



HAL
open science

Évaluation de la technique des puces à protéines pour l'identification de biomarqueurs diagnostiques de la polychondrite chronique atrophiante

Chloé Couzin

► **To cite this version:**

Chloé Couzin. Évaluation de la technique des puces à protéines pour l'identification de biomarqueurs diagnostiques de la polychondrite chronique atrophiante. Médecine humaine et pathologie. 2016. dumas-01583279

HAL Id: dumas-01583279

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01583279v1>

Submitted on 7 Sep 2017

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.

AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'Etat de docteur en médecine. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt toute poursuite pénale.

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 122.4

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 335.2-L 335.10

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES
Faculté de Médecine PARIS DESCARTES

Année 2016

N° 197

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE
DOCTEUR EN MÉDECINE

Évaluation de la technique des puces à protéines pour
l'identification de biomarqueurs diagnostiques
de la polychondrite chronique atrophiante

Présentée et soutenue publiquement
le 7 octobre 2016

Par

Chloé COUZIN

Née le 5 janvier 1988 à Grasse (06)

Dirigée par M. Le Docteur Makoto Miyara, PH

Jury :

M. Le Professeur Julien Haroche, PU-PH Président

Mme Le Docteur Marie Agnès Dragon-Durey, MCU-PH

Mme Le Docteur Niloufar Kavian-Tessler, MCU-PH



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur HAROCHE,

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse, veuillez trouver ici l'expression de ma profonde estime.

Madame le Docteur DRAGON-DUREY,

Vous me faites l'honneur de participer au jury de cette thèse, veuillez trouver ici l'expression de mon plus grand respect.

Madame le Docteur KAVIAN-TESSLER,

Vous me faites l'honneur de juger mon travail de thèse, soyez assurée de mes sincères remerciements.

Monsieur le Docteur MIYARA,

Merci d'avoir dirigé ce travail, de m'avoir accordé ton temps sans compter, de m'avoir soutenue tout au long de sa réalisation et d'avoir guidé ma réflexion par tes conseils.

Monsieur le Docteur MATHIAN,

Merci de tes conseils et de ton aide pour obtenir les informations cliniques des patients.

Le Pr PIETTE, le Pr AMOURA, le Dr COHEN-AUBART, le Dr HIE, le Dr PHA et le Dr Du BOUTIN

Merci d'avoir accepté de recruter les patients et de nous fournir leurs informations cliniques.

Les équipes techniques et médicales des services d'Immunologie de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière, du C.E.D.I et de la Biothérapie de l'hôpital Necker et de l'Unité de Thérapie Cellulaire de l'hôpital Saint Louis,

Merci pour votre gentillesse et votre encadrement.

Mes parents et ma sœur,

Merci pour votre présence, votre aide, votre soutien, vos conseils...

Nicolas,

Merci pour ta patience, tes encouragements, ton aide.

Ma famille,

Merci pour votre présence et vos encouragements.

Mes amies de toujours (Bianca, Camille, Annabelle, Marion, Sarah et Danielle),

Merci pour votre amitié et votre soutien depuis toujours.

Cynthia,

Merci pour ton amitié et ta présence tout au long de notre scolarité du primaire à l'internat.

Mes co-externes (Marion meilleure co-externe, Laurent et Emmanuelle),

Merci pour votre amitié et ses années d'externats à Nice.

Mes co-internes exclusivement féminines (Lauraine, Diane, Christina, Carole, Marie, Camille, Agathe, Anne-Perrine, Laetitia et Mélanie),

Merci d'avoir rendu l'internat aussi agréable.

Héloïse, Marie-Alix, Lionel et Hélène,

Merci pour vos conseils, votre patience et votre aide.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES TABLEAUX	9
ABREVIATIONS	10
I. INTRODUCTION	12
A. La polychondrite chronique atrophiante	12
1. Epidémiologie	12
2. Physiopathologie	13
3. Manifestations cliniques	14
4. Manifestations paracliniques	15
5. Critères diagnostiques de la PCA.....	16
6. Biomarqueurs et auto-immunité	17
B. Les puces à protéines	20
1. Historique	20
2. Trois catégories de puces à protéines	20
3. Applications des puces à protéines pour la recherche d’auto-anticorps.....	22
C. Problématique	24
1. Défi diagnostique de la PCA	24
2. Les puces à protéines fonctionnelles disponibles dans le commerce.....	24
3. Objectif du travail.....	24
II. MATERIELS ET METHODES	25
A. Matériel	25
B. Méthode	25
1. Données cliniques	25
2. Fabrication des puces à protéines HuProt™	26
3. Protocole de marquage de la puce à protéines HuProt™	28
4. Analyse des données de l’acquisition des puces HuProt™.....	29
5. Analyses Statistiques	31
III. RESULTATS	32
A. Caractéristiques clinico-biologiques des échantillons analysés	32
B. Contrôle de la qualité des HuProt™	32
1. Contrôle de la qualité de la manipulation.....	32
2. Vérification de la validité diagnostique de HuProt™	33

