HAL
open science

Les anticorps anti-protéines carbamylées sont présents chez les patients de la cohorte ESPOIR et sont associés à l'activité clinique et aux lésions radiographiques

Stéphanie Dublanc

To cite this version:

Stéphanie Dublanc. Les anticorps anti-protéines carbamylées sont présents chez les patients de la cohorte ESPOIR et sont associés à l'activité clinique et aux lésions radiographiques. Médecine humaine et pathologie. 2015. dumas-01206439

HAL Id: dumas-01206439

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01206439v1

Submitted on 29 Sep 2015

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 Bordeaux 2

U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES

Année 2015 N°3055

Thèse pour l'obtention du

DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Par Stéphanie DUBLANC

Née le 2 décembre 1987 à Bayonne

Le 28 août 2015

Anti-carbamylated protein antibodies are present in patients with early arthritis and are associated with disease activity and radiological damages

Directeur de thèse

Madame le Docteur Marie-Élise TRUCHETET

Rapporteur de thèse

Monsieur le Docteur Pierre DUFFAU

Membres du jury

Monsieur le Professeur Thierry SCHAEVERBEKE	Président du jury
Monsieur le Professeur Christophe RICHEZ	Juge
Monsieur le Professeur Bernard BANNWARTH	Juge
Monsieur le Docteur Emmanuel RIBEIRO	Juge
Madame le Docteur Cécile CONTIN-BORDES	Juge

Université Bordeaux 2

U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES

Année 2015 N°3055

Thèse pour l'obtention du

DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Par Stéphanie DUBLANC

Née le 2 décembre 1987 à Bayonne

Le 28 août 2015

Anti-carbamylated protein antibodies are present in patients with early arthritis and are associated with disease activity and radiological damages

Directeur de thèse

Madame le Docteur Marie-Élise TRUCHETET

Rapporteur de thèse

Monsieur le Docteur Pierre DUFFAU

Membres du jury

Monsieur le Professeur Thierry SCHAEVERBEKE	Président du jury
Monsieur le Professeur Christophe RICHEZ	Juge
Monsieur le Professeur Bernard BANNWARTH	Juge
Monsieur le Docteur Emmanuel RIBEIRO	Juge
Madame le Docteur Cécile CONTIN-BORDES	Juge

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Thierry Schaeverbeke,
Vous nous aviez prévenu, un jour de 2011 dans cet amphithéâtre bordelais : “Les prochains internes en rhumatologie sont peut-être ici”. Et en effet nous étions toutes les quatres présentes. Vous m’avez donné envie, en tant qu’externe, de devenir rhumatologue grâce à votre pédagogie, vos visites enrichissantes et votre humanité. Vos qualités sont un exemple pour moi. Merci d’avoir accepté la présidence de mon jury. Veuillez recevoir ici la marque de ma gratitude et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Bernard Bannwarth,
Merci pour votre sympathie, votre bonne humeur, votre partage des connaissances et pour vos anecdotes. Ce fut un plaisir de travailler et d’apprendre à vos côtés.

A Monsieur le Professeur Christophe Richez,
Je t’ai connu chef de clinique, MCU-PH puis tu es devenu professeur et tu le mérites. Et surtout tu n’as pas changé, toujours aussi sympathique, drôle, compréhensif et pédagogue.

A Monsieur le Docteur Emmanuel Ribeiro,
J’ai énormément apprécié travailler à tes côtés, et je suis ravie que tu aies accepté de faire partie de ce jury. Merci pour ta gentillesse et la culture médicale que tu m’as transmise.

A Madame le Docteur Cécile Contin-Bordes,
Merci d’avoir accepté de faire partie de mon jury et d’avoir contribué à ce travail. J’en profite d’ailleurs pour remercier toutes ces personnes que j’ai croisé au laboratoire et qui ont répondu à toutes mes questions de novice.

A Madame le Docteur Marie-Elise Truchetet, ma directrice de thèse,
Merci de m’avoir proposé ce travail et de m’avoir conseillée, encadrée et épaulée tout au long du projet. Grâce à toi, j’ai découvert les joies du travail au laboratoire. J’espère avoir été à la hauteur de tes espérances. Merci aussi pour ta pédagogie, ta gentillesse, ta bonne humeur au travail et aussi pour tous les surnoms que tu as su me trouver!

A Monsieur le Docteur Pierre Duffau, mon rapporteur,
Merci d’avoir accepté d’être le rapporteur de cette thèse. Tes connaissances, ta pédagogie, ta disponibilité, ta bonne humeur et ton implication au travail me laissent admirative. Tu dis toujours que “personne ne t’écoute et que personne ne te croit jamais” mais je t’assure du contraire.

A Madame le Docteur Nadia Mehsen,
Merci pour ta disponibilité, ta gentillesse. Ce fut un plaisir d’apprendre et de travailler à tes côtés.

A Monsieur le Docteur Nicolas Poursac,
Plus connu sous le nom de Dr Prozac. Ce fut un réel plaisir de t’avoir comme chef de clinique mais surtout comme coéquipier de choc au baby-foot pendant toutes ces pauses déjeuner! Merci pour tout : ta disponibilité, ton écoute, ton calme à toute épreuve, ta pédagogie et tes cours d’échographie.

A Madame le Docteur Claire Barthe,
Merci pour ta compréhension et ta disponibilité suite à mon harcèlement téléphonique quotidien cet hiver.

A Patricia, notre maman de la rhumatologie,
Tu étais toujours là pour nous épauler pendant ces 4 ans, que ce soit sur le plan professionnel ou personnel, voire même sur le plan culinaire (comment aurais-je pu tenir sans tes friandises). Ne changes rien, tu es une cadre unique!

A Thomas Barnetche,
Merci pour ton travail et ton aide sur cette thèse, merci pour tes fous rires communicatifs. Saint Bernard power!

A toute l'équipe du service de rhumatologie de Pellegrin,
A Mathilde et Laurence pour leur soutien au quotidien, à toutes les secrétaires pour leur gentillesse, à Annick et Françoise pour leur soutien des fins de journée (moral et alimentaire), à toutes les infirmières et aide-soignantes pour leur travail et leur sympathie et merci particulièrement à toi Edith, pour ton humour et ta capacité à nous réconforter grâce à tes réserves de chocolat . Merci à vous toutes.

Au service de Rééducation fonctionnelle de Tastet Girard,
Merci de m'avoir soutenu lors de mes débuts en tant qu'interne.

Au service de maladies infectieuses,
Merci au Professeur Dupon pour son apprentissage de la rigueur, au Docteur Dutronc pour sa gentillesse et son dévouement, à Audrey pour son énergie.

Au service de rhumatologie de Libourne,
A Jean-Philippe, V, merci d'avoir été mon chef, puis mon maître en humour, puis mon ami puis bientôt mon collègue puisque tu l'as accepté, et maintenant tu ne peux plus reculer. Travailler à tes côtés a été un plaisir, tu prenais du temps pour m'enseigner la rhumatologie, tu me faisais partager toutes tes connaissances et tout ça dans la bonne humeur.

Au service de médecine interne à Saint André,
Merci au Pr Mercié, à Emmanuel, Pierre, Florian et Charlie. Travailler à vos côtés était d'une part très enrichissant mais aussi un plaisir.

Au service de rhumatologie de Bayonne,
Merci au Docteur Stéphane Marcé et au Dr Agnès Monnier pour avoir rendu ce dernier semestre si agréable. Dr Marcé je n'oublierais pas vos anecdotes et Agnès, j'espère retrouver un jour au travail quelqu'un qui a ce même point commun avec nous : l'amour pour les chaussures.

A toutes les équipes paramédicales,
Merci de m'avoir écoutée, conseillée, supportée. Ce fut un plaisir de travailler avec vous tous.

A tous mes cointernes, devenus des amis,
A Julie, Princesse, Paul et ses stylos d'attaque, Chouchou et ses tic-tac.
A Antoine, Kokotulipe, Jennifer, Marion, Amandine, Margaux, Fanny, Alice et tous les autres.
A Hourdille, Annette et La Pich, mes coupines de promotion, ça y'est on arrive au bout. On a ri, on a pleuré, on a travaillé, on a profité. Vous allez toutes beaucoup me manquer. Je n'aurais pas pu rêver mieux comme quatuor de choc!
A vous, Chang, Grayon, Tafrouk, Biquet, Bricounet, Pittbull et Pioupioute, ce semestre restera inoubliable : sorties hebdomadaires, fous rires quotidiens et quand même un peu de travail dans tout ça. Tricount nous a ruiné!
Et à toi, Roxane, ma dernière cointerne et pas la moindre. Il a fallu que j'attende 4 ans avant de trouver une cointerne comme moi : fan de mode, fan des minions et pas discrète pour un sou.

A mes amis,
Rencontrés à la faculté de médecine : Elisa, Dorian, Lucile, Aurélie, Pauline, Marie ma patate, Alexis… Sans vous, le temps ne serait pas passé si vite.
Et de toujours : Sophie, Sophie, Cécily et Jennifer. Nous 5 c'est l'amitié, la vraie! De Paris à Montréal, de Poitiers à Bordeaux, de Mont de Marsan à Bayonne, vous êtes toujours là pour moi! Si WhatsApp était payant, nous serions ruinées!
A Tony, Etienne, Doudou, Gabi et toute la bande…Grâce à vous je travaille mes abdos au quotidien à force de rire, et grâce à mes photos d'enfance vous faites de même…!

A ma famille,
Merci à vous, papa et maman, pour tout ce que vous avez fait pour moi. Sans vous je n'en serais pas là. Je ne vous remercierai jamais assez. Et merci de m'avoir accueillie à la maison pendant ces 6 derniers mois. Merci à mon petit frère Cyril, mon petit footeux. Merci à mes grands-parents pour leur gentillesse et leur amour. Merci à tout le reste de la famille, oncles, tantes, cousins et cousine et à toi Sarah.

A ma belle-famille,
Merci de m'avoir accueillie les bras ouverts dans votre famille et de supporter mon gôut pour la victoire lors des parties de jeux de société.

A toi Ben,
Mon gronchon, ma moitié, merci d'avoir été à mes côtés tout au long de ces 4 années. Merci de m'avoir supportée pendant ces derniers mois de stress et de m'avoir aidée pour la relecture. Comme quoi, j'ai bien fait de passer ma D4 à la bibiliothèque… Attention, toi et moi, ce n'est que le début. Je t'aime.

Merci pour tous ces surnoms que vous m'avez donnés au fil des années : micro, minipouce, passe-partout, duwhite, tompouce, minus, microminus…tous très peu en rapport avec mon physique…

Et biensûr, merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

TABLE DES MATIÈRES

1. Introduction 6
1.1. Les anticorps actuellement utilisés en pratique clinique dans la polyarthrite rhumatoïde 8
1.1.1. Utilité diagnostique 8
1.1.2. Rôle dans la physiopathologie de la PR 10
1.1.3. Utilité pronostique 13
1.2. La carbamylation 14
1.2.1. Les modifications post-traductionnelles 14
1.2.2. Description de la carbamylation 16
1.2.3. Lien entre carbamylation et PR 19
1.3. Les anticorps anti-protéines carbamylées (anti-CarP) 20
1.3.1. Une entité à part? 20
1.3.2. Les anticorps anti-CarP et la PR 21
1.3.2.1. Prévalence 21
1.3.2.2. Prévalence des anticorps anti-CarP chez les PR séronégatives 22
1.3.2.3. Présence des anticorps anti-CarP avant la PR et caractère prédictif 22
1.3.2.4. Spécificité et sensibilité des anticorps anti-CarP dans la PR .. 23
1.3.2.5. Anticorps anti-CarP et activité et durée de la maladie 23
1.3.2.6. Anticorps anti-CarP et pronostic radiographique 24
1.3.2.7. Association entre anticorps anti-CarP et facteurs de risque génétiques et environnementaux 24
1.4. Références 26

2. Dosage des anticorps anti-CarP dans les sérums des patients de la cohorte nationale ESPOIR 29
2.1. Justification 29
2.2. Patients et données 30
2.3. Méthodes de détection des anticorps anti-Carp 31
2.3.1. Protocole de l'ELISA anticorps anti-CarP 31
2.3.2. Illustrations *(Figure 9 et Photo)* 34
2.3.3. Résultats 36
2.3.4. Calcul du seuil de positivité 36
2.4. Objectifs 37
2.4.1. Objectif primaire 37
2.4.2. Objectifs secondaires 37

3. Anti-carbamylated protein antibodies are present in patients with early arthritis and are associated with disease activity and radiological damages 39

4. Annexe 65

1. Introduction

Actuellement, le diagnostic de polyarthrite rhumatoïde (PR) repose sur des critères cliniques et biologiques qui comportent essentiellement deux types d'anticorps réalisés au quotidien : le facteur rhumatoïde (FR) et les anticorps anti-peptides citrullinés cycliques (anti-CCP) (1). Devant la présence d'arthrites récentes indifférenciées, notre bilan biologique actuel comprend entre autres ces deux anticorps.

Or, il est fréquent de poser un diagnostic de PR alors que ces anticorps sont négatifs et notre diagnostic est alors moins certain (2). De même, dans les cas où seul le FR est positif, le doute diagnostique persiste car sa spécificité est faible (3).

Un enjeu actuel est donc de trouver de nouveaux biomarqueurs permettant de faire sortir de la séronégativité un certain nombre de PR et améliorer ainsi la sensibilité diagnostique du bilan immunologique.

De plus, ces nouveaux biomarqueurs pourraient apporter de nouvelles informations sur la physiopathologie de la PR, ainsi que sur son pronostic. En effet, il existe non pas une forme de PR mais plusieurs PR avec un phénotype hétérogène (2)(4). La plupart des études physiopathologiques publiées actuellement se rapportent aux PR anti-CCP positifs (5). Il s'agit de PR avec un pronostic différent de celles anti-CCP négatifs, notamment sur le plan érosif, avec une physiopathologie bien particulière (4).

Il y a 4 ans, ont été décrits pour la première fois de nouveaux anticorps chez les patients atteints de PR, les anticorps anti-protéines carbamylées (anti-CarP) (6). Les anti-CarP semblent être un marqueur intéressant, car à la fois présents chez les PR séronégatives et séropositives (6)(7)(8)(9)(10)(11), ils seraient associés à une évolution radiographique plus sévère (6)(9)(11). Ils pourraient donc délimiter un nouveau groupe de patients avec une physiopathologie et un phénotype différents.

Notre but était donc de regarder si ces anticorps anti-CarP étaient présents chez des patients atteints de PR dans une autre grande cohorte nationale, la cohorte française

ESPOIR (Etude et Suivi des Polyarthrites Indifférenciées Récentes). Cette cohorte regroupe des polyarthrites indifférenciées récentes, incluses de 2002 à 2005 et dont le diagnostic de PR était probable ou certain à l'inclusion (12). Grâce au laboratoire Inova Diagnostics de Boston, nous avons obtenu des kits ELISA non commercialisés anti-anticorps anti-CarP et avons pu préalablement tester une trentaine de sérums de patients du service de rhumatologie à Bordeaux ayant une PR. Suite à ces résultats encourageants démontrant la faisabilité du test, nous avons pu réaliser cet ELISA à plus grande échelle, sur les sérums des patients issus de la cohorte ESPOIR.

1.1. Les anticorps actuellement utilisés en pratique clinique dans la polyarthrite rhumatoïde

1.1.1. Utilité diagnostique

La PR est une maladie auto-immune systémique chronique qui affecte principalement la membrane synoviale des articulations pouvant conduire à leur destruction. Elle touche 0,5 à 1% de la population (13).

Actuellement, l'association FR/anti-CCP correspond au test de routine utilisé pour diagnostiquer une PR chez des patients présentant des arthralgies ou des arthrites indifférenciées. Ces anticorps ont même été intégrés aux critères diagnostiques ACR (American College of Rheumatology) en 2010 (*Tableau 1*) (1). Cependant, même si les anti-CCP sont des marqueurs très spécifiques (spécificité aux alentours de 95%) (14), les FR le sont moins (spécificité aux alentours de 85%) (3) et la sensibilité combinée de ces deux anticorps est encore limitée à environ 70% (7). Un nombre non négligeable de PR sont donc séronégatives avec un pourcentage variant de 10 à 48% selon les études (2).

Tableau 1 : Critères ACR/EULAR 2010 pour le diagnostic de PR (1)

	Score
Target population (Who should be tested?): Patients who	
1) have at least 1 joint with definite clinical synovitis (swelling)*	
2) with the synovitis not better explained by another disease†	
Classification criteria for RA (score-based algorithm: add score of categories A–D; a score of ≥6/10 is needed for classification of a patient as having definite RA)‡	
A. Joint involvement§	
1 large joint¶	0
2−10 large joints	1
1−3 small joints (with or without involvement of large joints)#	2
4−10 small joints (with or without involvement of large joints)	3
>10 joints (at least 1 small joint)**	5
B. Serology (at least 1 test result is needed for classification)††	
Negative RF *and* negative ACPA	0
Low-positive RF *or* low-positive ACPA	2
High-positive RF *or* high-positive ACPA	3
C. Acute-phase reactants (at least 1 test result is needed for classification)‡‡	
Normal CRP *and* normal ESR	0
Abnormal CRP *or* abnormal ESR	1
D. Duration of symptoms§§	
<6 weeks	0
≥6 weeks	1

ACR, American College of Rheumatology ; EULAR, European League Against Rheumatism ; RA, polyarthrite rhumatoïde ; RF, facteur rhumatoïde ; ACPA, anticorps anti-peptides citrullinés ; ESR, vitesse de sédimentation ; CRP, C reactive protein

1.1.2. Rôle dans la physiopathologie de la PR

La découverte des anti-CCP a permis de mieux comprendre une partie de la physiopathologie de la PR. Des facteurs génétiques (HLADRB1, PTPN22) et des facteurs environnementaux (tabagisme, parodontopathie) ont ainsi été identifiés comme étant des facteurs de risque de PR anti-CCP+ (5). En effet, le tabac dans les poumons tout comme la présence de Porphyromonas gingivalis au niveau gingival (via sa peptidyl arginine déiminase) entraînent une citrullination locale des protéines (*Figure 1*). La citrullination correspond à la transformation enzymatique d'un acide aminé arginine en citrulline.

