran 3%, de volume identique au sang, est ajoutée, afin d'obtenir une sédimentation des globules rouges. Au terme de 30 minutes d'incubation à température ambiante, le surnageant (plasma riche en leucocytes) est récupéré et centrifugé (10 minutes, 250g, 5°C). Le culot cellulaire obtenu est resuspendu dans un volume de NaCl 0,9% identique au volume de sang initial, puis déposé dans un tube de 50 ml, au-dessus d'une couche de 10 ml de Ficoll. Une centrifugation de 400g pendant 40 minutes à température ambiante, sans frein, permet au Ficoll de séparer les éléments figurés du sang en fonction de leur densité. Ainsi les globules rouges et PNN sédimentent au fond du tube, surmontés par le Ficoll puis par les PBMC (peripheral blood mononuclear cells) qui sont à l'interface Ficoll/plasma.



Principe de séparation des éléments figurés du sang par Ficoll

Après avoir éliminé le plasma, les PBMC et la moitié du Ficoll, les PNN et hématies restantes sous soumis à une lyse hypotonique par l'ajout de 20 ml de NaCl 0,2% incubés dans la glace. Au terme de 30 secondes de lyse, l'isotonicité est restaurée par l'ajout de 20 ml de NaCl 1,6% incubés dans la glace. Les cellules sont culottées par centrifugation (250g, 5°C, 6 minutes) puis lyse et centrifugation sont répétées pour éliminer les hématies résiduelles. Les PNN obtenus sont resuspendus dans 5 ml de NaCl 0,9% et comptés en cellule de Malassez

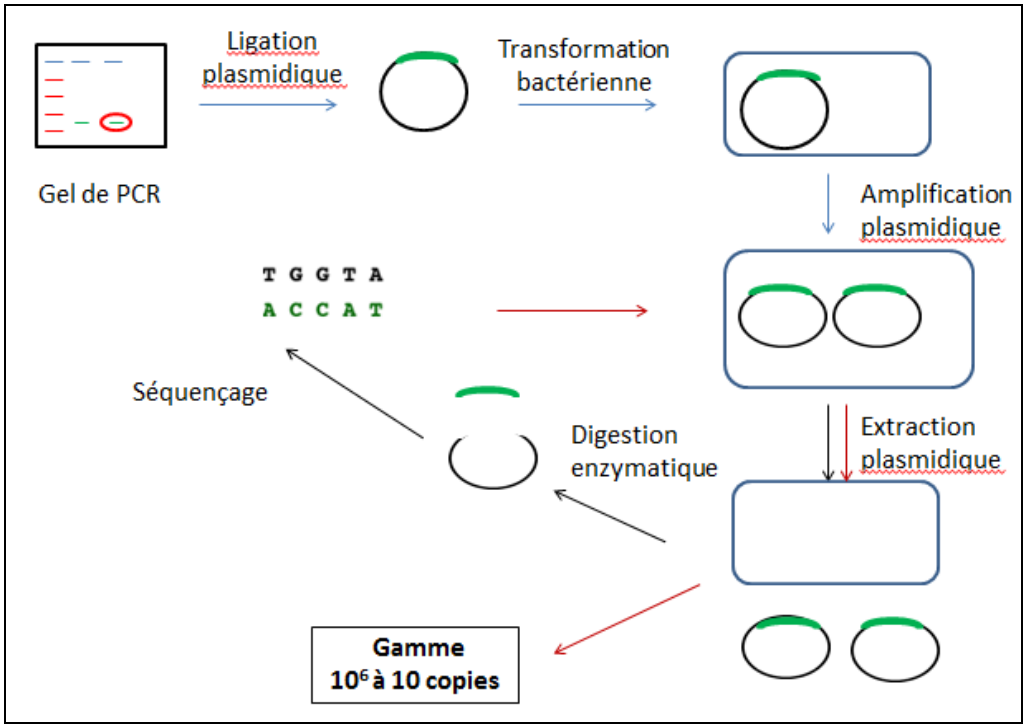
sous microscopie optique. A l'issue d'une nouvelle centrifugation identique à la précédente, ils sont dilués dans du milieu RPMI 1640 pour obtenir une concentration à $1x10^6$ PNN/ml et aliquotés dans des eppendorfs de 1 ml. Les PNN sont culottés par centrifugation (5000 rpm, 5 minutes) et congelés à sec à -80°C jusqu'à utilisation.