C. Recherche des anticorps déjà décrits dans la littérature	34
1. Auto-antigènes décrits dans la PCA.....	34
2. Auto-antigènes décrits dans les maladies associées à la PCA.....	35
D. Analyse de l'expression des <i>Hit Score</i> des cibles protéiques.....	36
1. Dépendance des résultats au jour de réalisation de la manipulation.....	36
2. Différence de répertoire d'auto-anticorps entre les patients PCA et les sujets sains	39
3. Corrélation clinico-biologique	42
4. Contribution au diagnostic de la PCA des cibles protéiques d'intérêts.	44
5. Sélection des biomarqueurs pour le diagnostic de la PCA	47
6. Analyse complémentaire des échantillons de la première série de patients.	48
VI. DISCUSSION.....	50
IV. CONCLUSION	55
BIBLIOGRAPHIE.....	56
ANNEXES	62

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Les trois principaux types de puces à protéines : de phase reverse, analytique et fonctionnelle (57,59)	22
Figure 2. Spectre d'activité des protéines de la puce à protéines HuProt™ (CDI laboratories,Inc).	26
Figure 3. Marquage des puces à protéines HuProt™	29
Figure 4. Détection de l'anticorps anti-GST sur HuProt™	33
Figure 5. Détection de l'anticorps anti-histidyl-tRNA synthetase (HARS/Jo1) par HuProt™	34
Figure 6. HS des auto-antigènes décrits dans la PCA chez les patients PCA et les contrôles : le collagène II, le collagène IX α 1, le collagène IX α 3, le COMP, la matriline-1, l' α -enolase, la calréticuline, la vimentine, la tubuline α , et la desmine	35
Figure 7. Distribution des résultats selon le jour de la manipulation	38
Figure 8. Répertoire d'auto-anticorps chez les patients PCA et les sujets sains.	40
Figure 9. Quinze cibles protéiques permettent de distinguer les sujets sains et les patients PCA.....	41
Figure 10. Groupe 1 des cibles protéiques d'intérêts : TXLNB, CCDC97, MAGI1, ABI3, LSP1, DTNBP1 et RAB11FIP1	45
Figure 11. Groupe 2 des cibles protéiques d'intérêts : HS1BP3, UBA2, DAB1, CAST, RDH16 et SH3BP2	46
Figure 12. Groupe 3 des cibles protéiques d'intérêts : PRH1 et UCN3	46
Figure 13. Schéma d'interprétation des résultats de HuProt™	47
Figure 14. HS des cibles protéiques d'intérêts dans les deux séries de manipulations.....	49

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Liste non exhaustive des pathologies associées à la PCA (15).	13
Tableau II. Critères diagnostiques de la PCA.....	17
Tableau III. Types et rôles des protéines contrôles.....	27
Tableau IV. Caractéristiques clinico-biologiques de la cohorte des patients avec une PCA.....	32
Tableau V. Auto-antigènes décrits dans les maladies associées à la PCA présents et absents de la puce HuProt™ (68–70)	36
Tableau VI. Caractéristiques clinico-biologiques des patients de la seconde série de manipulation...	43
Tableau VII. Caractéristiques des deux groupes de patients ségrévés	44
Tableau VIII. Valeur diagnostique des cibles protéiques d'intérêts	44