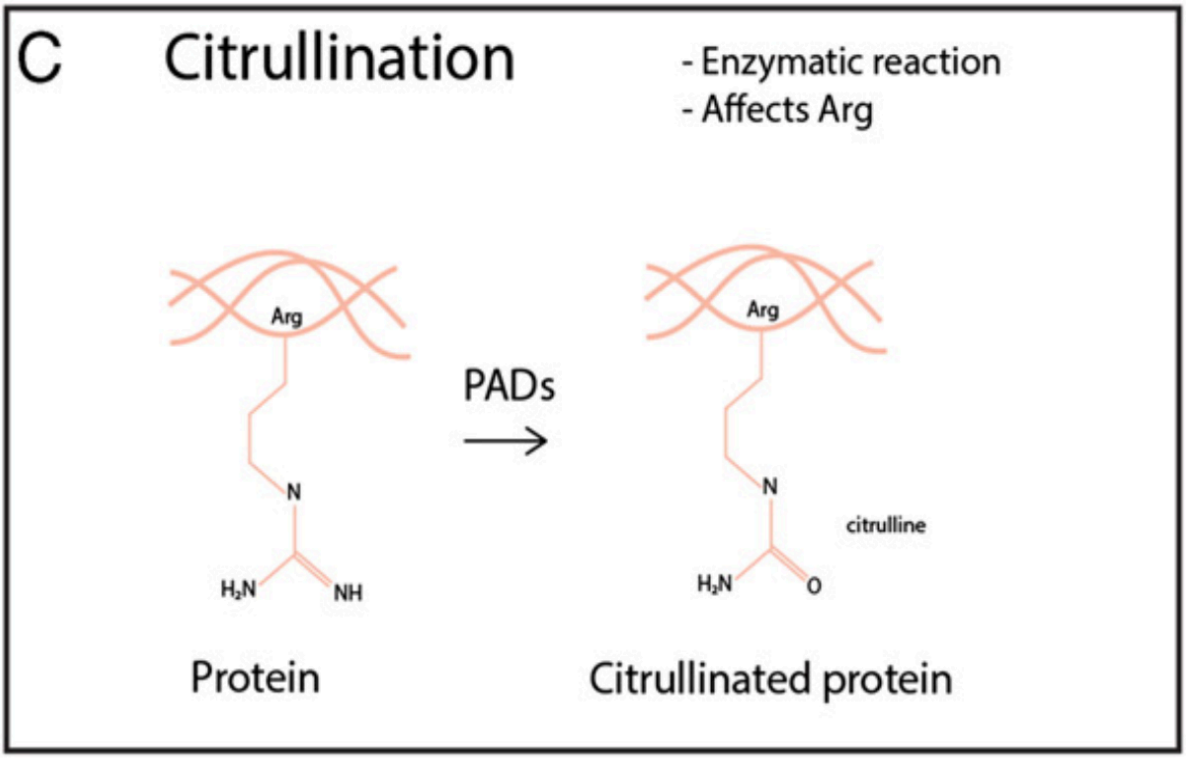


Figure 1 : Citrullination (15)
Arg, arginine ; PADs, peptidyl arginine deiminases

Si l'on possède des allèles de susceptibilité des gènes HLA-DR (human leukocyte antigen), les cellules présentatrices d'antigènes vont fixer de manière plus affine la citrulline grâce à une région spécifique de leur CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) appelée l'épitope partagé. Elles vont ainsi présenter cet antigène aux lymphocytes T4 qui seront ensuite activés dans un contexte de polymorphisme de PTPN22 par exemple (*Figures 2 et 3)* (5). La physiopathologie des PR anti-CCP- est quant à elle moins bien connue (2).

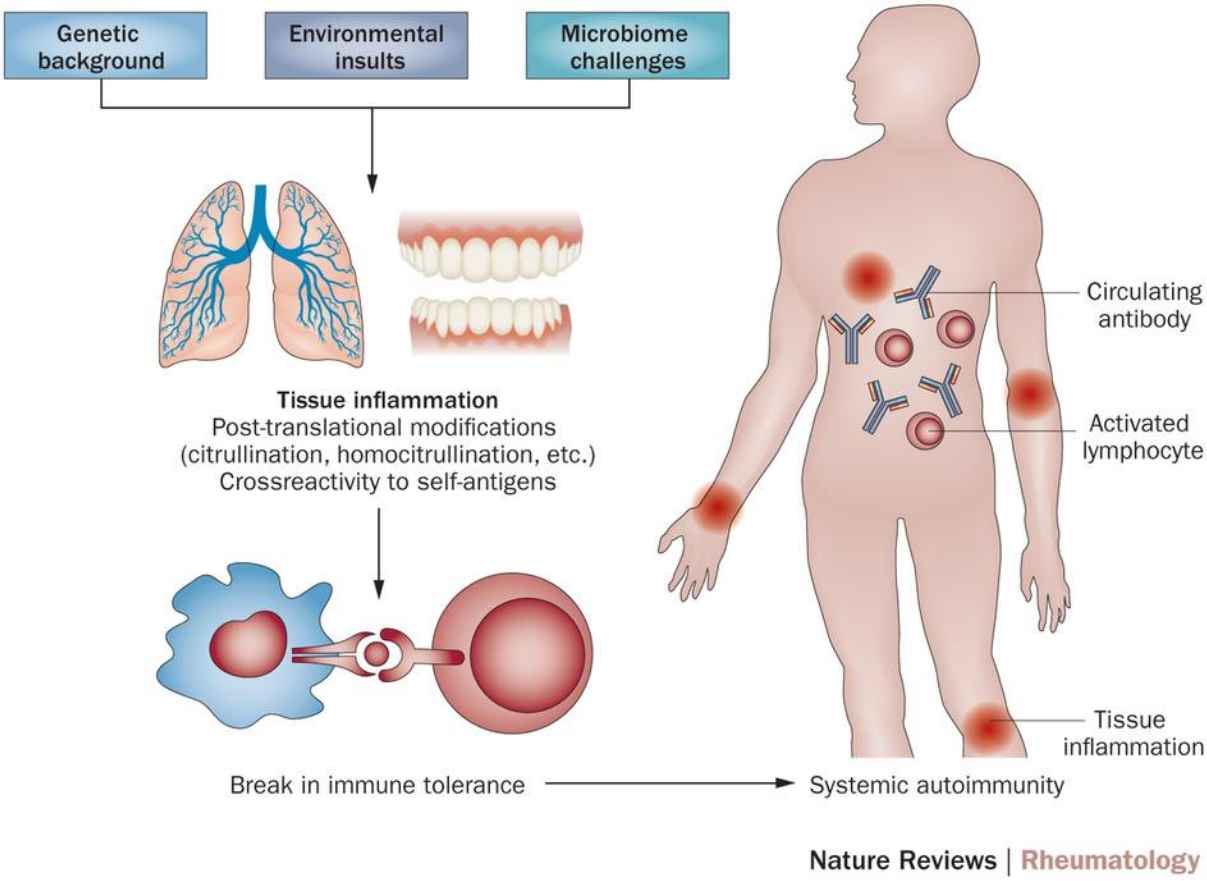


Figure 2 : Physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde (d'après L. Klareskog et al., Autoimmunity : Lungs and citrullination, Nature Reviews Rheumatology, 17 mars 2015)

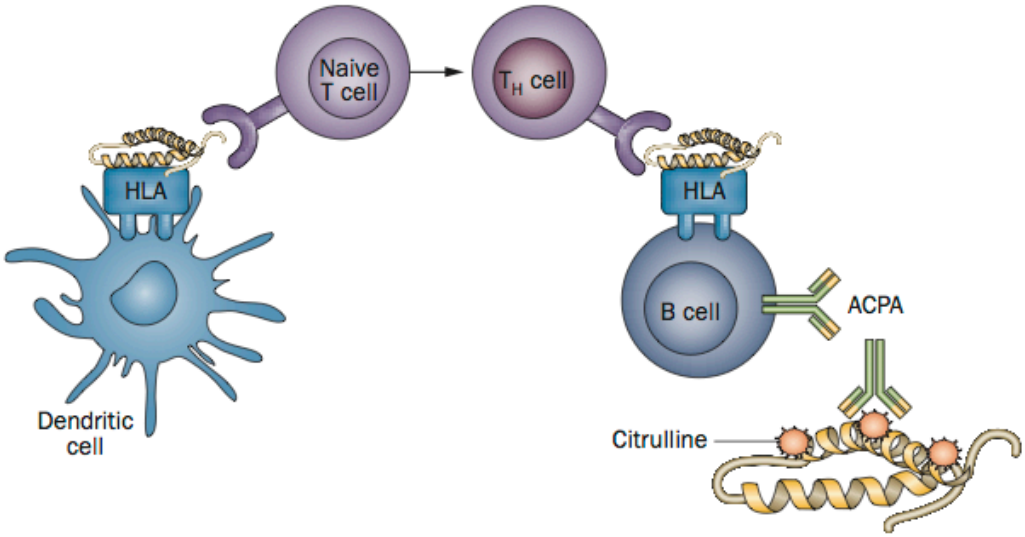


Figure 3 : Production des anticorps anti-CCP grâce aux facteurs de susceptibilité génétique (4)
HLA, human leukocyte antigen ; ACPA, anticorps anti-peptides citrullinés ; T cell, lymphocyte T ; B cell, lymphocyte B

Ces anticorps sont détectés de nombreuses années avant de développer les premiers symptômes et c'est la maturation de cette réponse immunitaire qui va entraîner l'apparition de signes cliniques et le développement d'une PR : augmentation du nombre d'épitopes reconnus, augmentation du taux d'anticorps, de leur avidité, et des isotypes (*Figure 4*) (4)(16).

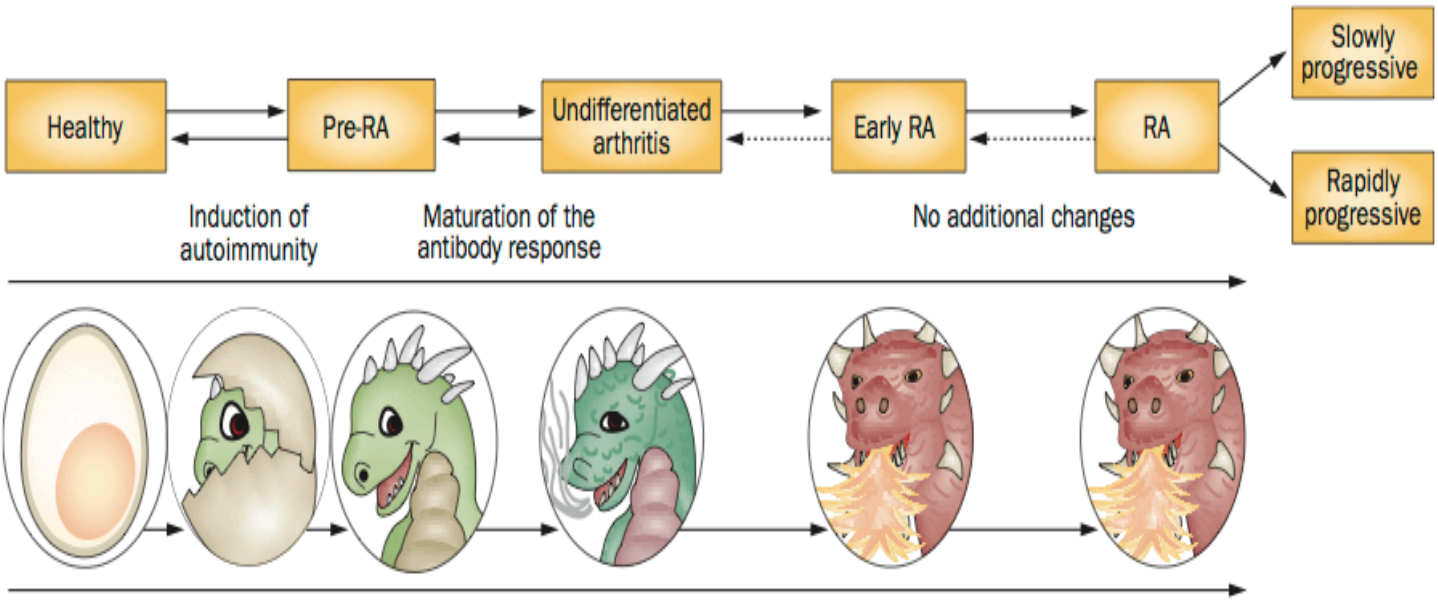


Figure 4 : Maturation de la réponse des anti-CCP dans le développement de la PR (4)
RA, rheumatoid arthritis

1.1.3. Utilité pronostique

Les PR anti-CCP+ ou anti-CCP- ont la même présentation clinique initiale mais leur évolution est différente. Les PR anti-CCP+ sont plus inflammatoires et présentent des lésions radiographiques plus précoces et plus nombreuses que les PR anti-CCP- (4). De plus l'absence d'anticorps est associée à une plus forte probabilité de rémission sans traitement de fond (17). Il existe donc plusieurs PR, différentes sur le plan phénotypique en fonction des profils immunologiques.

1.2. La carbamylation

1.2.1. Les modifications post-traductionnelles

La synthèse protéique est un processus dont les dernières étapes sont représentées par de nombreuses modifications post-traductionnelles modifiant la nature et la fonction des protéines (18). Ces modifications aboutissent à la formation de néo-antigènes pouvant constituer des cibles pour le système immunitaire car considérés comme étrangers. S'en suit alors la production d'anticorps dirigés contre ces antigènes (*Figure 5*).

Les modifications post-traductionnelles les plus connues dans la PR sont la glycation du fragment Fc des IgG, possible préambule à l'émergence du FR (19) (*Figure 6*), et la citrullination, modification enzymatique permettant la transformation de l'arginine en citrulline sous l'effet de la peptidyl arginine déiminase (20) (*Figure 1*).

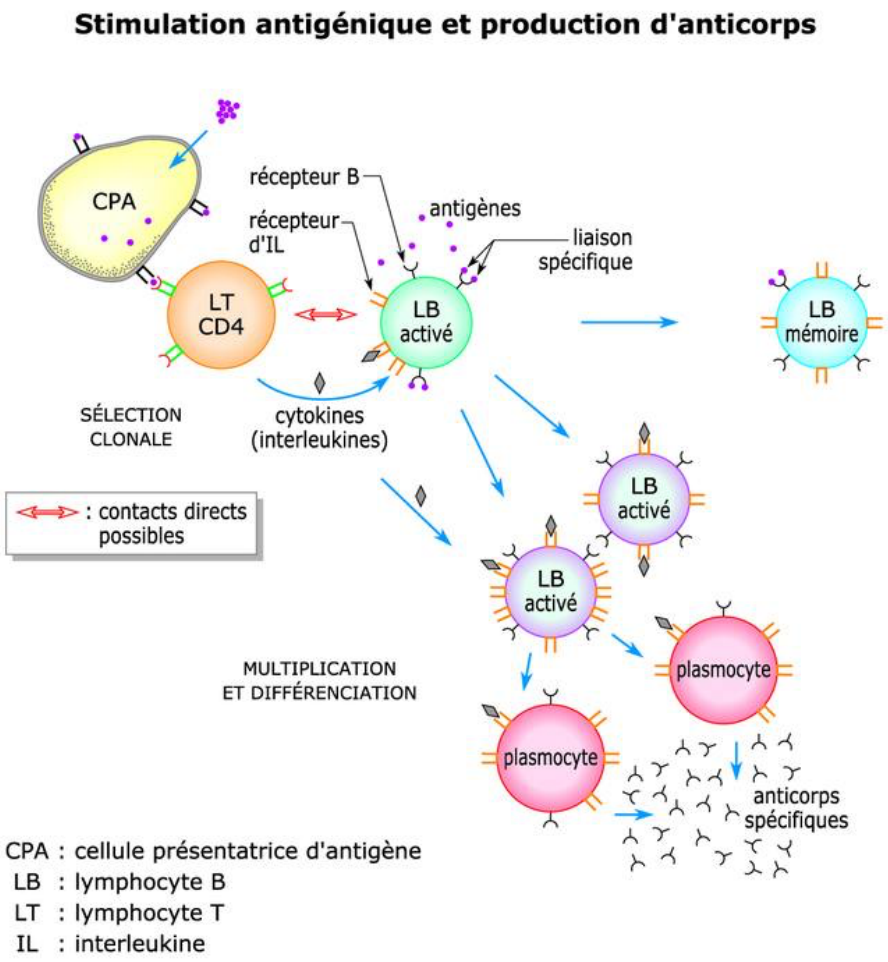


Figure 5 : Production d'anticorps contre des néo-antigènes

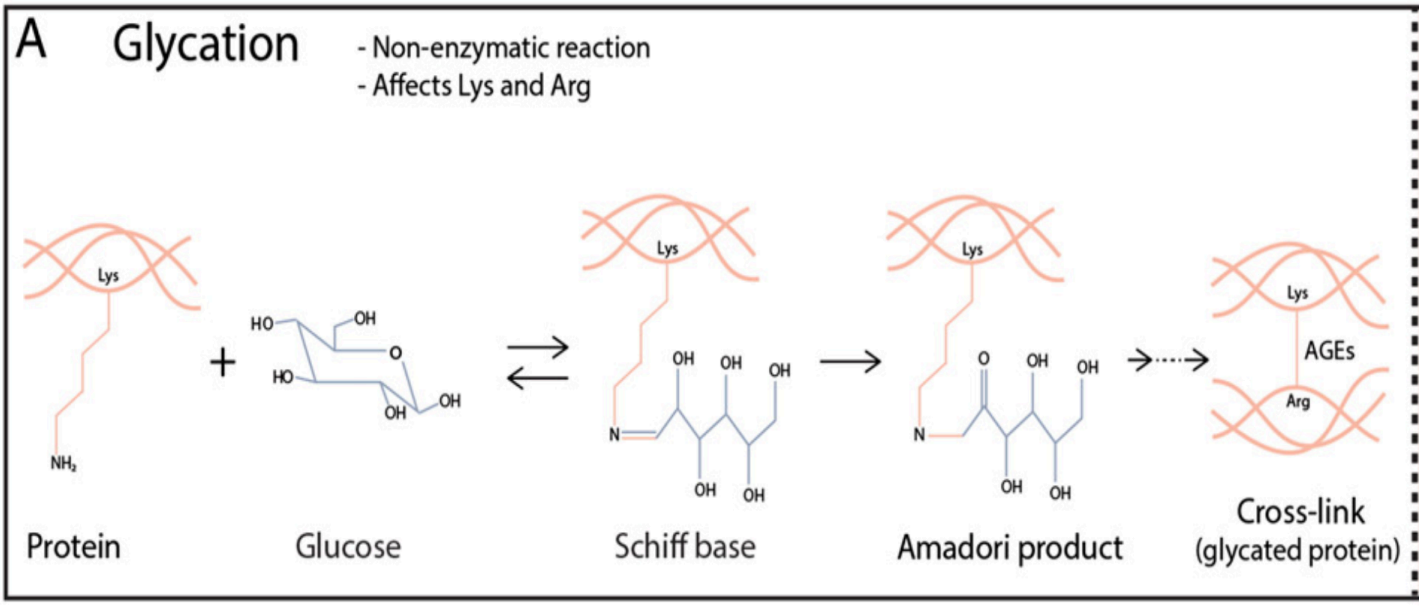


Figure 6 : Glycation (15)
Lys, lysine ; Arg, arginine

1.2.2. Description de la carbamylation

La carbamylation est une modification post-traductionnelle chimique, et non pas enzymatique comme la citrullination (*Figure 7*). L'acide aminé lysine va, sous l'action du cyanate, être transformé en homocitrulline ; d'autres acides aminés présentant des chaînes latérales, notamment au niveau de la partie terminale des protéines, peuvent aussi être modifiés. La protéine subit alors un changement conformationnel par modification d'une charge positive en charge neutre. Sa structure et ses fonctions sont modifiées (20)(21). Cette protéine est dite carbamylée ou homocitrullinée.

Dans l'organisme, le cyanate est en équilibre avec l'urée. C'est l'augmentation anormale des concentrations de cyanate dans l'organisme qui va permettre ces phénomènes de carbamylation, même si cette dernière est possible à l'état physiologique, notamment sur les protéines à longue demi-vie.

Les conditions pathologiques entraînant une augmentation de la concentration de cyanate sont (*Figure 8*) (20)(22)(23):

- l'insuffisance rénale par augmentation des concentrations d'urée,
- l'inflammation : la myéloperoxidase stockée puis libérée par les polynucléaires neutrophiles transforme le thiocyanate en cyanate par oxydation par le peroxyde d'hydrogène ainsi que le chlorure en cyanate,
- le tabagisme : la fumée inhalée contient des particules d'acide isocyanique qui sont dégradées en thiocyanate puis en cyanate,
- l'inhalation directe de cyanates : biocarburants, combustion, cuisine, tabac, sapin.