La pureté des PNN isolés est analysée en microscopie optique par coloration Giemsa, en déposant 100µl de cellules par cytospin sur une lame. Tous nos échantillons de PNN ont une pureté supérieure à 95%.

Le protocole appliqué aux PNN du LS est similaire à l'exception de l'étape de sédimentation des globules rouges par Dextran qui est inutile compte tenu de la faible teneur en hématies.

Annexe 4 :

Etapes de la réalisation de la gamme d'ADN mt :



LISTE DES ABREVIATIONS

ACPA: Anticorps anti-peptides citrullinés

ADN mt: ADN mitochondrial

AM: Arthrite microcristalline

CCA: Chondrocalcinose articulaire

CpG: Cytosine phosphodiester bond Guanine

CRP: C reactive protein

DAMPs: Damaged associated molecular patterns

DAS 28: Disease activity score sur 28 articulations

FR: Facteur rhumatoïde

HLA: Human leukocyte antigen

HMGB1: High mobility group box protein 1

IL: Interleukine

LS: Liquide synovial

MyD88: Myeloid differentiation factor 88

NALP: Nucleotid binding domain and leucin-rich repeat pyrin domain

NETs: Neutrophil extracellular traps

NFκB: Nuclear factor κB

NLRs: Nucleotide oligomerization domain like receptors

NOD: Nucleotide oligomerization domain

OA: Arthrose

PAD: Peptidyl arginine deiminase

PAMPs: Pathogen associated molecular patterns

PCR: Polymerase chain reaction

pDC: Cellule dendritique plasmacytoide

PNE: Polynucléaire éosinophile

PNN: Polynucléaire neutrophile

PR: Polyarthrite rhumatoïde

PRR: Pattern recognition receptor

qPCR: Quantitative polymerase chain reaction

RAGE: Receptor for advanced glycation end products

RANKL: Receptor activator of NFκB ligand

ROS: Reactive oxygen species

TFAM: Mitochondrial transcription factor A

TIR: Toll IL1 receptor

TLR: Toll like receptor

TNFα: Tumor necrosis factor α

VS: Vitesse de sédimentation

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque.

RESUME EN ANGLAIS

Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory and an auto-immune rheumatism, involving both innate and adaptive immunity. Recently, several studies underlined that mitochondrial DNA (mt DNA) was an activator of innate immunity and a local or systemic pro-inflammatory molecule. Indeed, in a mouse model, it was arthritogenic. Few studies focused on its involvement in RA.

We analyzed plasmas and synovial fluids (SF) from 57 RA, by comparison with 11 crystal-induced arthritis (CA), 12 osteoarthritis (OA) and 15 healthy volunteers. SF from RA and CA contain significantly more mt DNA than OA SF (p= 0,0007 et p<0,0001), as for plasmas from RA and CA in comparison with healthy plasmas (p= 0,0237 et p= 0,0302). In RA, synovial mt DNA rates increase with the disease clinical activity as measured by DAS 28-CRP, and correlate with CRP (r= 0,82, p<0 ,0001), that has not been found for plasmatic rates.

The number of polymorphonuclear neutrophils (PNN), main cell type of SF, correlates with the rate of SF mt DNA (r=0,75, p=0,0017). Moreover, intracellular mt DNA content in synovial PNN from RA is 4,59 lesser than the content from blood PNN, suggesting a local release of mt DNA from PNN.

Mitochondrial DNA is then involved in inflammatory rheumatisms (RA and CA). It is a marker of inflammatory activity in joint, as for PNN, which likely represents the mt DNA cell source.