ABREVIATIONS

ABI3	<i>ABI family member 3</i>
ANA	Anticorps Anti-Nucléaire
ANCA	Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles
AUC	Aire sous la courbe
β 2GPI	β 2 GlycoProtéine I
BPI	<i>Bactericidal/Permeability Increasing protein</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
CAH	Classification Ascendante Hiérarchique
CAST	Calpastatine
CCDC107	<i>Coiled-Coil Domain Containing 107</i>
CCDC97	<i>Coiled-Coil Domain Containing 97</i>
CCP	<i>Citrullinated Cyclic Peptide</i>
CLIC2	<i>Chloride Intracellulare Channel 2</i>
COMP	<i>Cartilage Oligomeric Matrix Protein</i>
CRP	Protéine C Réactive
DAB1	<i>Disabled homologue 1</i>
ddH2O	Eau distillée
DFS	<i>Dense Fine Speckled</i>
DTNBP1	<i>Dystrobrevin Binding Protein 1</i>
EFS	Etablissement Français du Sang
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ENA	<i>Extractable Nuclear Antigen</i> , antigène nucléaire soluble
EYA1	<i>EYe Absent homolog 1</i>
GAD	<i>Glutamate Acid Decarboxylase</i>
Gp210	Glycoprotéine 210
GST	Glutathion S-Transférase
His6	Poly-histidine
Hlamp2	<i>Human Lysosomal membran protein 2</i>
HS	<i>Hit Score</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
HS1BP3	<i>HCLS1 Binding Protein 3</i>
IgG	Immunoglobuline G
IgIV	Immunoglobuline Intra-Veineuse
IgM	Immunoglobuline M
IA2	<i>tyrosine phosphatase IA-2</i>
IGHG1	<i>Immunoglobulin Heavy constant Gamma 1</i>
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IS	<i>Interaction Score</i>
LBR	<i>Lamine B Receptor</i>
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LFB	Laboratoire Français du Bio-Fractionnement
LSP1	<i>Lymphocyte Specific Protein 1</i>
MAGI1	<i>Membrane Associated Guanylate kinase</i>

MAGIC	<i>Mouth and Genital ulcers with Inflamed Cartilage</i>
MPO	<i>Myélopéroxydase</i>
NEDD9	<i>Neural precursor cell Expressed Developmentally Down-regulated 9</i>
OGDH	<i>2-oxoglutarate dehydrogenase</i>
ORF	<i>Open Reading Frame, cadre de lecture ouvert</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCA	<i>Polychondrite Chronique Atrophiante</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PDH	<i>Pyruvate déshydrogénase</i>
PET	<i>Tomographie par Émission de Positrons</i>
PML	<i>Promyelocyte Leukemia</i>
PQBP1	<i>Polyglutamine Binding Protein 1</i>
PR3	<i>Protéinase 3</i>
PRH1	<i>Prolin Rich Haell subfamily 1</i>
ProCAT	<i>Protein Chip Analysis Tool</i>
PS	<i>Phosphatidyl-Serine</i>
RAB11FIP1	<i>RAB11 Family Interacting Protein 1</i>
RBPJ	<i>Recombination signal Binding Protein for Immunoglobulin kappa J region</i>
RDH16	<i>Retinol Deshydrogenase 16</i>
RLM	<i>Robust Linear Model</i>
RNF13	<i>RING Finger protein 13</i>
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RPDAI	<i>Relapsing Polychondritis Disease Activity Index</i>
RPS20	<i>Ribosomal Protein S20</i>
SD	<i>Déviation standard</i>
SH3BP2	<i>SH3 domain Binding Protein 2</i>
SNX1	<i>Sorting Nexin 1</i>
SSB	<i>Sicca Syndrome antigen B</i>
TAA	<i>Tumor Associated Antigen</i>
TDM	<i>Tomodensitométrie</i>
TPO	<i>Thyropéroxydase</i>
TRIM21	<i>Tripartite Motif containing 21</i>
TSH	<i>Thyroid Stimulating Hormon</i>
TXLNB	<i>Taxiline β</i>
U1-RNP	<i>U1 ribonucleoprotein</i>
UBA2	<i>SUMO-activating enzyme subunit 2</i>
UCN3	<i>Urocortine 3</i>
VPN	<i>Valeur Predictive Négative</i>
VPP	<i>Valeur Predictive Positive</i>
VS	<i>Vitesse de sédimentation</i>

I. INTRODUCTION

A. La polychondrite chronique atrophiante

La polychondrite chronique atrophiante (PCA) est une affection multi-systémique rare. Elle se caractérise notamment par des lésions récurrentes, destructives et inflammatoires des cartilages auriculaires, nasaux et de l'arbre laryngo-trachéo-bronchique (1). Sa première description dans la littérature remonte à 1923 sous le nom de « Polychondropathie » (2). Elle fut ensuite appelée chondromalacie, chondrolyse diffuse ou dyschondromalacie (3).