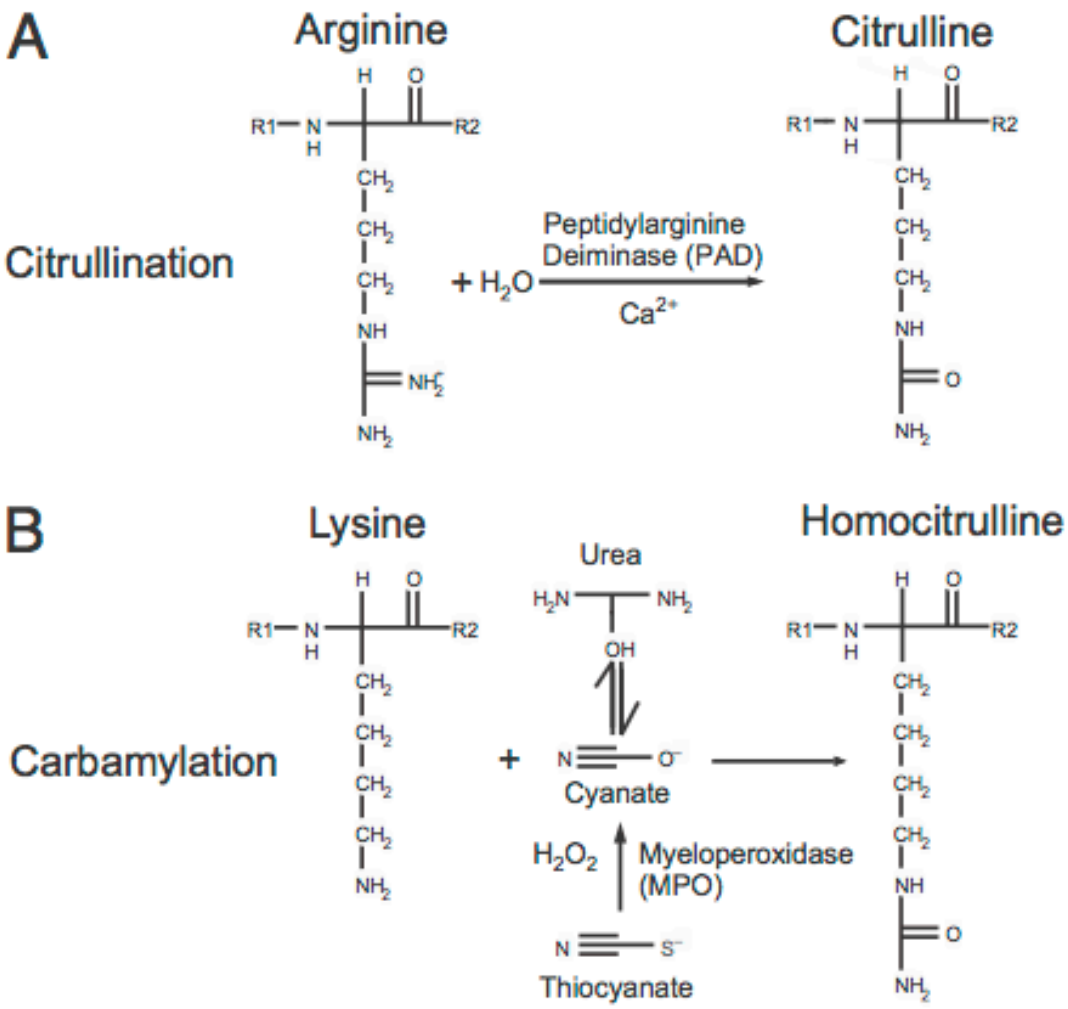


Figure 7 : Carbamylation et citrullination (6)

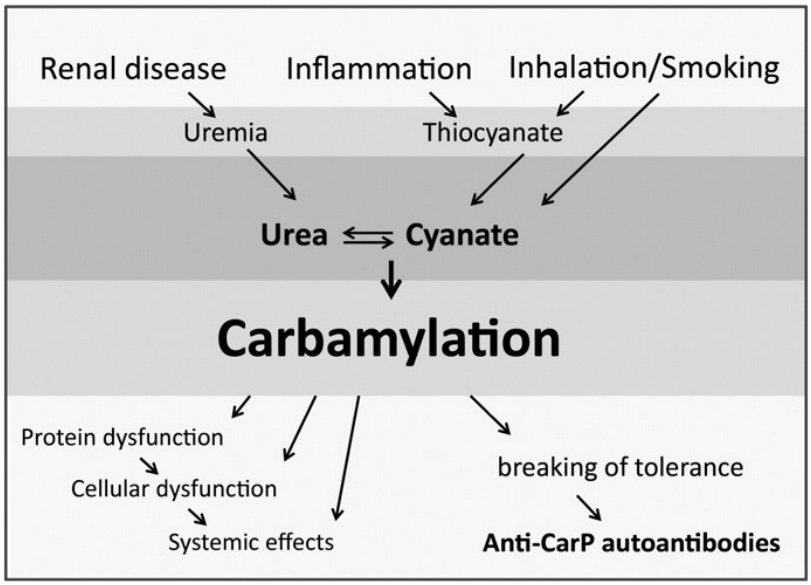


Figure 8 : Mécanismes et conséquences de la carbamylation (22)
Anti-CarP, anti-carbamylated protein antibodies

La carbamylation est donc déjà connue et impliquée dans certaines pathologies (22)(23) :

- maladie rénale chronique : c'est dans un contexte d'insuffisance rénale terminale que la carbamylation a été décrite pour la première fois il y a une trentaine d'années. Le degré de carbamylation est un facteur pronostique indépendant de progression de la maladie rénale, il est associé au taux d'urée et aux autres marqueurs comme la créatinine.

- pathologies cardio-vasculaires : les protéines carbamylées sont plus souvent retrouvées dans les zones inflammatoires des plaques athéromateuses que dans les vaisseaux normaux. De plus, la carbamylation confère une activité proathérogène aux molécules modifiées, notamment les LDL (low density lipoprotein), par diminution de leur capacité à se mobiliser, altération de leur pouvoir anti-inflammatoire et anti-oxydant, accumulation dans les macrophages, apoptose des cellules endothéliales et enfin prolifération des cellules musculaires lisses. Un taux élevé de carbamylation est corrélé à la prévalence des maladies athéroscléreuses coronariennes et au risque d'évènement cardiovasculaire majeur : c'est un facteur de risque pronostique indépendant chez ces patients. Elle est favorisée par le tabagisme car il entraîne un taux élevé de thiocyanates comme vu précédemment.

Ce lien entre carbamylation et pathologies cardio-vasculaires est un élément important à souligner puisque l'on sait que le risque cardio-vasculaire est 1,5 fois plus important chez les PR que dans la population générale (24). On pourrait donc supposer que la carbamylation soit liée au risque cardio-vasculaire des patients atteints de PR.

Par ailleurs, de nombreuses protéines cibles ont été identifiées comme l'EPO (érythropoïétine) dont la carbamylation entraîne la perte de ses fonctions d'erythropoïèse, ou bien encore les IgG1 qui, une fois carbamylées, ne peuvent plus fixer le C1Q perdant ainsi leur fonction activatrice du complément (25).

1.2.3. Lien entre carbamylation et PR

L'idée qu'une carbamylation accrue puisse avoir lieu lors de la PR est plus récente.

Comme écrit précédemment, les modifications post-traductionnelles ont la capacité de rompre la tolérance immunologique et donc d'induire la formation d'auto-anticorps. Steinbrecher et al., ont montré pour la première fois que cette rupture de tolérance pouvait survenir avec des antigènes carbamylés. Les anticorps alors produits sont dirigés contre les protéines modifiées mais ne reconnaissent pas les épitopes natifs (26). Mydel et al. ont ensuite démontré que des protéines homocitrullinées étaient détectées dans le sérum et le liquide intra-articulaire de patients atteints de PR ; et que dans des modèles murins, l'immunisation avec des protéines homocitrullinées pouvait induire des arthrites (27). Par ailleurs, des protéines homocitrullinées ont été retrouvées dans des nodules de PR (28).

Plus récemment, Bright et al. ont émis l'hypothèse que l'inflammation gingivale et périodontale retrouvée dans les périodontopathies (facteur de risque environnemental de la PR) pouvait entraîner une carbamylation ; ils ont de plus mis en évidence des protéines carbamylées dans les tissus gingivaux enflammés (29).

1.3. Les anticorps anti-protéines carbamylées (anti-CarP)

1.3.1. Une entité à part?

La citrulline, produit de la transformation enzymatique de l'arginine, et l'homocitrulline, produit de la carbamylation de la lysine, sont 2 acides aminés très proches sur le plan chimique (*Figure 7*). Ces deux acides aminés contiennent une chaîne latérale avec un groupe –NH-CO-NH2 et la différence se trouve sur la longueur de cette chaîne, plus longue d'un groupe méthylène pour l'homocitrulline (20).

Turunen et al. ont montré que le test anti-CCP_2 peut reconnaître à la fois des protéines citrullinées et homocitrullinées. Par ailleurs, des lapins immunisés avec des protéines homocitrullinées produisent des anticorps anti-CCP (30). Et, in vitro, les anticorps anti-peptides citrullinés peuvent fixer l'homocitrulline et les anticorps anti-protéines homocitrullinées peuvent être inhibés par la citrulline et l'homocitrulline (8).

Existe-t-il donc réellement d'authentiques anticorps anti-protéines carbamylées et constituent-ils une entité à part entière, différente des anti-CCP?

Il semblerait, puisque certains anticorps anti-CCP et certains anticorps anti-CarP ne reconnaissent que leur antigène spécifique (31).

En 2011, Shi et al. ont mis en évidence des autoanticorps dirigés contre des protéines carbamylées, à la fois chez les PR séropositives et séronégatives, montrant ainsi la distinction entre ces deux anticorps (6). Ce résultat a été confirmé par plusieurs autres études plus tard (7)(8)(9)(10)(11). De plus la cinétique d'apparition de ces deux anticorps est globalement identique mais, sur le plan individuel, celle-ci peut être différente (anti-CarP précédant les anti-CCP ou inversement)(7)(11)(32). Enfin, chez les double positifs, les anti-CarP sont inhibés par les antigènes carbamylés mais pas par les antigènes citrullinés ou les contrôles et inversement pour les anti-peptites citrullinés (6).

Donc, même s'il existe un risque de réaction croisée, il est possible de développer des anticorps anti-CarP distincts des anti-CCP.

1.3.2. Les anticorps anti-CarP et la PR

1.3.2.1. Prévalence

Shi et al. ont été les premiers à tester les sérums humains de 557 patients atteints de PR issus d'une cohorte de polyarthrites récentes et de 305 témoins sains pour les anti-CarP. Dans cette cohorte, 45% des PR ont des IgG anti-CarP et 43% des IgA anti-CarP, contre respectivement 2,95% et 5,24% des sujets sains (6).

Puis, dans 2 cohortes européennes (Leiden Early Arthritis Clinic et Swedish Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthrits), les anti-CarP Fcs (anticorps dirigés contre des protéines de veau fœtal carbamylées) sont respectivement retrouvés chez 44,9% et 35,6% des PR et les anti-CarP Fib (anticorps dirigés contre du fibrinogène carbamylé) chez 38% et 42,6% (10).

Yee et al. (9), Scinocca et al. (8) et Brink et al. (11) ont retrouvé respectivement des anti-CarP chez 30, 49 et 42,2% des PR.

Tous ces anticorps sont retrouvés aussi bien chez les patients anti-CPP+ que les anti-CCP-.

1.3.2.2. Prévalence des anticorps anti-CarP chez les PR séronégatives

Selon les études, la prévalence des anti-CarP chez les PR anti-CCP- est de 0 à 31,4% (6)(7)(8)(9)(10)(11)(32)(33). Ils sont retrouvés à la fois avant et après le diagnostic de PR.

Jiang et al. et Shi et al. ont montré que les anticorps anti-CarP sont significativement plus présents chez les patients anti-CCP+ que chez les anti-CCP- (respectivement $p<0,0001$ et $p<0,001$) (10)(33) contrairement à Yee et al. qui n'a pas retrouvé de différence (9).

Chez les double négatifs (FR et anti-CCP), Gan et al. n'ont pas retrouvé d'anticorps anti-CarP (0/9) (7).

La présence de ces anticorps chez les PR anti-CCP- confirme que les anti-CarP sont bien une entité à part entière.

1.3.2.3. Présence des anticorps anti-CarP avant la PR et caractère prédictif

Les anti-CCP et le FR sont présents des années avant l'apparition des premiers symptômes et sont, quand ils sont présents, prédictifs d'une évolution d'arthralgies ou d'arthrites indifférenciées vers une PR. Leur présence a donc un impact sur la prise en charge diagnostique.

Les anticorps anti-CarP sont eux aussi présents avant le diagnostic de PR (7) chez des patients avec des arthralgies FR+ et/ou CCP+ (33) ou avant même les premiers symptômes. Ils sont retrouvés jusqu'à 14 ans avant l'apparition de la symptomatologie, comme les anti-CCP, avec un taux augmentant avec le temps et donc plus important au stade de PR qu'en pré-symptomatique (11)(32). Ils sont prédictifs du développement ultérieur vers une PR, que les patients soient symptomatiques (arthralgies avec anti-CCP positifs) (33) ou non (7)(11).

1.3.2.4. Spécificité et sensibilité des anticorps anti-CarP dans la PR

Les anticorps anti-CarP ne sont pas retrouvés chez des sujets sains et sont significativement plus importants chez les PR (49%) que chez les patients atteints de lupus (5%) ou de rhumatisme psoriasique (3%) ($p<0,05$) (8).

Gan et al. ont montré que le dosage d'anticorps anti-CarP est peu sensible (<30%) mais hautement spécifique (>95%) pour le diagnostic de PR. Cependant, l'ajout du dosage de l'anti-Carp aux FR et anti-CCP n'augmenterait pas significativement la spécificité ou la sensibilité (7).

1.3.2.5. Anticorps anti-CarP et activité et durée de la maladie

L'association ACPA1 et anti-CarP, dans l'étude de Yee et al., est associée à la durée de la maladie ($p=0.0128$) et à l'activité mesurée par le DAS28 contrairement à l'anticorps anti-CarP pris seul. Le taux d'anticorps ACPA1-anti-CarP est corrélé significativement au score du DAS28 ($p=0.0264$) (9).

Hormis Yee et al., le lien entre le phénotype clinique de la PR et les anticorps anti-CarP a été assez peu investigué. Notre étude pourrait donc permettre d'apporter une information majeure confirmant l'observation de Yee et al., et ce sur une cohorte nationale.

1.3.2.6. Anticorps anti-CarP et pronostic radiographique

Shi et al. ont montré que la présence des anti-CarP est associée à une progression radiographique plus sévère selon le score de SharP et ce notamment chez les anti-CCP négatifs avec anti-CarP IgG (β=1,86 [1,41-2,26] , $p<10^5$) (6). Chez les PR anti-CCP+, les anti-CarP+ ne sont pas plus érosives. Cette constatation est confirmée par Yee et al. où le score de Sharp est significativement plus élevé chez les CarP+, avec un score moyen de 20 vs 10 chez les anti-CarP- (9). De plus, le taux d'anticorps est corrélé au score de Sharp (p=0,0332) (9).

Brink et al. ont montré, dans une population de PR suédoises, que la présence des anti-CarP avant le diagnostic de PR est associée aux lésions radiographiques au diagnostic mesurées par le score de Larsen (p=0,003). De plus leur présence au diagnostic est corrélée aux lésions radiographiques au diagnostic (p=0,017), à 24 mois (p=0,002) et à leur progression (p=0,013), l'association étant plus forte chez les anti-CarP+/anti-CCP- et non significative chez les CCP+ (11).

1.3.2.7. Association entre anticorps anti-CarP et facteurs de risque génétiques et environnementaux

Les facteurs génétiques (HLADRB1, PTPN22) et les facteurs environnementaux (tabagisme, parodontopathie) sont des facteurs de risque de PR anti-CCP+. Ils ont permis de mieux comprendre la physiopathologie de la PR. Il est légitime de se demander s'ils sont aussi des facteurs de risque de PR anti-CarP+. Jiang et al. n'ont pas retrouvé, dans 2 cohortes européennes de PR, de lien significatif entre les anticorps anti-CarP et les facteurs génétiques (HLADRB1 et PTPN22) ainsi qu'avec le tabac conduisant donc à l'hypothèse d'un mécanisme physiopathologique différent (10) même si un lien non significatif entre la présence des anti-CarP et l'allèle HLA-DRB1*03 semble apparaître dans le sous-groupe

CCP-. Par ailleurs, Scinocca et al. suggèrent in vitro qu'un lien entre les allèles SE de l'épitope partagé et l'homocitrulline est possible (8).

En définitive, la recherche de nouveaux biomarqueurs associés à la PR est un sujet d'actualité ayant son importance notamment pour améliorer notre prise en charge diagnostique et thérapeutique. Les données actuelles concernant les anticorps anti-CarP sont très prometteuses avec notamment des liens apparaissant entre ces anticorps et les phénotypes clinique et radiographique de la PR. De nouvelles études sur de larges cohortes sont donc nécessaires pour confirmer ces résultats.

1.4. Références

1. 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. 2010 Sep 1;62(9):2569–81.
2. Pratt AG, Isaacs JD. Seronegative rheumatoid arthritis: pathogenetic and therapeutic aspects. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2014 Aug;28(4):651–9.
3. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. Ann Intern Med. 2007 Jun 5;146(11):797–808.
4. Willemze A, Trouw LA, Toes REM, Huizinga TWJ. The influence of ACPA status and characteristics on the course of RA. Nat Rev Rheumatol. 2012 Mar;8(3):144–52.
5. Kallberg H, Padyukov L, Plenge RM, Ronnelid J, Gregersen PK, van der Helm-van Mil AHM, et al. Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. Am J Hum Genet. 2007 May;80(5):867–75.
6. Shi J, Knevel R, Suwannalai P, van der Linden MP, Janssen GMC, van Veelen PA, et al. Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Oct 18;108(42):17372–7.
7. Gan RW, Trouw LA, Shi J, Toes REM, Huizinga TWJ, Demoruelle MK, et al. Anti-carbamylated protein antibodies are present prior to rheumatoid arthritis and are associated with its future diagnosis. J Rheumatol. 2015 Apr;42(4):572–9.
8. Scinocca M, Bell DA, Racapé M, Joseph R, Shaw G, McCormick JK, et al. Antihomocitrullinated fibrinogen antibodies are specific to rheumatoid arthritis and frequently bind citrullinated proteins/peptides. J Rheumatol. 2014 Feb;41(2):270–9.
9. Yee A, Webb T, Seaman A, Infantino M, Meacci F, Manfredi M, et al. Anti-CarP antibodies as promising marker to measure joint damage and disease activity in patients with rheumatoid arthritis. Immunol Res. 2015 Feb;61(1-2):24–30.
10. Jiang X, Trouw LA, van Wesemael TJ, Shi J, Bengtsson C, Källberg H, et al. Anti-CarP antibodies in two large cohorts of patients with rheumatoid arthritis and their relationship to genetic risk factors, cigarette smoking and other autoantibodies. Ann Rheum Dis. 2014 Oct;73(10):1761–8.
11. Brink M, Verheul MK, Rönnelid J, Berglin E, Holmdahl R, Toes RE, et al. Anti-carbamylated protein antibodies in the pre-symptomatic phase of rheumatoid arthritis, their relationship with multiple anti-citrulline peptide antibodies and association with radiological damage. Arthritis Res Ther. 2015;17(1):25.
12. Combe B, Benessiano J, Berenbaum F, Cantagrel A, Daurès J-P, Dougados M, et al. The ESPOIR cohort: a ten-year follow-up of early arthritis in France: methodology and baseline characteristics of the 813 included patients. Jt Bone Spine Rev Rhum. 2007 Oct;74(5):440–5.
13. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. Autoimmun Rev. 2005 Mar;4(3):130–6.
14. Goëb V, Jouen F, Gilbert D, Le Loët X, Tron F, Vittecoq O. Diagnostic and prognostic usefulness of antibodies to citrullinated peptides. Jt Bone Spine Rev Rhum. 2009 Jul;76(4):343–9.
15. Zeltz C, Gullberg D. Post-translational modifications of integrin ligands as pathogenic

mechanisms in disease. Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol. 2014 Nov;40:5–9.
16. Bax M, Huizinga TWJ, Toes REM. The pathogenic potential of autoreactive antibodies in rheumatoid arthritis. Semin Immunopathol. 2014 May;36(3):313–25.
17. Van der Woude D, Young A, Jayakumar K, Mertens BJ, Toes REM, van der Heijde D, et al. Prevalence of and predictive factors for sustained disease-modifying antirheumatic drug-free remission in rheumatoid arthritis: results from two large early arthritis cohorts. Arthritis Rheum. 2009 Aug;60(8):2262–71.
18. Petsko GA, Ringe D, Sanlaville MC, Charmot MD. Structure et fonction des protéines. De Boeck Supérieur; 2008. 216 p.
19. Goulabchand R, Batteux F, Guilpain P. [Glycosylation of autoantibodies in autoimmunes diseases]. Rev Médecine Interne Fondée Par Société Natl Francaise Médecine Interne. 2013 Dec;34(12):746–53.
20. Pruijn GJM. Citrullination and carbamylation in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. Front Immunol. 2015;6:192.
21. Willemze A, Toes REM, Huizinga TWJ, Trouw LA. New biomarkers in rheumatoid arthritis. Neth J Med. 2012 Nov;70(9):392–9.
22. Shi J, van Veelen PA, Mahler M, Janssen GMC, Drijfhout JW, Huizinga TWJ, et al. Carbamylation and antibodies against carbamylated proteins in autoimmunity and other pathologies. Autoimmun Rev. 2014 Mar;13(3):225–30.
23. Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, Kummu O, Hörkkö S, Barnard J, et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. Nat Med. 2007 Oct;13(10):1176–84.
24. Avina-Zubieta JA, Thomas J, Sadatsafavi M, Lehman AJ, Lacaille D. Risk of incident cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. Ann Rheum Dis. 2012 Sep;71(9):1524–9.
25. Koro C, Bielecka E, Dahl-Knudsen A, Enghild JJ, Scavenius C, Brun JG, et al. Carbamylation of immunoglobulin abrogates activation of the classical complement pathway. Eur J Immunol. 2014 Nov;44(11):3403–12.
26. Steinbrecher UP, Fisher M, Witztum JL, Curtiss LK. Immunogenicity of homologous low density lipoprotein after methylation, ethylation, acetylation, or carbamylation: generation of antibodies specific for derivatized lysine. J Lipid Res. 1984 Oct;25(10):1109–16.
27. Mydel P, Wang Z, Brisslert M, Hellvard A, Dahlberg LE, Hazen SL, et al. Carbamylation-dependent activation of T cells: a novel mechanism in the pathogenesis of autoimmune arthritis. J Immunol Baltim Md 1950. 2010 Jun 15;184(12):6882–90.
28. Turunen S, Koivula M-K, Melkko J, Alasaarela E, Lehenkari P, Risteli J. Different amounts of protein-bound citrulline and homocitrulline in foot joint tissues of a patient with anti-citrullinated protein antibody positive erosive rheumatoid arthritis. J Transl Med. 2013;11:224.
29. Bright R, Proudman SM, Rosenstein ED, Bartold PM. Is there a link between carbamylation and citrullination in periodontal disease and rheumatoid arthritis? Med Hypotheses. 2015 Jun;84(6):570–6.
30. Turunen S, Koivula M-K, Risteli L, Risteli J. Anticitrulline antibodies can be caused by homocitrulline-containing proteins in rabbits. Arthritis Rheum. 2010 Nov;62(11):3345–52.
31. Shi J, Willemze A, Janssen GMC, Veelen PA van, Drijfhout JW, Cerami A, et al. Recognition of citrullinated and carbamylated proteins by human antibodies: specificity, cross-reactivity and the “AMC-Senshu” method. Ann Rheum Dis. 2013 Jan 1;72(1):148–50.
32. Shi J, van de Stadt LA, Levarht EWN, Huizinga TWJ, Hamann D, van Schaardenburg D, et al. Anti-carbamylated protein (anti-CarP) antibodies precede the onset of rheumatoid

arthritis. Ann Rheum Dis. 2014 Apr;73(4):780–3.
33. Shi J, van de Stadt LA, Levarht EWN, Huizinga TWJ, Toes REM, Trouw LA, et al. Anti-carbamylated protein antibodies are present in arthralgia patients and predict the development of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2013 Apr;65(4):911–5.
34. Muller PCEH, Anink J, Shi J, Levarht EWN, Reinards THCM, Otten MH, et al. Anticarbamylated protein (anti-CarP) antibodies are present in sera of juvenile idiopathic arthritis (JIA) patients. Ann Rheum Dis. 2013 Dec 1;72(12):2053–5.

2. Dosage des anticorps anti-CarP dans les sérums des patients de la cohorte nationale ESPOIR

2.1. Justification

Au vu de la littérature existante sur les anticorps anti-CarP dans la PR, très prometteuse, il nous a semblé intéressant de répliquer et de compléter ces données sur une cohorte française de polyarthrites récentes.

Trouver un nouveau biomarqueur pour les patients atteints de PR permettrait d'améliorer la sensibilité diagnostique, de rattraper les PR séronégatives et enfin de connaître le profil évolutif des polyarthrites associées à ces anticorps afin d'améliorer leur prise en charge.

Il est donc nécessaire de compléter ces résultats par de nouvelles études, le but étant, peut-être dans un futur proche, d'intégrer le dosage des anticorps anti-CarP dans le kit diagnostique de routine des PR avec les FR et les anti-CCP.

Le biomarqueur idéal serait à la fois prédictif de la maladie, sensible et spécifique, pronostique, reflétant l'activité de la maladie, et prédisant la réponse au traitement.

Nous avons donc décidé d'étudier ces anticorps anti-CarP dans une cohorte nationale française, la cohorte ESPOIR.

2.2. Patients et données

La cohorte ESPOIR est une cohorte nationale française longitudinale de patients présentant des arthrites récentes avec un diagnostic probable ou certain de PR à l'inclusion. 813 patients, inclus entre décembre 2002 et mars 2005, ont été suivis de manière régulière avec, à chaque visite, un recueil de données cliniques, biologiques et radiographiques. Nous avons pu obtenir les sérums des patients issus de la visite des 6 mois afin de les tester pour ces nouveaux anticorps. A défaut d'avoir pu tester les sérums à l'inclusion, la stabilité des sérums dans le temps nous permet de conclure que si les anticorps étaient présents à l'inclusion, ils le restent ensuite. Sur les 750 échantillons de sérums reçus la disponibilité des kits ELISA nous a permis de tester 720 d'entre eux.

Par ailleurs, nous avons également reçu pour chaque patient de la cohorte ESPOIR les données démographiques, cliniques, biologiques, radiographiques, et thérapeutiques demandées.

2.3. Méthodes de détection des anticorps anti-Carp

Pour tester les sérums des patients issus de la cohorte ESPOIR, nous avons utilisé un kit Elisa non commercial, gracieusement donné par le laboratoire Inova Diagnostics (Boston). Ce kit avait été utilisé par Shi et al. en 2010 dans la première étude portant sur les anticorps anti-CarP dans la PR. Nous avons réalisé ces tests dans le laboratoire d'Immunologie de l'université de Bordeaux (CIRID, UMR CNRS 5164 du Professeur Moreau).

2.3.1. Protocole de l'ELISA anticorps anti-CarP

La technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est une technique immuno-enzymatique de détection, qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.

Notre but étant de détecter des anticorps et non pas des antigènes, nous avons donc utilisé un test ELISA indirect qui se découpe en 4 grandes étapes : le "coating" de l'antigène, la fixation des anticorps anti-CarP sur les antigènes carbamylés, la fixation des anticorps de détection sur les anticorps anti-CarP et la révélation des anticorps fixés grâce à une réaction enzymatique *(Figure 9)*. Nous avons pour cela suivi le protocole fourni par le laboratoire.

Matériels et étapes préalables :

Nous disposions des réactifs suivants : CarP Wash Concentrate, Diluent, Low Positive Control, six CarP Elisa Calibrators (correspondant à des concentrations différentes en anticorps anti-CarP), HRP IgG Conjugate, TMB Chromogen, HRP Stop Solution.

Tous les sérums et tous les réactifs, préalablement conservés à température adaptée, étaient mis à température ambiante avant de débuter les tests. Le CarP Wash Concentrate fut dilué au 1:40.

Etape 1 : « coating » de l'antigène

Cette étape avait été préalablement réalisée par le laboratoire Inova Diagnostics. Le fond des puits des plaques fournies était pré-recouvert avec des antigènes de veau fœtal carbamylés (Ca-FcS).

Etape 2 : fixation des anticorps anti-CarP sur les antigènes carbamylés

- nous avons préparé une dilution au 1:101 pour chaque échantillon de patient à l'aide du diluent.

- nous avons ensuite disposé dans chaque plaque 100µl de chaque échantillon selon la disposition indiquée dans le tableau ci-dessous (*Tableau 2*) :

  - 6 contrôles ou calibrators, et leurs duplicats (concentrations décroissantes de A à F)
  - 1 low positive control et son duplicat
  - 1 blanc (diluent) et son duplicat
  - 80 sérums de patients (S)

Tableau 2 : Exemple type de plaque

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Calibrator	Calibrator	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B	Calibrator	Calibrator	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C	Calibrator	Calibrator	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D	Calibrator	Calibrator	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E	Calibrator	Calibrator	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
F	Calibrator	Calibrator	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
G	Low Positiv	Low Positiv	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
H	Blanc	Blanc	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

- les anticorps anti-CarP, s'ils sont présents, se fixent sur les antigènes carbamylés présents au fond des puits.

- les plaques ont incubé pendant 30 minutes à température ambiante et à la lumière du jour,

- puis ont été lavées manuellement à 5 reprises avec le CarP Wash Concentrate. Après lavage, seul les anticorps anti-CarP s'étant fixés restent.

Etape 3 : fixation des anticorps de détection sur les anticorps anti-CarP

- nous avons rajouté dans chaque puits 100µl de HRP IgG conjugate, cette solution contenant des anticorps reconnaissant les anticorps anti-CarP et se fixant à eux. Ces anticorps de détection sont couplés à une enzyme HRP (horseradish peroxidase).

- nous avons fait incuber pendant 30 minutes à la lumière du jour et les plaques ont été lavées. Seuls les anticorps de détection fixés à des anticorps anti-Carp restent fixés.

Etape 4 : révélation des anticorps de détection fixés grâce à une réaction enzymatique

- nous avons ensuite ajouté dans chaque puits 100 µl du TMB Chromogen (3,3',5,5 ;-tetramethylbenzidine), cette solution correspondant au substrat de l'enzyme HRP couplée aux anticorps de détection (étape 4a). L'enzyme HRP va transformer, si elle est présente, son substrat en produit de réaction détectable grâce à l'apparition d'une coloration bleue.

- les plaques ont incubé 30 minutes dans le noir.

- enfin nous avons ajouté dans chaque puits 100 µl de HRP Stop Solution afin de figer la réaction enzymatique et donc de figer la coloration (étape 4b).

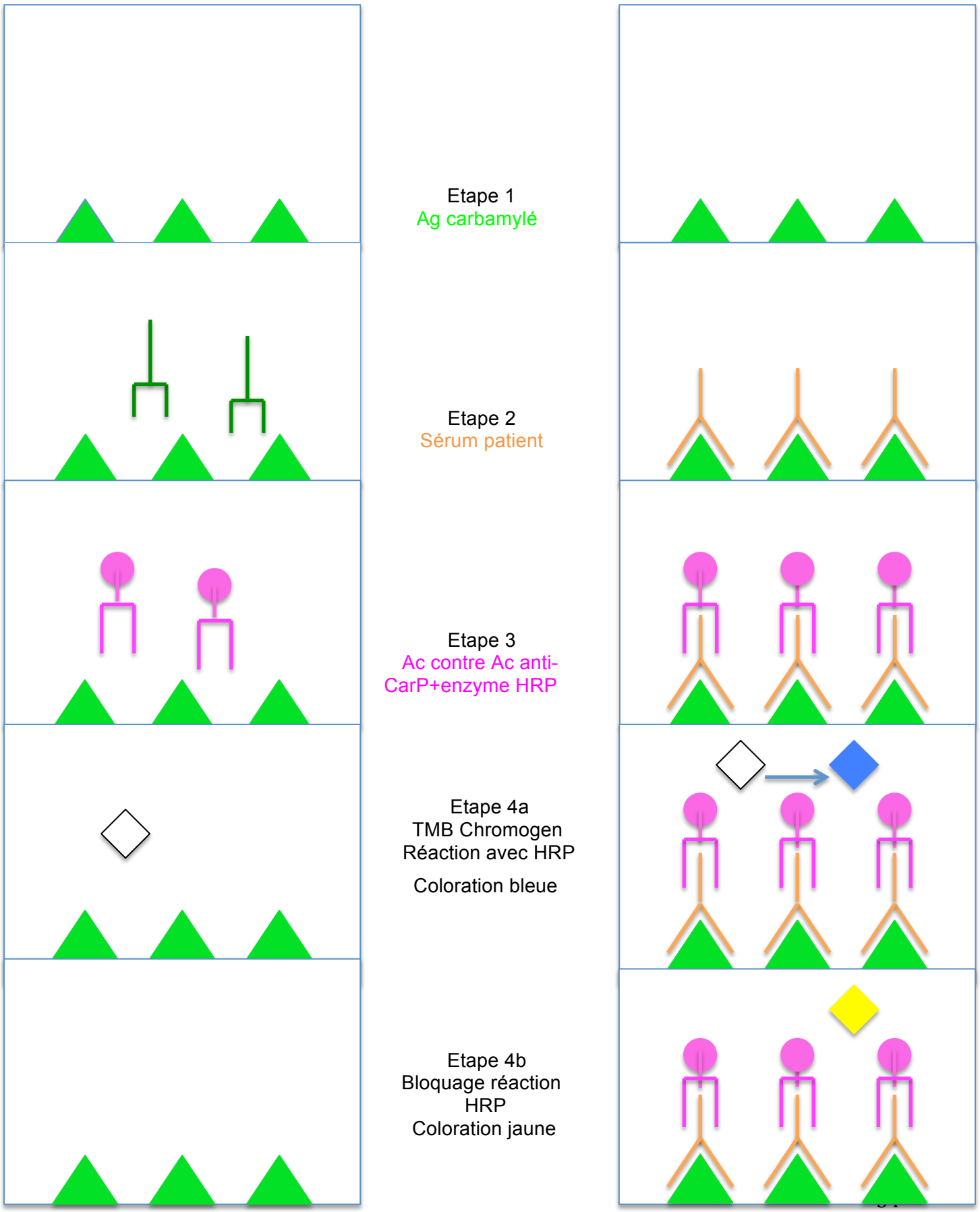
- les plaques ont incubé encore une fois 30 minutes dans le noir. La couleur devient donc jaune si une réaction enzymatique avait eu lieu auparavant.

- l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente et donc à la concentration en anticorps recherchés.

Nous avons ensuite procédé à la lecture des puits (1heure maximum après avoir stoppé la réaction). Les plaques ont été lues à 450nm grâce au spectrophotomètre (Varioskan Flash) pour transformer les valeurs d'absorbance en unités arbitraires par millilitres (UA/ml).

2.3.2. Illustrations *(Figure 9 et Photo)*

PATIENT 1 (-) **PATIENT 2 (+)**



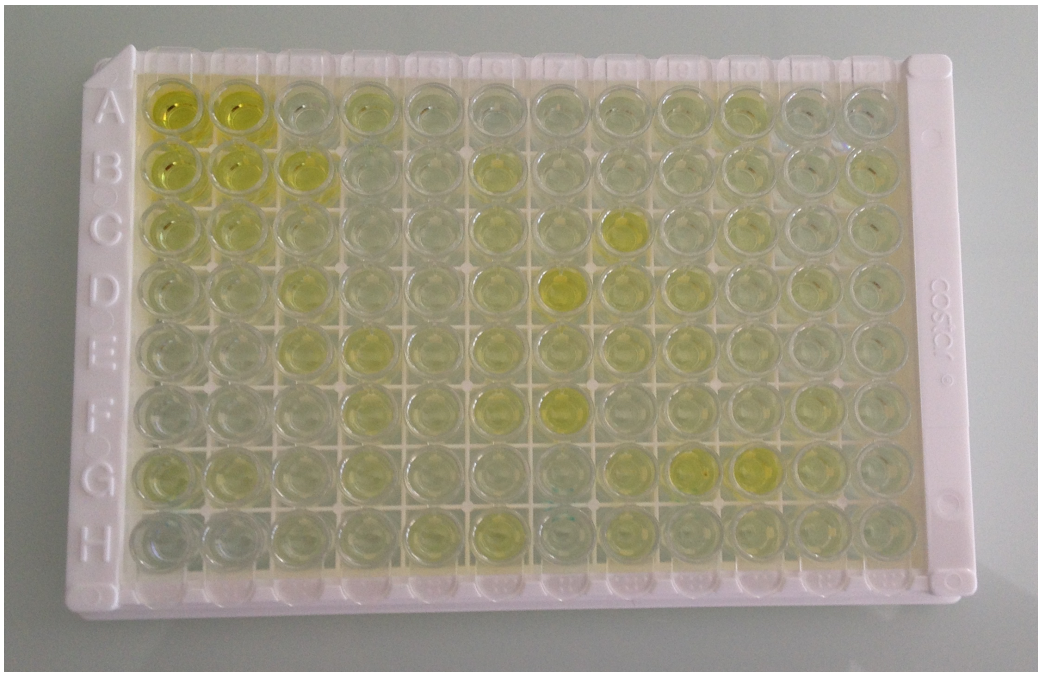


Photo 1 : Exemple de plaque obtenue après réalisation de l'ensemble des manipulations

La disposition est conforme à celle détaillée dans le tableau ci-dessus (*Tableau 2*). Sur les deux premières colonnes, on peut noter un dégradé de jaunes de A à F, du plus foncé au plus clair, correspondant à des concentrations décroissantes d'anticorps anti-CarP. Les deux premières colonnes de la ligne G correspondent au Low Positive Control et celles de la ligne H au diluent qui apparaît donc transparent. On peut observer au sein de cette plaque :

- des puits transparents correspondant à des sérums de patients ne contenant pas d'anticorps anti-CarP
- des puits jaunes correspondant à des sérums contenant des anticorps anti-CarP, les concentrations étant différentes selon l'intensité du jaune.

2.3.3. Résultats

Pour chaque plaque nous obtenions les résultats sous la forme suivante :

- une courbe de titration réalisée grâce aux Calibrators, avec un coefficient de corrélation stable aux alentours de 0,999 pour chaque courbe (*Figure 10*)
- les valeurs d'absorbance totale
- les valeurs après soustraction de l'absorbance due au FcS
- les valeurs transformées en unité arbitraire (UA/ml) selon cette courbe de titration.

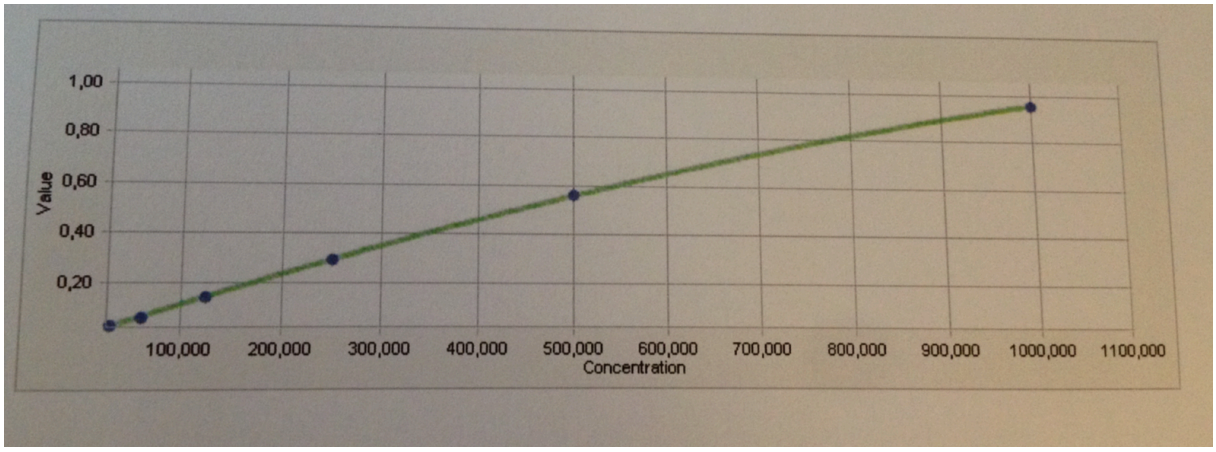


Figure 10 : courbe de titration réalisée avec les échantillons des Calibrators

2.3.4. Calcul du seuil de positivité

Pour déterminer le seuil de positivité des anticorps anti-CarP nous avons utilisé le Low Positive Control (LPC) fourni par le laboratoire . Le LPC correspond à la concentration seuil permettant d'affirmer la présence (si la concentration du sérum testé S était supérieure à la concentration du LPC) ou l'absence d'anticorps anti-CarP (si la concentration du sérum testé S était inférieure). Pour chaque plaque le seuil de positivité a été calculé en faisant la moyenne des deux LPC. Ainsi, un seuil différent a donc été utilisé pour chaque plaque.