1. Epidémiologie

L'incidence de la PCA est estimée à 3,5 par million d'habitants/an (4). Tous les groupes ethniques sont touchés. Elle affecte principalement l'adulte, avec un pic de prévalence entre 40 et 60 ans. En effet, l'âge moyen au diagnostic est de 47 ans. La PCA peut néanmoins être diagnostiquée à tous les âges [3-86 ans] (4-7). La distribution est quasiment identique dans les deux sexes (8). Enfin, la grossesse ne semble pas avoir d'influence sur son évolution (9). Une association entre le HLA-DR4 et la présence d'une PCA a été relevée dans la population caucasienne (7,10).

La PCA peut être associée à une maladie auto-immune ou un syndrome myélodysplasique chez environ 30% des patients (Tableau I) (7,11). La pathologie auto-immune la plus fréquemment associée à la PCA est la vascularite à anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) (3,12). Des combinaisons avec le lupus érythémateux disséminé, ou le syndrome de Sjögren ont également été observées tout comme l'association avec un syndrome des anti-phospholipides (13). Deux études de cas rapportent l'association avec une myosite (14,15). Par ailleurs, il existe des associations exceptionnelles de maladie de Behçet et de PCA appelées syndrome MAGIC (*Mouth and Genital ulcers with Inflamed Cartilage*, aphtose bipolaire avec chondrites récidivantes) (16). Récemment, chez une patiente japonaise, il a été décrit la coexistence d'un purpura thrombopénique immunologique et d'une PCA (17).

Tableau I. Liste non exhaustive des pathologies associées à la PCA (18).

Maladies auto-immunes et auto-inflammatoires	
<ul style="list-style-type: none"> • Vasculites systémiques <ul style="list-style-type: none"> – Granulomatose de Wegener* – Polyangéite microscopique – Périartérite noueuse – Syndrome de Churg-Strauss – Maladie de Behçet* (MAGIC syndrome**) • Connectivites <ul style="list-style-type: none"> – Polyarthrite rhumatoïde* – Lupus érythémateux* – Syndrome de Sjögren – Connectivites mixtes • Maladies inflammatoires du tube digestif <ul style="list-style-type: none"> – Maladie de Crohn – Rectocolite ulcéro-hémorragique • Endocrinopathies auto-immunes <ul style="list-style-type: none"> – Thyroïdites auto-immunes (thyroïdite d'Hashimoto, maladie de Basedow) – Diabète de type I • Autres maladies inflammatoires <ul style="list-style-type: none"> – Fièvre méditerranéenne familiale – Spondylarthrite ankylosante – Cirrhose biliaire primitive – Myasthénie grave – Panniculite mésentérique 	
Néoplasies	
<ul style="list-style-type: none"> • Syndromes myélodysplasiques* • Maladie de Hodgkin 	<ul style="list-style-type: none"> • Autres lymphomes malins • Thymome
Maladies de la peau	
<ul style="list-style-type: none"> • Psoriasis • Vasculite leucocytoclasique cutanée 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pyoderma gangrenosum</i>
<p>* Désigne les associations classiques. ** L'association de maladie de Behçet et de polychondrite atrophiante est désignée par l'acronyme MAGIC syndrome (= Mouth And Genital ulcers with Inflamed Cartilage).</p>	

2. Physiopathologie

Les mécanismes physiopathologiques qui conduisent à la PCA sont mal connus. Cependant une origine auto-immune est fortement évoquée devant les arguments suivants (12):

- 30% d'association avec une maladie auto-immune (11).
- Susceptibilité accrue chez les patients avec le HLA-DR4 (7).
- Infiltration du cartilage par des lymphocytes T CD4+ et des plasmocytes (12).
- Détection d'auto-anticorps contre les collagènes II, IX, XI, le *Cartilage Oligomeric Matrix Protein* (COMP) et la matriline-1. (19–22).
- Amélioration des symptômes par traitement au collagène II via un mécanisme de tolérance induite chez un patient (23).
- Efficacité de traitements à base de glucocorticoïde et/ou immunosuppresseur (24).