2.4. Objectifs

2.4.1. Objectif primaire

L'objectif principal de l'étude est de connaître la prévalence des anticorps anti-CarP et leur répartition au sein des différentes populations de patients au vu de leur statut anti-CCP et FR dans la cohorte ESPOIR.

2.4.2. Objectifs secondaires

Le but est de connaître les caractéristiques clinique, biologique, radiographique et thérapeutique associées aux anticorps anti-CarP, et d'évaluer leur caractère prédictif dans le développement ultérieur d'une PR.

Enfin, nous souhaitons étudier le lien entre ces anticorps et le tabagisme, l'insuffisance rénale, les facteurs de risque cardio-vasculaires et les évènements cardio-vasculaires. Car, du fait de la physiopathologie de la carbamylation et de son importance dans l'athérosclérose et l'insuffisance rénale, il nous a semblé important de vérifier si cette modification post-traductionnelle était liée à ces évènements chez les patients atteints de PR.

Dans nos analyses, nous avons comparé les patients avec anticorps anti-CarP positifs versus anti-CarP négatifs, mais aussi différentes associations d'anticorps.

En conclusion, notre étude pourrait avoir un impact important pour plusieurs raisons. L'effectif de notre cohorte, comportant 720 patients, est un des effectifs les plus importants dans cette littérature. La cohorte étudiée est une cohorte de polyarthrites récentes, population intéressante en pratique clinique, avec un suivi longitudinal sur 10 ans permettant une analyse exhaustive. Enfin, nous avons étudié des éléments globalement peu abordés et même nouveaux, en lien avec ces anticorps (activité de la maladie, facteurs de risque et évènements cardio-vasculaires, insuffisance rénale, analyse approfondie de différentes associations d'anticorps). Tous ces éléments permettraient donc de compléter la littérature existante et d'apporter des informations nouvelles.

3. Anti-carbamylated protein antibodies are present in patients with early arthritis and are associated with disease activity and radiological damages

INTRODUCTION

Rheumatoid factor (RF) and anti-citrullinated protein antibodies (anti-CCP) are currently used, in routine, for the diagnosis of rheumatoid arthritis (RA) (1). However a substantial number of seronegative RA remains, with a diagnosis made based on clinical characteristics. For this population of patients, new biomarkers would make the identification easier and would help with their management, refining their prognosis.

Recently, a new autoantibody family with antibodies directed against carbamylated protein (anti-CarP antibodies) have been identified in RA patients (2). Carbamylation is a post-translational modification in which lysine is chemically converted into homocitrulline under the influence of cyanate. In the organism, cyanate is in equilibrium in low concentration with urea, in physiologic conditions. Carbamylation is caused by an increased concentration of cyanate (increase of urea concentration, inflammation, smoking) (3). Presence and involvement of carbamylated proteins in atherogenesis and renal failure has been highlighted (3)(4)(5).

Anti-CarP antibodies have been recently described in RA. These antibodies are present in both anti-CCP positive and anti-CCP negative RA with a total prevalence ranging from 30% to 49% depending on studies (2)(6)(7)(8)(9).

They appear before the first symptoms and are predictive of future development of RA both in patients with arthralgia (10) and in apparently healthy blood donors (9)(11). Moreover, these anti-CarP antibodies are associated with more severe clinical disease when associated with ACPA1 (7) and with radiological progression (2)(7)(9). Finally, they seem to be specific for RA (6)(11). Further studies are still needed to confirm these associations.

Therefore, the main goal of the present study was to test the French national cohort of recent arthritis for the presence of anti-CarP antibodies with identification of patient clusters according to the antibody status for RF, anti-CCP and anti-CarP. The second goal

was to evaluate the association between anti-CarP antibodies and disease activity, biological data, radiographic data, therapeutic data, renal failure, cardiovascular risk factors and events, and development of RA, by itself or in combination with RF and anti-CCP.

METHODS

Study population

The ESPOIR cohort (Etude et Suivi des Polyarthrites Indifférenciées Récentes) is a French National, multicentre, longitudinal prospective cohort of early arthritis (12). The cohort was constituted by asking general practitioners and rheumatologists to refer patients with early arthritis to one of the 14 university hospitals participating in the ESPOIR project. 813 patients were included between December 2002 and March 2005.

Inclusion criteria were : age between 18 and 70, clinical diagnosis of RA as certain or probable or clinical diagnosis of undifferentiated arthritis potentially becoming RA, at least 2 swollen joints since 6 weeks and less than 6 months, no prescription of DMARDS or corticoids (except if less than 2 weeks or as an intra-articular injection less than 4 weeks before inclusion). Exclusion criteria were the other inflammatory rheumatisms or connective tissue diseases clearly determined according to usual criteria.

Every patient was seen every 6 months during the first 2 years then every year for a follow-up of at least 10 years. The protocol was approved by French authorities in July 2002 and all patients signed an informed consent. The scientific committee of the cohort accepted our project and we obtained sera at 6 months after inclusion and data from patients including demographic, clinic, biologic, radiographic and therapeutic data at baseline and at 96 months after inclusion.

Detection of anti-CarP antibodies

For IgG anti-CarP antibodies detection in sera, we used an ELISA test, developed by Inova Diagnostics (Boston) as described by Shi and al. (2). The ELISA test was performed following the manufactor's instructions. Plates were pre-coated with carbamylated fetal calf serum (FcS). We tested patients sera, diluted at 1:101. Anti-CarP levels were expressed in arbitrary units (UA/ml). The cut-off value for positivity was determined, for each plate, by calculating the mean of both Low Positive Controls values.

Analysed data

We collected patients characteristics from the ESPOIR cohort database. Clinical data retained were : gender, age, weight, body mass index, disease activity assessment by DAS28-ESR (erythrocyte sedimentation rate) at baseline, symptoms duration, type of beginning symptoms, smoking and alcoholism at baseline, diabetes, hypertension, dyslipidemia, myocardial infarction, and cerebrovascular disease at baseline and 8 years. Biological data collected at baseline were : ESR (mm at first hour, positivity was determined by ESR>10), C reactive protein (CRP, mg/l, positivity was determined by CRP>5), RF (UI/ml, positivity was determined in each center), anti-CCP antibodies (UI/ml, positivity was determined in each center) and creatinine (mmol/l). Radiological data collected were : presence or absence of erosion joints at baseline and at 8 years (M96), Sharp score at baseline. Therapeutic data collected were : use of DMARDs (disease modifying anti-rheumatic drugs) at 8 years. Final diagnosis of RA was validated if patients fulfilled the ACR/EULAR 2010 criteria at least once over the 8 years.

Statistical analysis

Quantitative variables were presented as mean with their standard deviation (as well as median with interquartile range), and qualitative variables as percentages. To compare anti-CarP+ and anti-CarP- groups in the whole population and in each cluster, chi-2 test was used for qualitative variables and Student's t-test for quantitative variables. Non parametric correlation analyses were performed using a Spearman correlation test. Odds ratios with their 95% confidence intervals were also estimated. All analyses were performed using STATA 13.1 software. P-values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Population characteristics

We analysed the sera for anti-CarP status for 720 ESPOIR patients collected at 6 months.

The baseline characteristics of the 720 patients were described in *Table 1*. Among the 720 patients, 711 had available datas for all antibodies (RF, anti-CCP and anti-CarP). Among the 720 patients, 663 had available datas for ACR criteria. 96.2% of these patients fulfilled the ACR 2010 criteria for RA at least once over the 8 years (638/663).

Table 1 : Baseline characteristics of the 720 patients with early arthritis

	ESPOIR cohort, n=720
Age, years, mean+/-SD	48,2+/-12,5
Sex, female, n (%)	547 (76)
Duration of symptoms, days, median (IQR)	147 (124.25)
BMI, mean+/-SD (n=718)	25+/-4.6
DAS28-ESR, mean+/-SD (n=708)	5,1+/-1.3
IgM-RF positive, n (%) (n=711)	297 (41.8)
Anti-CCP positive, n (%) (n=711)	273 (38.4)
IgM-RF negative and anti-CCP negative, n (%) (n=711)	356 (50.1)

SD, standard deviation ; IQR, interquartile range ; BMI, body mass index ; IgM-RF, IgM rheumatoid factor ; anti-CCP, anti-cyclic citrullinated peptid antibodies ; n, patients with available data

Prevalence of anti-CarP antibodies, association with anti-CCP and RF

Anti-CarP antibodies were detected in sera of 32.6% of ESPOIR patients at 6 months (235/720). The demographic characteristics at baseline of anti-CarP+ and anti-CarP- patients were comparable and described in *Table 2*.

Table 2 : Baseline characteristics according to the presence of anti-CarP

	Anti-CarP+ (n=235)	Anti-CarP- (n=485)	*p*
Age, years, mean+/-SD	47.3+/-11.9	48.6+/-12.7	NS
Sex, female, n (%)	181 (77)	366 (75.5)	NS
Duration of symptoms, days, median (IQR)	143 (112.5)	150 (129)	NS
BMI, mean+/-SD	25.1+/-4.6 (n=234)	24.9+/-4.6 (n=484)	NS

SD, standard deviation ; IQR, interquartile range ; BMI, body mass index ; Anti-CarP, anti-carbamylated protein antibodies ; NS : non significative difference

The percentage of positivity of each antibody was resumed in *Figure 1* : 41.8% were RF+, 38.4% were anti-CCP+ and 32.3% were anti-CarP+ (considering patients with available data for all antibodies, ie 711 patients).

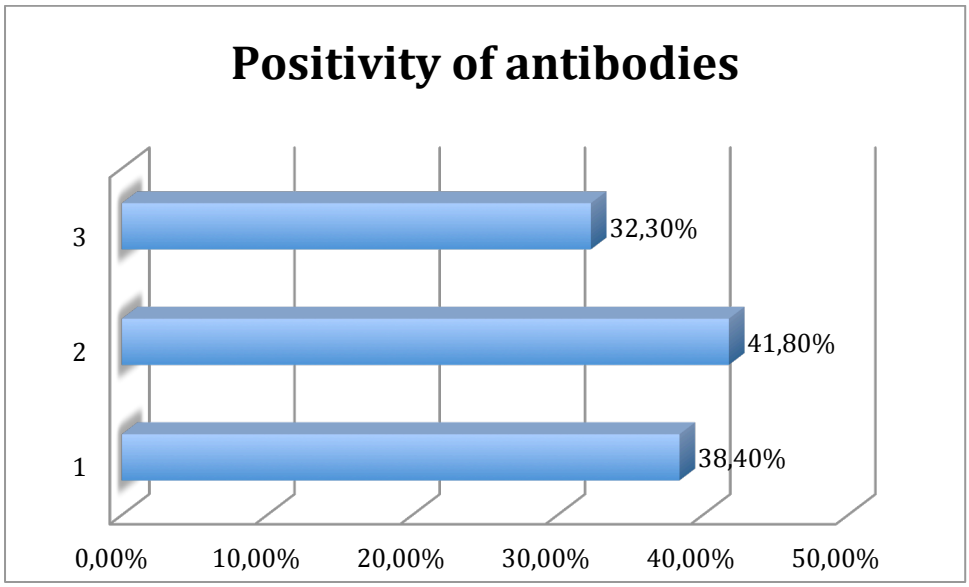


Figure 1 : Antibodies positivity in 711 patients (patients with complete available data).
1: anti-CCP= 38.4% (273/711), 2: RF-IgM=41.8% (297/711), 3: anti-CarP antibodies=32.3% (230/711)
Anti-CCP, anti-cyclic citrullinated peptid antibodies ; RF-IgM, rheumatoid factor IgM; anti-CarP, anti-carbamylated proteins antibodies

Anti-CarP antibodies were detected both in anti-CCP+ and anti-CCP- patients and in RF+ and RF- patients (*Figure 2A et 2B*). There were significantly more anti-CarP+ patients in anti-CCP+ than in anti-CCP- group (41.8% versus 26.5%, OR=1.990 [1.425-2.778], p<0.0001). There were significantly more anti-CarP+ in RF+ than in RF- patients (42.1% versus 25.4%, OR=2.139[1.534-2.982], p=<0.0001).

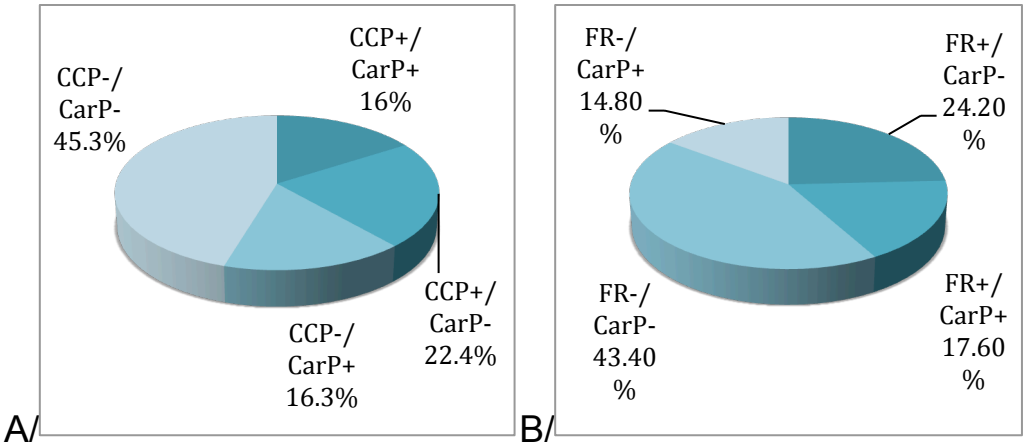


Figure 2 : anti-CarP antibodies repartition according to anti-CCP and RF positivity.
A/Relative distribution (in percentage) of the combinations of positivity and negativity of anti-CarP and anti-CCP antibodies illustrated by pie charts.
B/Relative distribution (in percentage) of the combinations of positivity and negativity of anti-CarP and RF antibodies illustrated by pie charts.
CarP, anti-carbamylated protein antibodies ; CCP, anti- cyclic citrullinated peptid antibodies; FR, rheumatoid factor IgM

Among the 711 patients with available data for all antibodies, anti-CarP antibodies were present in 23.6% of double seronegative patients (RF negative and anti-CCP negative) and among these 711 patients, 11.8% are single positive for anti-CarP antibodies. Frequence of single-positive, double-positive and triple-positive in these 711 patients were reported in *Figure 3*.

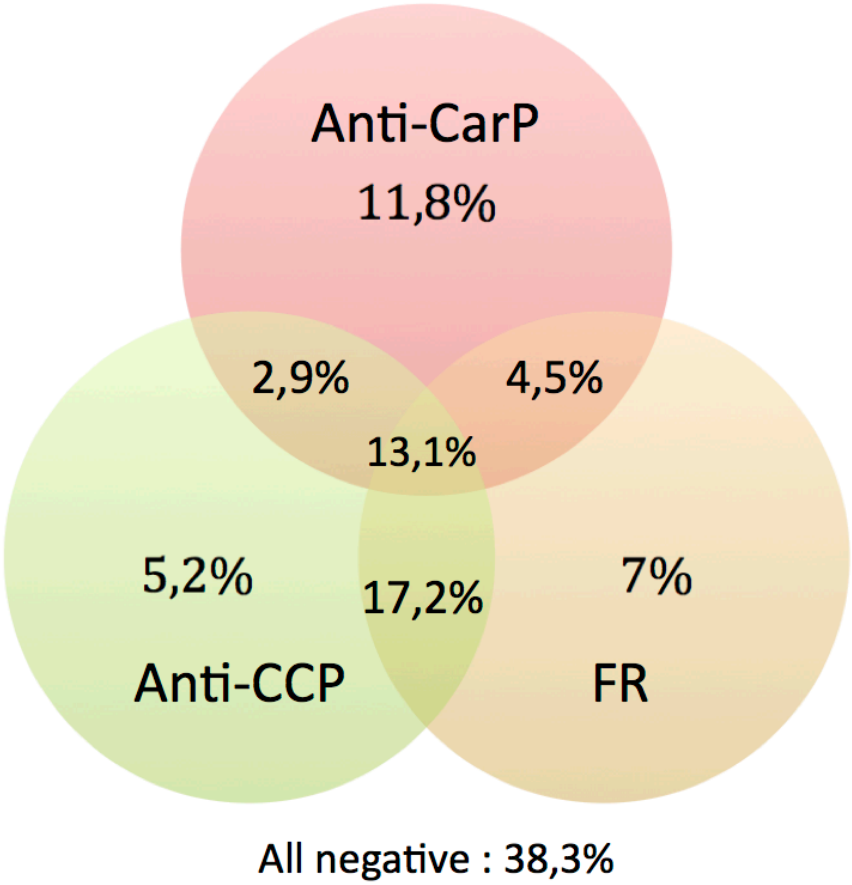


Figure 3 : Distribution of antibodies in ESPOIR cohort (available data for 711 patients).
Anti-CarP, anti-carbamylated protein antibodies ; FR, rheumatoid factor ; anti-CCP, anti-cyclic citrullinated peptid antibodies

RA characteristics in anti-CarP- versus anti-CarP+ patients

Among our population of patients with early arthritis, anti-CarP+ and anti-CarP- presented differences in their clinical, biological and radiological features (*Table 3*).

Briefly, anti-CarP positivity was associated with a more active disease at baseline as measured by the mean of DAS28-ESR (4.977 [4.860-5.094] versus 5.342 [5.180-5.504], p=0.0004) *(Figure 4)*. More precisely, the distribution in the different DAS subgroups was also significantly different (p=0.009) with, in class 1 (DAS<3.2), more anti-CarP- patients (9.7 versus 3.4%) *(Figure 5).* Moreover, there was more positive CRP and/or ESR in patients with anti-CarP+ than in anti-CarP- (p=0.049 and p=0.002 respectively). Anti-CarP positivity was also associated with more radiological damages at 96 months as measured by the presence or absence of erosions (55.6% versus 37.3%, OR=2.101[1.166-3.793], p=0.008) *(Figure 6)*.

Interestingly, there was no link between anti-CarP positivity and renal failure, use of DMARD or cardio-vascular history. There was no correlation either between anti-CarP levels and levels of DAS28-ESR, CRP, ESR and SharP score.

For the RA diagnosis, 95% of anti-CarP- patients fulfilled ACR criteria against 98.6% of anti-CarP+ (p=0.022) *(Figure 8).* Sensibility and specificity of anti-CarP antibodies were respectively of 34 and 88%. Positive predictive value and negative predictive value of anti-CarP antibodies were respectively of 98.6 and 5%.

RA characteristics in anti-CCP+/anti-CarP- versus anti-CCP+/anti-CarP+ patients

Among the 273 anti-CCP+ patients, 41.8% were double positive and 58.2% were anti-CCP+/anti-CarP- (*Table 4*). Double positive patients had a more active disease as measured by the mean of DAS28-ESR at baseline (5.131 [4.924-5.338] versus 5.442 [5.221-5.664], p=0.0465) *(Figure 4)*. Moreover, the distribution in different DAS categories was also

different (p=0.010) with, in class 1 (DAS<3.2), significantly more anti-CCP+/anti-CarP- patients (9.8 versus 0.9%) *(Figure 5) .*

There was no significant difference between both populations for radiologic damages at 96 months as measured by the presence or absence of erosions (56.1% versus 59.2%, OR=1.135 [0.522-2.483], p=0.730) (*Figure 6*). However, anti-CCP+/anti-CarP- patients had a significantly more severe radiological profile at inclusion (45.1% versus 28.8%, OR=0.493[0.283-0.854], p=0.007) *(Figure 7).*

Regarding the cardio-vascular risk factors, there were significantly more diabetics patients at 96 months in anti-CCP+/anti-CarP+ than in anti-CCP+/anti-CarP- (10.8% versus 3%, (OR=3.892 [1.035-17.789], p=0.019). There was no link between double positivity of anti-CCP and anti-CarP and renal failure, use of DMARD or cardio-vascular history.

Sensibility and specificity of anti-CarP antibodies on anti-CCP+ group were respectively of 41.9 and 75%. Positive predictive value and negative predictive value of anti-CarP antibodies on this group were respectively of 99.1 and 1.9%.

RA characteristics in RF+/anti-CCP-/anti-CarP- versus RF+/anti-CCP-/anti-CarP+ patients

Among the 82 patients RF+/anti-CCP-, 39% were anti-CarP+ (*Table 5*). Patients with RF+/anti-CCP-/anti-CarP+ had a significantly more active disease at baseline than patients with RF+/anti-CCP-/anti-CarP– as measured by the mean of DAS28-ESR (4.876 [4.510-5.241] versus 5.682 [5.265-6.099], p=0.005) *(Figure 4)*. The distribution in the different DAS categories was also significantly different (p=0.020) with, in class 1 (DAS<3.2) and in class 2 (3.2<DAS<5.1), more RF+/anti-CCP-/anti-CarP– patients (12.2 versus 0% and 49 versus 34.4%) and in class 3 (DAS>5.1) more RF+/anti-CCP-/anti-CarP+ patients (65.6 versus 38.8%) *(Figure 5).* Moreover, RF+/anti-CCP-/anti-CarP+ had more frequently positive ESR at baseline than RF+/anti-CCP-/anti-CarP– (p=0.022).

There was no significant difference between both populations for radiologic damages at 96 months as measured by the presence or absence of erosions (p=0,235) (*Figure 6*).

Interestingly, no link was found between positivity of anti-CarP in RF+/anti-CCP- patients and renal failure, use of DMARD or cardio-vascular history.

In both groups, all patients fulfilled ACR 2010 criteria.

RA characteristics in RF-/anti-CCP-/anti-CarP- versus RF-/anti-CCP-/anti-CarP+ patients

Among the 356 patients RF-/antiCCP-, 23.6% were anti-CarP positive (*Table* 6). Patients with RF-/anti-CCP-/anti-CarP+ had the same disease activity than patients with RF-/anti-CCP-/anti-CarP– as measured by the mean of DAS28-ESR at baseline (p=0,188).

There was no link between positivity of anti-CarP antibodies in RF-/anti-CCP- patients and radiological damages at 96 months (p=0,077).

In this same subgroup of patient, we did not find any association between anti-CarP antibodies positivity and renal failure, use of DMARD or cardio-vascular history.

Sensibility and specificity of anti-CarP antibodies on RF-/anti-CCP- group were respectively of 24.4 and 90.5%. Positive predictive value and negative predictive value of anti-CarP antibodies on this group were respectively of 97.2 and 8.1%.

Table 3 : Comparison of anti-CarP negative vs anti-CarP positive patients (n=720)

	Anti-CarP- (n=485)	Anti-CarP+ (n=235)	OR [95% CI]	p value
Clinic				
-Beginning ,n (%)				0.955
1:explosive	111/485 (22.9%)	51/235 (21.7%)		
2:subacute	126/485 (26%)	64/235 (27.2%)		
3:insidious	205/485 (46.3%)	101/235 (43%)		
4:paroxystic	43/485 (8.9%)	19/235 (8.1%)		
-DAS28VS t0 (n=708)				
Mean, [95%CI]	4.977[4.860-5.094] (n=476)	5.342[5.180-5.504] (n=232)		0.0004*
Class, n (%)				0.009*
<3,2	46/476 (9.7%)	8/232 (3.4%)		
3,2< <5,1	206/476 (43.3%)	99/232 (42.7%)		
>5,1	224/476 (47%)	125/232 (53.9%)		
Biology				
-CRP t0 (n=708)				
Mean, [95%CI]	20.519[17.426-23.611] (n=476)	25.103[21.007-29.200] (n=232)		0.088
Positivity, n (%)	303/476 (63.6%)	165/232 (71.1%)	1.406[0.989-2.009]	0.049*
-ESR t0 (n=711)				
Mean, [95%CI]	28.408[26.197-30.618] (n=478)	31.661[28.519-34.803] (n=233)		0.097
Positivity, n (%)	360/478 (75.3%)	199/233 (85.4%)	1.918[1.245-3.010]	0.002*
Radiology				
-Erosive t0, n (%) (n=689)	160/462 (34.6%)	75/227 (33%)	0.931[0.655-1.320]	0.679
-Erosive M96, n (%) (n=257)	69/185 (37.3%)	40/72 (55.6%)	2.101[1.166-3.793]	0.008*
-Sharp t0, mean[95%CI] (n=689)	5.074[4.445-5.702] (n=462)	5.092[4.076-6.109] (n=227)		0.974
Treatment				
-DMARD M96, n (n=480) (%)	250/336 (74.4%)	118/144 (81.9%)	1.561[0.938-2.659]	0.073
Renal				
-Renal failure t0, n (%) (n=710)	28/478 (5.9%)	13/232 (5.6%)	0.954[0.444-1.948]	0.892
Cardio-vascular				
-Risk factors t0, n (%)				
Smoking	235/485 (48.4%)	112/235 (47.7%)	0.969[0.700-1.339]	0.842
Alcohol	97/485 (20%)	39/235 (16.6%)	0.796[0.514-1.217]	0.274
Hypertension	81/485 (16.7%)	36/235 (15.3%)	0.902[0.570-1.407]	0.637
Hyperchol.	81/485 (16.7%)	33/235 (14%)	0.815[0.508-1.285]	0.360
Hypertrigly.	17/485 (3.5%)	7/235 (3%)	0.845[0.292-2.182]	0.712
Diabetes	17/485 (3.5%)	12/235 (5.1%)	1.481[0.633-3.350]	0.306
-Risk factors M96, n (%) (n=476)				
Hypertension	110/332 (33.1%)	37/144 (25.7%)	0.698[0.437-1.102]	0.107
Hyperchol.	133/332 (40.1%)	49/144 (34%)	0.772[0.501-1.183]	0.213
Hypertrigly.	53/332 (16%)	21/144 (14.6%)	0.899[0.493-1.593]	0.703
Diabetes	21/332 (6.3%)	13/144 (9%)	1.470[0.655-3.180]	0.293
-Events t0 , n (%)				
Myocardial i.	6/485 (1.2%)	1/235 (0.4%)	0.341[0.007-2.848]	0.298
Cerebral.	2/485 (0.4%)	2/235 (0.8%)	2.073[0.149-28.729]	0.458
-Events M96, n (%) (n=476)				
Myocardial i.	9/332 (2.7%)	4/144 (2.8%)	1.025[0.227-3.749]	0.967
Cerebral.	2/332 (0.6%)	4/144 (2.8%)	4.714[0.664-52.478]	0.051
Diagnosis				
-ACR, n (%) (n=663)	421/443 (95%)	217/220 (98.6%)		0.022*

OR, odds ratio ; anti-Carp, anti-carbamylated protein antibodies ; t0, inclusion ; M96, 96 months ; Dmard, disease modifying anti-rheumatic drug ; hyperchol.,hypercholesterolemia ; hypertrigly., hypertriglyceridemia ;Cerebral., stroke or ischemic attack transient; ACR, ACR 2010 criteria fulfilled at least once over the 8 years

Table 4 : Comparaison of anti-CCP+/anti-CarP- vs anti-CCP+/anti-CarP+ (n=273)

	CCP+CarP- (n=159)	CCP+CarP+ (n=114)	OR [95%CI]	p value
Clinic				
-Beginning, n (%)				0.552
1:explosive	39/159 (24.5%)	23/114 (20.2%)		
2:subacute	34/159 (21.4%)	32/114 (28.1%)		
3:insidious	67/159 (42.1%)	48/114 (42.1%)		
4:paroxystique	19/159 (18.2%)	11/114 (9.6%)		
-DAS28VS t0 (n=265)				
Mean [95%CI]	5.131[4.924-5.338] (n=153)	5.442[5.221-5.664] (n=112)		0.0465*
Class, n (%)				0.010*
<3,2	15/153 (9.8%)	1/112 (0.9%)		
3,2> >5,1	52/153 (34%)	45/112 (40.2%)		
>5,1	86/153 (56.2%)	66/112 (58.9%)		
Biology				
-CRP t0 (=269)				
Mean [95%CI]	23.237[17.146-29.328] (n=156)	28.327[21.992-34.663] (n=113)		0.262
Positivity, n (%)	114/156 (73.1%)	90/113 (79.6%)	1.442[0.781-2.703]	0.214
-ESR t0 (n=268)				
Mean[95%CI]	33.174[29.096-37.253] (n=155)	34.850[30.422-39.277] (n=113)		0.587
Positivity, n (%)	131/155 (84.5%)	104/113 (92%)	2.117[0.900-5.393]	0.064
Radiology				
-Erosive t0, n (%) (n=264)	69/153 (45.1%)	32/111 (28.8%)	0.493[0.283-0.854]	0.007*
-Erosive M96, n (%) (n=131)	46/82 (56.1%)	29/49 (59.2%)	1.135[0.522-2.483]	0.730
-Sharp mean[95%CIJ (n=264)	6.157[4.844-7.470]	5.315[3.845-6.786]		0.403
Treatment				
-Dmard M96, n (%) (n=218)	118/135 (87.4%)	76/83 (91.6%)	1.564[0.581-4.670]	0.341
Renal				
-Renal failure t0, n (%) (n=268)	5/156 (3.2%)	8/112 (7.1%)	2.323[0.647-9.259]	0.139
Cardio-vascular				
-Risk factors t0, n (%)				
Smoking	84/159 (52.8%)	57/114 (50%)	0.893[0.536-1.487]	0.644
Hypertension	27/159 (17%)	12/114 (10.5%)	0.575[0.253-1.245]	0.133
Alcohol	38/159 (23.9%)	20/114 (17.5%)	0.677[0.350-1.287]	0.205
Hyperchol.	25/159 (15.7%)	13/114 (11.4%)	0.690[0.308-1.485]	0.309
Hypertrigly.	3/159 (1.9%)	2/114 (1.7%)	0.929[0.076-8.246]	0.936
Diabetes	2/159 (1.3%)	5/114 (4.4%)	3.601[0.574-38.283]	0.107
-Risk factors M96, n (%) (n=215)				
Hypertension	39/132 (29.5%)	20/83 (24.1%)	0.757[0.381-1.475]	0.383
Hyperchol.	53/132 (40.1%)	25/83 (30.1%)	0.642[0.342-1.195]	0.136
Hypertrigly.	23/132 (17.4%)	10/83 (12%)	0.649[0.260-1.522]	0.287
Diabetes	4/132 (3%)	9/83 (10.8%)	3.892[1.035-17.789]	0.019*
-Events t0, n (%)				
Myocardial i.	1/159 (0.6%)	1/114 (0.1%)	1.398[0.018-110.436]	0.812
Cerebral	0	0		
-Events M96, n (%) (n=215)				
Myocardial i.	4/132 (3%)	3/83 (3.6%)	1.2[0.171-7.287]	0.814
Cerebral.	0/132 (0%)	2/83 (2.4%)		
Diagnosis				
-ACR, n (%) (n=269)	154/157 (98.1%)	111/112 (99.1%)		0.496

OR, odds ratio ; anti-Carp, anti-carbamylated protein antibodies ; CCP, anti-citrullinated peptid antibodies ; t0, inclusion ; M96, 96 months ; Dmard, disease modifying anti-rheumatic drug; hyperchol.,hypercholesterolemia ; hypertrigly., hypertriglyceridemia ;Cerebral., stroke or ischemic attack transient; ACR, ACR 2010 criteria fulfilled at least once over the 8 years

Table 5 : Comparison of RF+/anti-CCP-/anti-CarP- vs RF+/anti-CCP-/anti-CarP+(n=82)

	FR+CCP-CarP- (n=50)	FR+CCP-CarP+ (n=32)	OR [95%CI]	P value
Clinic				
-Beginning, n (%)				0.896
1:explosive	14/50 (28%)	7/32 (21.9%)		
2:subacute	13/50 (26%)	10/32 (31.2%)		
3:insidious	18/50 (36%)	11/32 (34.4%)		
4:paroxystique	5/50 (10%)	4/32 (12.5%)		
-DAS28VS t0				
Mean [95%CI] (n=81)	4.876[4.510-5.241] (n=49)	5.682[5.265-6.099] (n=32)		0.005*
Class, n (%)				0.020*
<3,2	6/49 (12.2%)	0/32 (0%)		
3,2> >5,1	24/49 (49%)	11/32 (34.4%)		
>5,1	19/49 (38.8%)	21/32 (65.6%)		
Biology				
-CRP t0				
Mean	23.347	25.375		0.201
Positivity, n (%) (n=81)	29/49 (59.2%)	23/32 (71.9%)	1.762[0.617-5.245]	0.244
-ESR t0				
Mean	29.918	33.906		0.122
Positivity, n (%) (n=81)	36/49 (73.5%)	30/32 (93.7%)	5.417[1.073-52.277]	0.022*
Radiology				
-Erosive M0, n (%) (n=78)	18/48 (37.5%)	11/30 (36.7%)	0.965[0.334-2.732]	0.941
-Erosive M96, n (%) (n=26)	6/19 (31.6%)	4/7 (57.1%)	2.889[0.346-25.470]	0.235
-Sharp t0, mean (n=78)	5.333	3.867		0.360
Treatment				
-Dmard M96, n (%) (n=58)	31/40 (77.5%)	15/18 (83.3%)	1.452[0.299-9.485]	0.612
Renal				
-Renal failure t0, n (%) (n=80)	6/49 (12.2%)	1/31 (3.2%)	0.239[0.005-2.158]	0.164
Cardio-vascular				
-Risk factors t0, n (%)				
Smoking	25/50 (50%)	13/32 (40.6%)	0.684[0.252-1.837]	0.406
Hypertension	5/50 (10%)	7/32 (21.9%)	2.52[0.608-11.069]	0.138
Alcohol	10/50 (20%)	6/32 (18.7%)	0.923[0.245-3.218]	0.890
Hyperchol.	10/50 (20%)	7/32 (21.9%)	1.12[0.317-3.757]	0.838
Hypertrigly.	2/50 (4%)	2/32 (6.2%)	1.6[0.110-23.025]	0.644
Diabetes, n	2/52 (3.8%)	2/32 (6.2%)	1.6[0.110-23.025]	0.644
-Risk factors M96 , n (%) (n=58)				
Hypertension	12/40 (30%)	7/18 (38.9%)	1.485[0.385-5.461]	0.505
Hyperchol.	17/40 (42.5%)	10/18 (55.6%)	1.691[0.479-6.053]	0.356
Hypertrigly.	8/40 (20%)	4/18 (22.2%)	1.143[0.215-5.172]	0.847
Diabetes	4/40 (10%)	3/18 (16.7%)	1.8[0.232-11.981]	0.471
-Events t0, n (%)				
Myocardial i.	1/50 (2%)	0/32 (0%)		
Cerebral.	0	0		
-Events M96, n (%) (n=58)				
Myocardial i.	1/40 (2.5%)	1/18 (5.6%)	2.294[0.028-184.601]	0.555
Cerebral.	0	0		
Diagnosis				
-ACR, n (%) (n=81)	49/49 (100%)	32/32 (100%)		

OR, odds ratio ; anti-Carp, anti-carbamylated protein antibodies ; CCP, anti-citrullinated peptid antibodies ; RF, rheumatoid factor ; t0, inclusion ; M96, 96 months ; Dmard, disease modifying anti-rheumatic drug ; hyperchol.,hypercholesterolemia ; hypertrigly., hypertriglyceridemia ;Cerebral., stroke or ischemic attack transient; ACR, ACR 2010 criteria fulfilled at least once over the 8 years

Table 6 : Comparison of RF-/anti-CCP-/anti-CarP- vs RF-/anti-CCP-/anti-CarP+(n=356)

	FR-CCP-CarP- (n=272)	FR-CCP-CarP+ (n=84)	OR [95%CI]	P value
Clinic				
-Beginning, n (%)				0.684
1:explosive	58/272 (21.3%)	21/84 (25%)		
2:subacute	77/272 (28.3%)	20/84 (23.8%)		
3:insidious	118/272 (43.4%)	39/84 (46.4%)		
4:paroxystique	19/272 (7%)	4/84 (4.8%)		
-DAS28VS t0				
Mean [95%CI] (n=353)	4.897[4.743-5.051] (n=270)	5.114[4.814-5.413] (n=83)		0.188
Class, n (%)				0.929
<3,2	24/270 (8.9%)	7/83 (8.4%)		
3,2> >5,1	130/270 (48.1%)	38/83 (45.8%)		
>5,1	116/270 (43%)	38/83 (45.8%)		
Biology				
-CRP t0 (n=350)				
Mean [95%CI]	18.563[14.854-22.273] (n=268)	21.610[14.911-28.309] (n=82)		0.433
Positivity, n (%)	159/268 (59.3%)	50/82 (61%)	1.071[0.628-1.843]	0.790
-VS t0 (n=353)				
Mean[95%CI]	25.426[22.648-28.204] (n=270)	26.976[21.419-32.533] (n=83)		0.603
Positivity, n (%)	189/270 (70%)	61/83 (73.5%)	1.188[0.666-2.174]	0.540
Radiology				
-Erosive t0, n (%) (n=339)	72/257 (28%)	29/82 (35.4%)	1.406[0.795-2.454]	0.205
-Erosive M96, n (%) (n=98)	16/83 (19.3%)	6/15 (40%)	2.792[0.702-10.235]	0.077
-Sharp t0, mean[95%CI](n=339)	4.389[3.662-5.116] (n=257)	4.463[3.057-5.869] (n=82)		0.923
Treatment				
-Dmard M96, n (%) (n=198)	99/158 (62.7%)	24/40 (60%)	0.894[0.417-1.958]	0.757
Renal				
-Renal failure t0, n (%) (n=353)	17/269 (6.3%)	2/84 (2.4%)	0.361[0.040-1.579]	0.163
Cardio-vascular				
-Risk factors t0, n (%)				
Smoking	125/272 (46%)	38/84 (45.2%)	0.971[0.576-1.634]	0.908
Hypertension	48/272 (17.6%)	15/84 (17.9%)	1.014[0.496-1.982]	0.965
Alcohol	49/272 (18%)	12/84 (14.3%)	0.758[0.348-1.548]	0.428
Hyperchol.	46/272 (16.9%)	13/84 (15.5%)	0.900[0.421-1.813]	0.757
Hypertrigly.	12/272 (4.4%)	3/84 (3.6%)	0.802[0.142-3.076]	0.737
Diabetes	13/272 (4.8%)	4/84 (7.4%)	0.996[0.230-3.343]	0.995
-Risk factors M96, n (%)(n=197)				
Hypertension	58/157 (36.9%)	9/40 (22.5%)	0.495[0.194-1.164]	0.085
Hyperchol.	62/157 (39.5%)	14/40 (35%)	0.825[0.368-1.792]	0.602
Hypertrigly.	22/157 (14%)	6/40 (15%)	1.083[0.333-3.040]	0.873
Diabetes	13/157 (8.3%)	1/40 (2.5%)	0.284[0.006-2.013]	0.204
-Events t0, n (%)				
Myocardial i.	4/272 (1.5%)	0/84 (0%)		
Cerebral.	2/272 (0.7%)	2/84 (2.4%)	3.293[0.234-45.883]	0.211
-Events M96, n (%) (n=197)				
Myocardial i.	4/157 (2.5%)	0/40 (0%)		
Cerebral.	2/157 (1.3%)	2/40 (5%)	4.079[0.284-57.387]	0.136
Diagnosis				
-ACR, n (%) (n=304)	214/233 (91.8%)	69/71 (97.2%)		0.120

OR, odds ratio ; anti-Carp, anti-carbamylated protein antibodies ; CCP, anti-citrullinated peptid antibodies ; RF, rheumatoid factor ; t0, inclusion ; M96, 96 months ; Dmard, disease modifying anti-rheumatic drug; hyperchol.,hypercholesterolemia ; hypertrigly., hypertriglyceridemia ;Cerebral., stroke or ischemic attack transient; ACR, ACR 2010 criteria fulfilled at least once over the 8 years

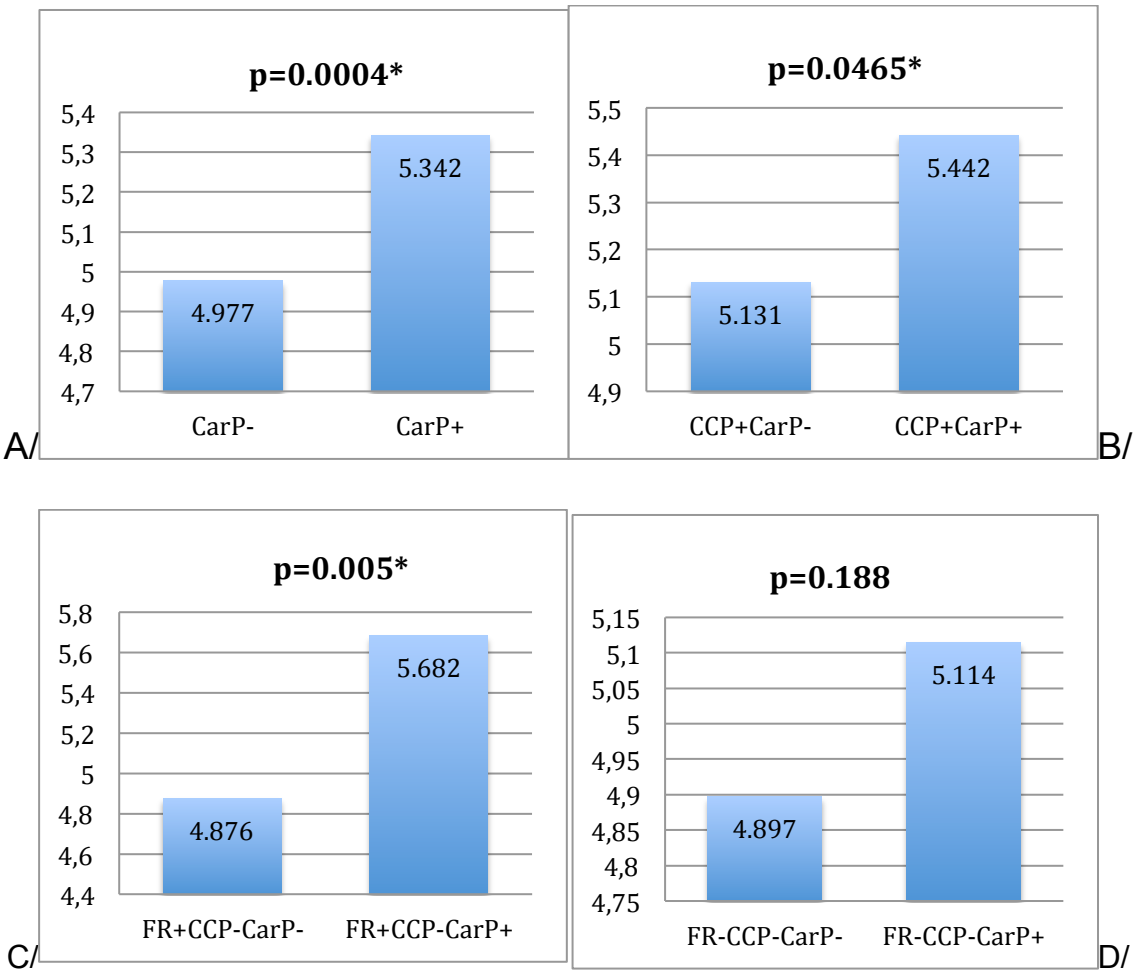


Figure 4: Mean of DAS28-ESR at baseline, results for each clusters according to the antibody status for FR, anti-CCP and anti-CarP, illustrated by histograms.
A/ Mean of DAS28-ESR in CarP- vs CarP+.
B/ Mean of DAS28-ESR in CCP+/CarP- vs CCP+/CarP+.
C/ Mean of DAS28-ESR in FR+/CCP-/CarP- vs FR+/CCP-/CarP+.
D/ Mean of DAS28-ESR in FR-/CCP-/CarP- vs FR-/CCP-/CarP+.
FR, rheumatoid factor ; CCP, anti-cyclic citrullinated peptid antibodies ; CarP, anti-carbamylated protein antibodies

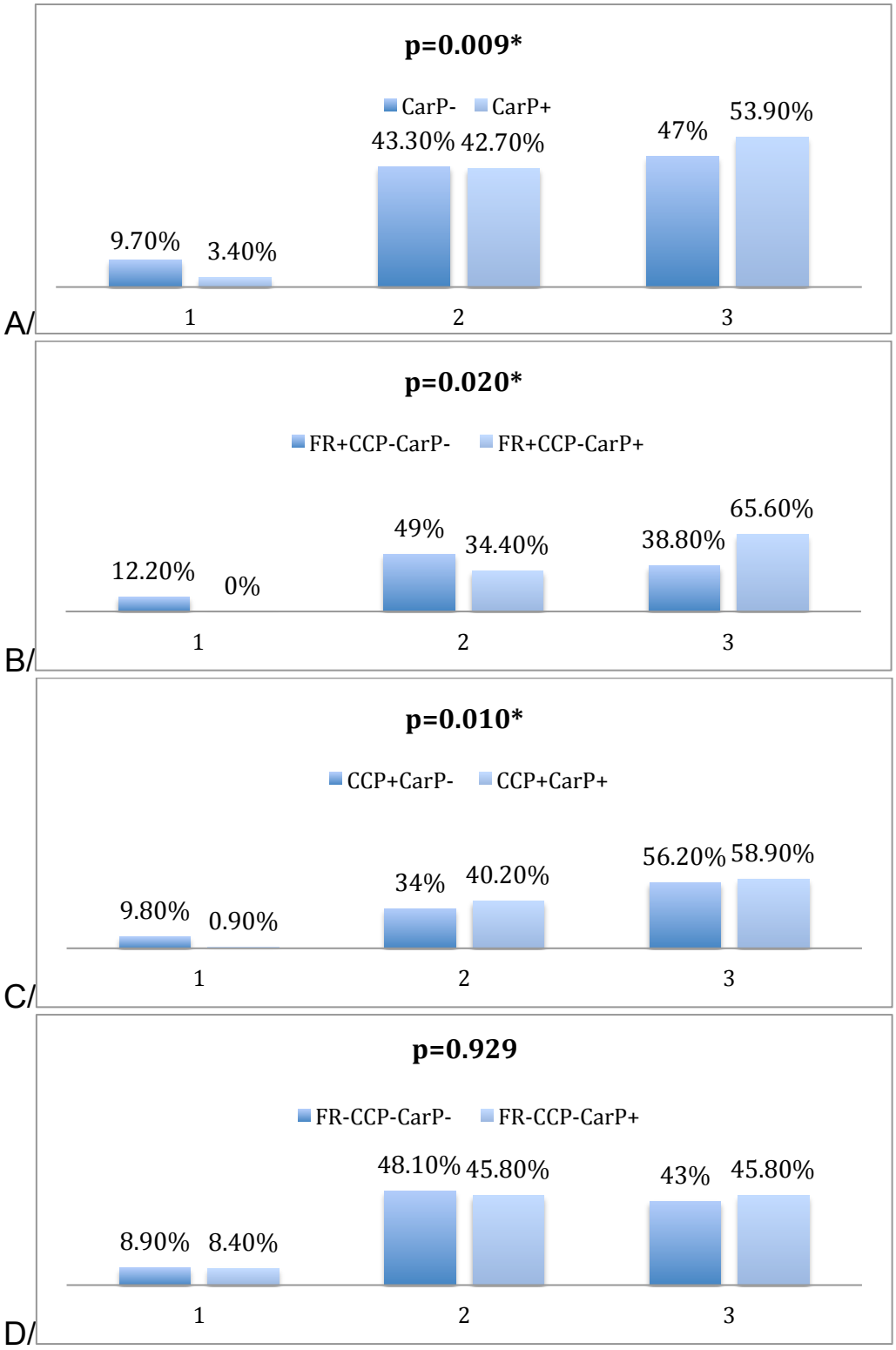


Figure 5 : Class of DAS28-ESR at baseline, results for each clusters according to the antibody status for FR, anti-CCP and anti-CarP, illustrated by histograms.
1 : DAS28ESR<3,2 ; 2 : 3,2≤DAS28ESR≤5,1 ; 3 : DAS28ESR>5,1
A/ Class of DAS28-ESR in CarP- vs CarP+.
B/ Class of DAS28-ESR in CCP+/CarP- vs CCP+/CarP+.
C/ Class of DAS28-ESR in FR+/CCP-/CarP- vs FR+/CCP-/CarP+.
D/ Class of DAS28-ESR in FR-/CCP-/CarP- vs FR-/CCP-/CarP+.

FR, rheumatoid factor ; CCP, anti-cyclic citrullinated peptid antibodies ; CarP, anti-carbamylated protein antibodies

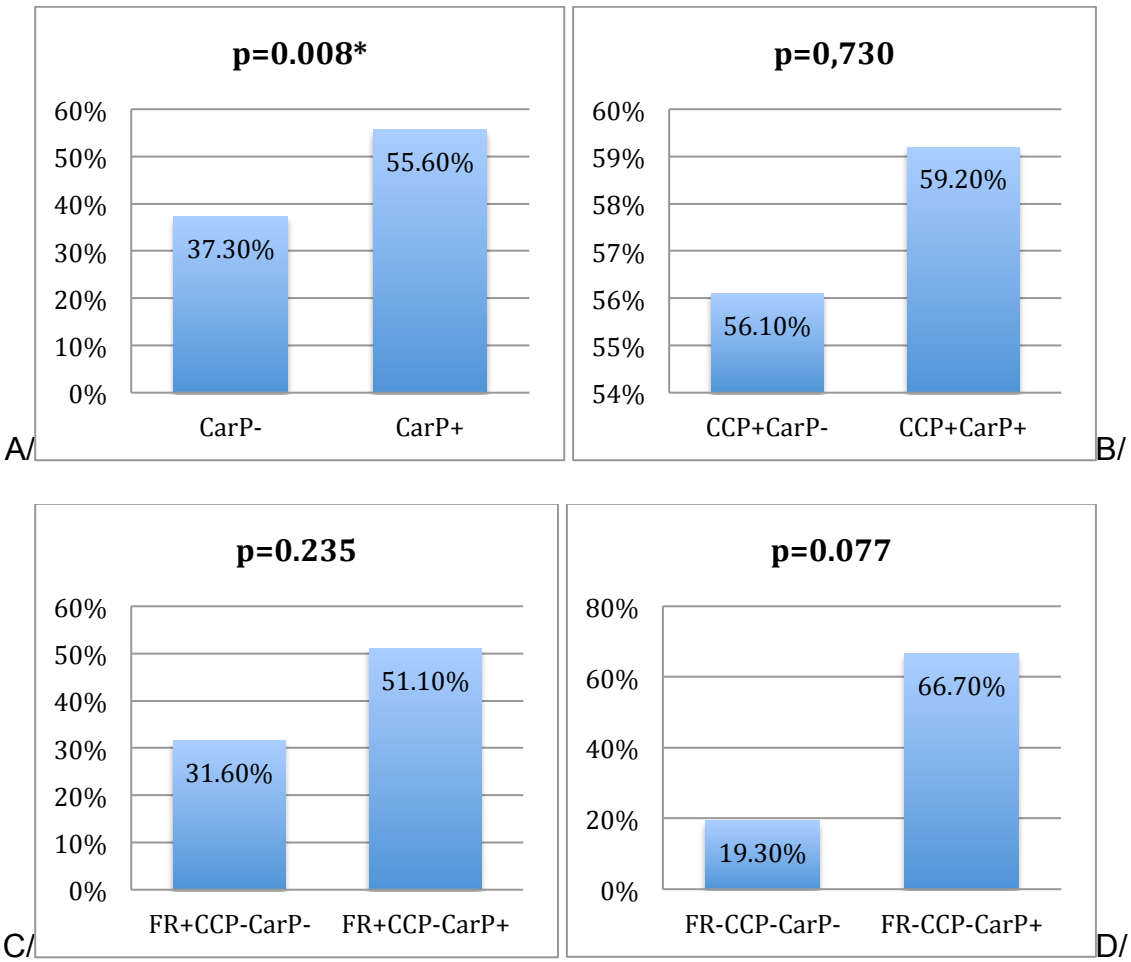


Figure 6 : Erosive or not at 96 months, results for each clusters according to the antibody status for FR, anti-CCP and anti-Carp, illustrated by histograms.
A/ Erosive or not at 96 months in CarP- vs CarP+.
B/ Erosive or not at 96 months in CCP+/CarP- vs CCP+/CarP+.
C/ Erosive or not at 96 months in FR+/CCP-/CarP- vs FR+/CCP-/CarP+.
D/ Erosive or not at 96 months in FR-/CCP-/CarP- vs FR-/CCP-/CarP+.
FR, rheumatoid factor ; CCP, anti-cyclic citrullinated peptid antibodies ; CarP, anti-carbamylated protein antibodies

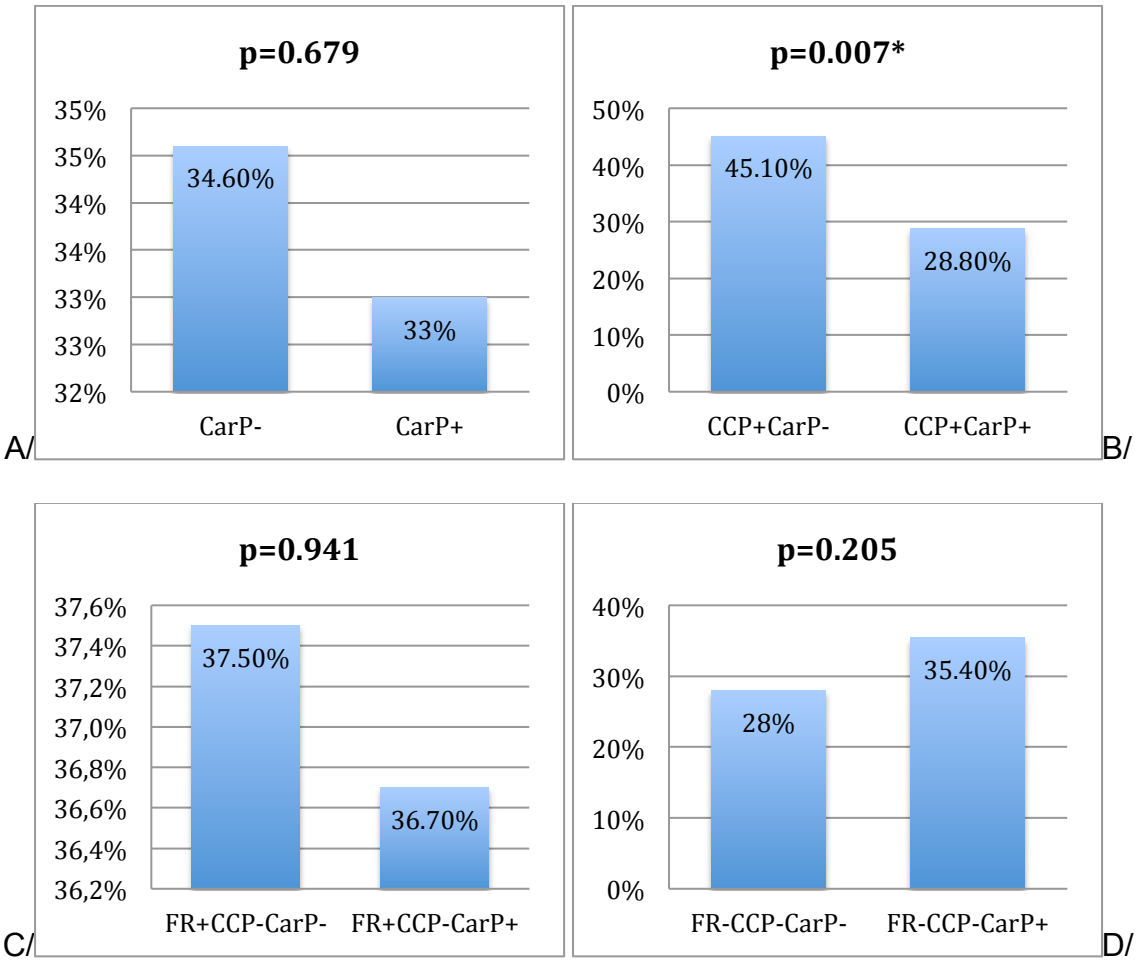


Figure 7 : Erosive or not at baseline, results for each clusters according to the antibody status for FR, anti-CCP and anti-Carp, illustrated by histograms.
A/ Erosive or not at baseline in CarP- vs CarP+.
B/ Erosive or not at baseline in CCP+/CarP- vs CCP+/CarP+.
C/ Erosive or not at baseline in FR+/CCP-/CarP- vs FR+/CCP-/CarP+.
D/ Erosive or not at baseline in FR-/CCP-/CarP- vs FR-/CCP-/CarP+.
FR, rheumatoid factor ; CCP, anti-cyclic citrullinated peptid antibodies ; CarP, anti-carbamylated protein antibodies

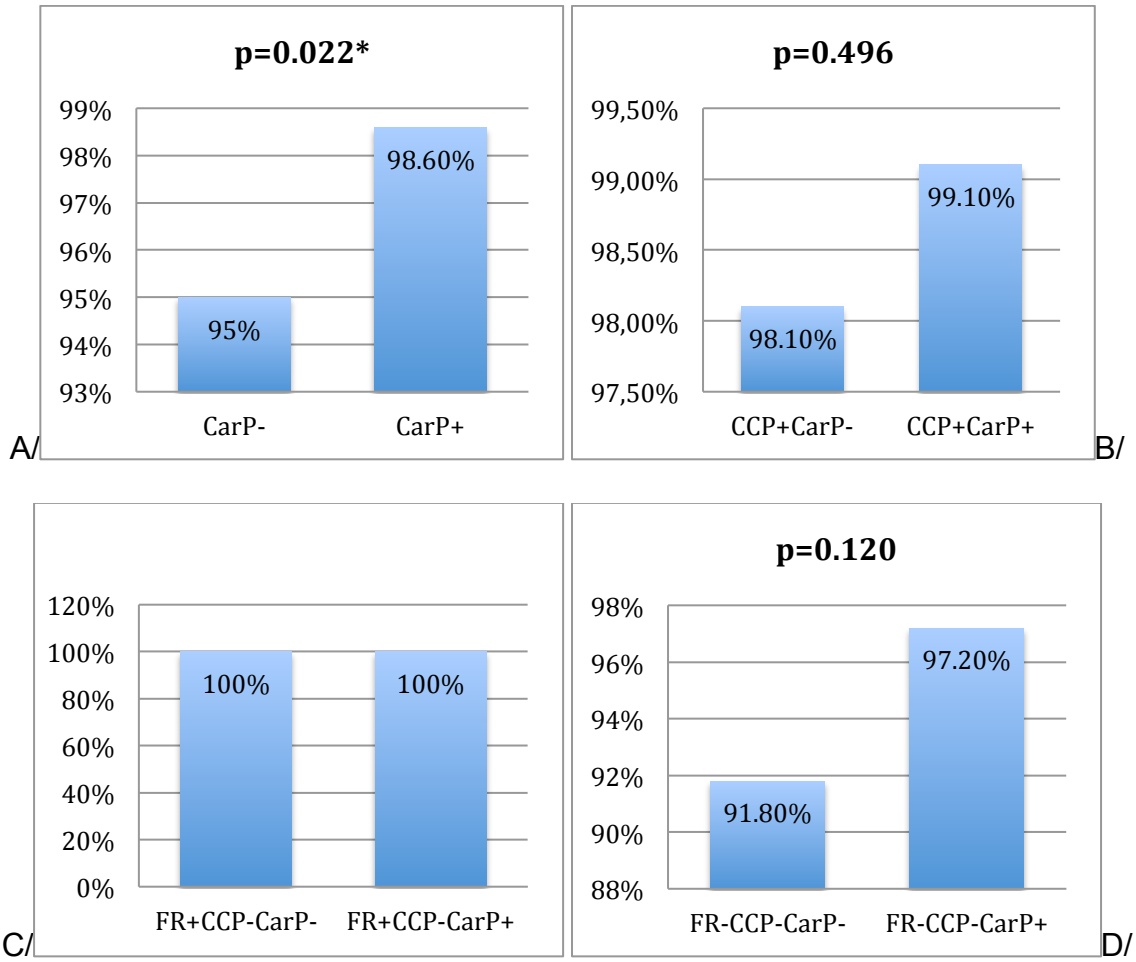


Figure 8 : ACR 2010 criteria fulfilled or not, results for each clusters according to the antibody status for FR, anti-CCP and anti-Carp, illustrated by histograms.
A/ ACR 2010 criteria fulfilled or not in CarP- vs CarP+.
B/ ACR 2010 criteria fulfilled or not in CCP+/CarP- vs CCP+/CarP+.
C/ ACR 2010 criteria fulfilled or not in FR+/CCP-/CarP- vs FR+/CCP-/CarP+.
D/ ACR 2010 criteria fulfilled or not in FR-/CCP-/CarP- vs FR-/CCP-/CarP+.
FR, rheumatoid factor ; CCP, anti-cyclic citrullinated peptid antibodies ; CarP, anti-carbamylated protein antibodies

DISCUSSION

In this study, and for the first time in a French national cohort, we observed that anti-CarP antibodies were present in patients with early arthritis with a prevalence of 32.6%. Moreover 23.6% of FR-/anti-CCP- patients were anti-CarP+, which is almost one in four. We confirmed that anti-CarP antibodies are associated with a more active disease at baseline as measured by the mean of DAS28-ESR (4.977 [4.860-5.094] versus 5.342 [5.180-5.504], p=0.0004) and with more radiological damages at 96 months as measured by the presence or absence of erosions (55.6% versus 37.3%, OR=2.101[1.166-3.793], p=0.008). Interestingly we did not find any association with renal failure or cardiovascular events. 96.2% of patients fulfilled at least once in the 8 years the ACR 2010 criteria for RA (638/663 patients with available datas).

To date, the association of anti-CCP and RF is the commonly test used to detect rheumatoid arthritis (1). But there is a significant number of seronegative RA (13). Shi et al. were the first to describe anti-carbamylated protein antibodies in RA with a prevalence of 43 to 45% (2) and since, other studies have focused on anti-CarP antibodies with a prevalence of 30 to 49% (6)(7)(8)(9). Our prevalence was also similar to other studies and confirmed previous studies with a large number of patients. We have the second biggest prevalence in terms of size with respect to the samples of Jiang and al..

With this presence of anti-Carp antibodies in both anti-CCP- and anti-CCP+ patients, we proved and confirmed that anti-CarP and anti-CCP antibodies are different antibodies even if we can not eliminate a part of cross-reactivity. Citrulline and homocitrulline have a very similar chemical structure (only one methylene-group longer for homocitrulline). Turunen et al. showed that anti-CCP2 could recognize citrullinated and homocitrullinated antigens and that rabbits immunized with homocitrullinated protein could produce anti-CCP antibodies (14). But some anti-CCP and anti-CarP antibodies recognized only their specific antigen (15) and in double-positive, anti-CarP antibodies were inhibited by homocitrullined antigen but not by citrullinated antigen (2).

Concerning disease activity, anti-CarP antibodies were associated with more severe clinical disease as measured by the mean of DAS28VS with a significant difference (4.977[4.860-5.094] versus 5.342[5.180-5.504], p=0.0004). This unique association had already been shown once by Yee A et al. but only regarding the anti-CarP/ACPA1 association (7) which makes our result very interesting. This was also the first study to find a statistical link between anti-CarP antibodies and disease activity mesured by mean of DAS28-VS.

Moreover, anti-CarP antibodies were associated with more severe radiological disease, as shown by the presence of more erosive arthritis among anti-CarP positive antibodies at 96 months than anti-CarP negative (OR=2.101[1.166-3.793], p=0.008). It confirmed the results of three previous studies concerning this association with more severe radiological disease (2)(7)(9). Brink and al. found this association at 24 months and at baseline which was not found in our study (9). Indeed, anti-CarP antibodies were not associated with presence of erosions at baseline in ESPOIR cohort (p=0,679). Shi and al, have found more destruction over 7 years in anti-CarP positive patients (2). These 3 studies found results with Larsen or Sharp score. Our study revealed a statistical association with presence of erosion but not with Sharp score. Besides that, it was a first to have results at 8 years.

In our study, we also tested patients with early arthritis. In this population, sensibility and specificity of anti-CarP antibodies for diagnosing RA were respectivly of 34 and 88%. There was more diagnosis of RA in anti-CarP+ patients (p=0,022) but this test was also not sensible enough and unspecific. To actually conclude on the intrinsic validity of anti-CarP test, both a healthy population and others rheumatisms should be tested. Scinocca and al found anti-CarP antibodies in 5% of patients with systemic lupus and in 3% of patients with psoriasic arthritis (6) which was significantly less than in RA (p<0,005). However these antibodies were found in juvenile idiopathic arthritis and their prevalence was higher than anti-CCP and RF (16). Concerning the 5% negative predictive value of anti-CarP, this low value was due to a very small sample of patients without RA.

Subgroups analysis allowed to provide useful information for future practice. In the anti-CCP+ patients subgroup, diagnosis is certain due to the presence of these antibodies (17). But we learned that in these population, presence of anti-CarP antibodies was associated with a more active clinical disease as measured by the mean of DAS28-ESR (5.131[4.924-5.338] versus 5.442[5.221-5.664], p=0.0465) but not associated with a more severe radiological disease at 96 months (56.1% versus 59.2%, OR=1.135 [0.522-2.483], p=0.730). Shi and al didn't find any association between anti-CarP positivity and radiological damages in anti-CCP+ patients (2). However, anti-CCP+/anti-CarP- patients had a significantly more severe radiological profile at inclusion (45.1% versus 28.8%, OR=0.493[0.283-0.854], p=0.007) and we found an association between anti-CarP positivity and diabetes at 96 months (p=0 ,019).

RF+/anti-CCP- was a very interesting subgroup in clinical practice. Indeed, because of the low specificity of RF, diagnosis of RA remains uncertain (18). In our subgroup, 39% were anti-CarP positive so arthritis with RF+/anti-CCP- could become RA due to anti-CarP antibodies. The prevalence in our study was slightly bigger than in previous studies with prevalences of 0 to 31.4% (2)(6)(7)(8)(9)(11) . Moreover RF+/anti-CarP+ were associated with a more active disease at baseline (4.876[4.510-5.241] versus 5.682[5.265-6.099], p=0.005) but in this subgroup presence of anti-CarP was not associated with more radiological damages at 96 months (p=0,235).

Finally we analysed the subgroup of RF-/anti-CCP-. In our study, 23,6% of RF-/anti-CCP- patients were anti-CarP+ which is a new data. Indeed, Gan and al. were the only ones studying this population and found no patient positive for anti-CarP but there were fewer patients seronegative tested in their study (nine patients vs 356 patients in our study) (11). It meaned that this new antibody could allow making up for the RA diagnosis of almost one patient in four in this subgroup. Moreover, no association was found between anti-CarP antibodies and disease activity and radiological damages. Also, presence of anti-CarP antibodies in this subgroup did not change the phenotype of RA.

Concerning cardio-vascular risk factors, events and renal failure, we wanted to analyze, for the first time, their association with anti-CarP antibodies because of the link between carbamylation and these pathologies. Indeed, carbamylation was for the first time described in terminal renal failure then in atheromatous pathologies (3)(4). In our study we did not found association except the onset of diabetes more present in CCP+/CarP+ than in CCP+/CarP- patients (OR=3.892[1.035-17.789], p=0.019). This lack of association showed for the first time that presence of anti-CarP antibodies in early arthritis was not only in conjunction with cardio-vascular data or renal failure, result very interesting. However we found an association between anti-CarP positivity and presence of blood inflammation (positivity of CRP and ESR, respectively OR=1.406[0.989-2.009], p=0.049 and 1.918[1.245-3.010], p=0.002). This association was also found in RF+/anti-CCP- for ESR positivity (p=0,0022). But presence of anti-CarP could be precisely explained by inflammation because inflammation is one of the causes for increased cyanate levels (3)(4)(5).

The study of anti-CarP levels and their associations with CRP, ESR and SharP did not show any association.

Twenty-five patients had no RA according to the criteria and among these patients, three had anti-CarP antibodies, and nineteen are negative for all antibodies.

There was some other limitations to the current study mainly concerning antibodies. The cut-off of positivity was determined with the help of the low positive controls samples provided by Inova Diagnostics and we did not use healthy population. We chose a different cut-off for each plate of samples, indeed, each patient sample were determined as positive or negative by comparing it to the mean of the two low positive value of the plate. Moreover, some data were missing because of the method applied to this study which was a pre-existing data collection. Concerning positivity of ESR, a threshold of 10 has been chosen (this one was different depending on the center with values from 10 to 30) and could explain these significant results so more studies are necessary to confirm them. Finally, for some samples, we did not have anti-CarP levels because they were out of range so the

spectrophotometer could not transform optical density into arbitrary units but still, data regarding their positivity or negativity were known.

It would be interesting to watch the evolution over time of antibody levels in this cohort (available sera at 36 months). Furthermore, it would be necessary to test a population of healthy patients in order to know if antibodies are present, to know validity of this test and to confirm the link between anti-CarP and inflammation. Finally, thanks to the discovery of these new antibodies we may learn more about pathophysiology of RA and we may understand the risk factors predisposing to the formation of these antibodies. We proved that anti-CarP antibodies were present in this French national cohort so we could now analyse genetic risk factors associated with anti-CarP antibodies. New studies are required especially because the two best-known factors related to anti-CCP (smoking and genetic factors as HLADRB1 and PTPN22) are not associated with presence of anti-CarP (8). In our study we confirmed that there was no association between smoking and anti-CarP antibodies (OR=0.969[0.700-1.339], p=0.842).

The current challenge is to find new biomarkers to help for diagnosis and management of RA. In our cohort 38,3% were negative for RF, anti-CCP and anti-CarP, thus proving that finding new biomarkers, different from these 3 antibodies, would be very helpful.

In the near future, and regarding these studies, research of anti-CarP antibodies will possibly be part of the routine kit for RA detection.

In conclusion, anti-CarP antibodies are present in one third of patients with early arthritis in ESPOIR cohort and are associated with both more severe clinical and radiographic disease. They allow making up for the RA diagnostic of 23% of seronegative patients. There is no link between anti-CarP antibodies and cardio-vascular history and renal failure.

REFERENCES

1. 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. 2010 Sep 1;62(9):2569–81.
2. Shi J, Knevel R, Suwannalai P, van der Linden MP, Janssen GMC, van Veelen PA, et al. Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Oct 18;108(42):17372–7.
3. Shi J, van Veelen PA, Mahler M, Janssen GMC, Drijfhout JW, Huizinga TWJ, et al. Carbamylation and antibodies against carbamylated proteins in autoimmunity and other pathologies. Autoimmun Rev. 2014 Mar;13(3):225–30.
4. Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, Kummu O, Hörkkö S, Barnard J, et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. Nat Med. 2007 Oct;13(10):1176–84.
5. Pruijn GJM. Citrullination and carbamylation in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. Front Immunol. 2015;6:192.
6. Scinocca M, Bell DA, Racapé M, Joseph R, Shaw G, McCormick JK, et al. Antihomocitrullinated fibrinogen antibodies are specific to rheumatoid arthritis and frequently bind citrullinated proteins/peptides. J Rheumatol. 2014 Feb;41(2):270–9.
7. Yee A, Webb T, Seaman A, Infantino M, Meacci F, Manfredi M, et al. Anti-CarP antibodies as promising marker to measure joint damage and disease activity in patients with rheumatoid arthritis. Immunol Res. 2015 Feb;61(1-2):24–30.
8. Jiang X, Trouw LA, van Wesemael TJ, Shi J, Bengtsson C, Källberg H, et al. Anti-CarP antibodies in two large cohorts of patients with rheumatoid arthritis and their relationship to genetic risk factors, cigarette smoking and other autoantibodies. Ann Rheum Dis. 2014 Oct;73(10):1761–8.
9. Brink M, Verheul MK, Rönnelid J, Berglin E, Holmdahl R, Toes RE, et al. Anti-carbamylated protein antibodies in the pre-symptomatic phase of rheumatoid arthritis, their relationship with multiple anti-citrulline peptide antibodies and association with radiological damage. Arthritis Res Ther. 2015;17(1):25.
10. Shi J, van de Stadt LA, Levarht EWN, Huizinga TWJ, Toes REM, Trouw LA, et al. Anti-carbamylated protein antibodies are present in arthralgia patients and predict the development of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2013 Apr;65(4):911–5.
11. Gan RW, Trouw LA, Shi J, Toes REM, Huizinga TWJ, Demoruelle MK, et al. Anti-carbamylated protein antibodies are present prior to rheumatoid arthritis and are associated with its future diagnosis. J Rheumatol. 2015 Apr;42(4):572–9.
12. Combe B, Benessiano J, Berenbaum F, Cantagrel A, Daurès J-P, Dougados M, et al. The ESPOIR cohort: a ten-year follow-up of early arthritis in France: methodology and baseline characteristics of the 813 included patients. Jt Bone Spine Rev Rhum. 2007 Oct;74(5):440–5.
13. Pratt AG, Isaacs JD. Seronegative rheumatoid arthritis: pathogenetic and therapeutic aspects. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2014 Aug;28(4):651–9.
14. Turunen S, Koivula M-K, Risteli L, Risteli J. Anticitrulline antibodies can be caused by homocitrulline-containing proteins in rabbits. Arthritis Rheum. 2010 Nov;62(11):3345–52.
15. Shi J, Willemze A, Janssen GMC, Veelen PA van, Drijfhout JW, Cerami A, et al.

Recognition of citrullinated and carbamylated proteins by human antibodies: specificity, cross-reactivity and the “AMC-Senshu” method. Ann Rheum Dis. 2013 Jan 1;72(1):148–50.
16. Muller PCEH, Anink J, Shi J, Levarht EWN, Reinards THCM, Otten MH, et al. Anticarbamylated protein (anti-CarP) antibodies are present in sera of juvenile idiopathic arthritis (JIA) patients. Ann Rheum Dis. 2013 Dec 1;72(12):2053–5.
17. Goëb V, Jouen F, Gilbert D, Le Loët X, Tron F, Vittecoq O. Diagnostic and prognostic usefulness of antibodies to citrullinated peptides. Jt Bone Spine Rev Rhum. 2009 Jul;76(4):343–9.
18. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. Ann Intern Med. 2007 Jun 5;146(11):797–808.

4. Annexe

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis(e) 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'inter- viendrai 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.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les moeurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusi- vement 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'ad- versité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.

ABSTRACT
Introduction Rheumatoid factor (RF) and anti-citrullinated peptid (CCP) antibodies are commonly used for the diagnosis of rheumatoid arthritis (RA). However some RA, diagnosed on clinical characteristics remain seronegative. Anti-CarP antibodies were recently identified and could be a new serological marker for diagnosis of RA and for prognostic. In this study, we analysed prevalence of anti-Carp antibodies, relationships with other antibodies, and their correlation with the disease phenotype.
Methods Sera of patients from ESPOIR cohort were tested for the presence of anti-CarP antibodies with an ELISA test. We studied their prevalence, associations between anti-CarP and other antibodies, and associations between anti-Carp and disease activity, radiographic data, therapeutic data, renal failure, cardiovascular risk factor and events and development of future RA.
Results Data and sera (month 6 after inclusion in ESPOIR cohort) were available and analysed for 720 patients. Anti-Carp antibody positivity was detected in 32,6% of patients. In the group where anti-CCP and RF were negative, anti-CarP were detected in 23,6%. Anti-CarP antibodies were associated with a more active disease as measured by DAS28-ESR at baseline (p=0,0004). Even if anti-CCP+/anti-CarP- patients have more erosions at baseline than anti-CCP+/anti-CarP+ (OR=0,493[0,283-0,854], p=0,007), anti-CarP+ are associated with a more severe radiological disease as measured by the presence of erosions at ninety-six months after inclusion in the ESPOIR cohort (OR=2,101[1,166-3,793], p=0,008).
Conclusions Anti-CarP antibodies are present in one third of the French ESPOIR cohort. They allow making up for the RA diagnostic of 23% of seronegative patients. Finally they are associated with a more severe clinical and radiologic disease.

RÉSUMÉ
Introduction Le facteur rhumatoïde (FR) et les anticorps anti-peptides citrullinés (anti-CCP) sont utilisés en pratique pour le diagnostic de polyarthrite rhumatoïde (PR). Cependant certaines PR, diagnostiquées sur des critères cliniques, restent séronégatives. Des anticorps dirigés contre des protéines carbamylées (anti-CarP) ont été récemment identifiés et pourraient être un nouveau marqueur biologique pour le diagnostic et le pronostic des PR. Dans cette étude nous avons analysé la prévalence des anticorps anti-CarP, leur association avec les autres anticorps et leur corrélation avec le phénotype de la maladie.
Méthodes Les sérums des patients issus de la cohorte ESPOIR ont été testés pour la présence des anticorps anti-CarP avec un test ELISA. Nous avons étudié leur prévalence, leur association avec les autres anticorps puis avec l'activité de la maladie, les données radiographiques et thérapeutiques, l'insuffisance rénale, les facteurs de risque et évènements cardio-vasculaires ainsi que le développement d'une PR.
Résultats Les données et les sérums (prélévés 6 mois après l'inclusion dans ESPOIR), ont été analysés pour 720 patients. Les anticorps anti-Carp étaient positifs chez 32,6% des patients. Chez les patients FR et anti-CCP négatifs, les anti-CarP étaient détectés chez 23,6%. Les anti-CarP étaient associés à une maladie plus active, mesurée par le DAS28-VS à l'inclusion (p=0,0004). Même si les patients anti-CCP+/anti-CarP- avaient plus d'érosions à l'inclusion que les anti-CCP+/anti-CarP+ (OR=0,493 [0,283-0,854], p=0,007), les anticorps anti-CarP étaient associés à une maladie plus sévère radiologiquement mesurée par la présence d'érosions à 96 mois après inclusion dans la cohorte ESPOIR (OR=2,101 [1,166-3,793], p=0,008).
Conclusions Les anticorps anti-CarP sont présents chez un patient sur trois de la cohorte française ESPOIR. Ils permettent le diagnostic biologique de 23% des PR séronégatives. Enfin ils sont associés à une maladie clinique et radiologique plus sévère.