Une infection ou une agression mécanique ou chimique pourrait être un évènement déclencheur de la maladie. En effet, il existe une homologie structurelle entre la *heat shock protein* (HSP) microbienne (HSP 60 de *Mycobacterium tuberculosis*) et des antigènes du cartilage. Il existe dans la PCA des anticorps qui ont une réactivité croisée entre les antigènes du cartilage et l'HSP (25). Concernant les agressions mécaniques ou chimiques, il a été décrit le démarrage d'une PCA à la suite d'un piercing, et l'apparition d'une chondrite articulaire après traitement par le glucosamine chondroïtine. La conjonction de ces évènements dans un environnement génétique particulier (50% des patients ont HLA-DR4) mènerait à une réponse immune inflammatoire. L'inflammation responsable des lésions tissulaires et de la dégradation du tissu conjonctif modulerait le métabolisme des chondrocytes. Le cartilage serait alors envahi par les cellules inflammatoires. Les cytokines inflammatoires (IL1, IL8, MIP1, TNF α), les enzymes protéolytiques (*matrix metalloprotease* -3,-8,-9) et les cathepsines K et L relarguées dans le milieu contribuent au processus pathologique en perturbant la réparation de la matrice cartilagineuse. Le cartilage est alors progressivement détruit et remplacé par du tissu fibreux (8,12,26).

3. Manifestations cliniques

La PCA est une maladie à présentation hétérogène. Chez plus de 80% des patients les symptômes principaux sont une chondrite auriculaire et une polyarthrite. Le diagnostic est généralement porté *a posteriori* (4,13,27,28).

a. Les chondrites

Les chondrites caractérisent la PCA. La chondrite auriculaire est une inflammation œdémateuse du pavillon de l'oreille respectant le lobe de l'oreille. Elle est présente au début de la PCA chez 20% des patients. La fréquence de l'atteinte augmente au cours de l'évolution de la maladie pour atteindre jusqu'à 90% des patients (24). Les manifestations sont uni- ou bilatérales et les attaques récurrentes et déformantes. Les poussées inflammatoires répétitives aboutissent à la destruction du pavillon de l'oreille donnant un aspect en « chou-fleur ». Une surdité de transmission peut apparaître. Elle est le résultat de la sténose du canal auditif externe, de la chondrite de la trompe Eustache ou d'une otite moyenne séreuse (4). Une chondrite nasale est présente de manière inaugurale chez 24% des patients et survient au cours de l'évolution dans 54% des cas (13). L'inflammation chronique et la

destruction cartilagineuse peuvent induire une déformation nasale en « pied de marmite » (ensellure nasale) indolore mais définitive. L'atteinte laryngo-trachéo-bronchique apparaît au cours de la maladie dans la moitié des cas. Elle est responsable d'une dysphonie. Elle doit être systématiquement recherchée car elle peut se compliquer d'une obstruction engageant le pronostic vital (11,24).

b. Manifestations extra-chondritiques

Des signes généraux peuvent accompagner les poussées : fièvre, asthénie. La polyarthrite est la seconde manifestation la plus fréquente après les chondrites (24). Elle est asymétrique, intermittente, migratoire, aiguë ou subaiguë sans érosion articulaire dans la majorité des cas. Le liquide articulaire n'est pas inflammatoire. Les sites atteints sont les articulations métacarpo-phalangiennes et inter-phalangiennes, les genoux et les poignets. Vingt à 60% des patients présentent des manifestations oculaires qui sont peu sévères : épisclérite, sclérite, uvéite et kératite ulcéreuse. Les atteintes cutanéomuqueuses sont décrites dans 35 à 50% des cas avec des nodules, un livedo ou un purpura infiltré. Environ 30% des patients présentent des manifestations cardiaques : valvulopathies, anévrismes aortiques, troubles de la conduction (8,24). L'atteinte cardiovasculaire est la seconde cause de décès (5,28). Les manifestations rénales sont rares : il s'agit alors d'une prolifération mésangiale et une glomérulonéphrite segmentale nécrosante (8). Les pathologies neurologiques centrales et périphériques sont compatibles avec des phénomènes de vascularite. Les signes cliniques en sont très hétérogènes : céphalées, hémiparésie, méningite aseptique, méningoencéphalite et anévrismes cérébraux (13).

4. Manifestations paracliniques

Il n'existe à ce jour pas de test biologique sensible et spécifique permettant le diagnostic de la PCA. Le rôle du laboratoire est limité à l'exclusion de pathologies associées. La biologie met en évidence un syndrome inflammatoire non spécifique : augmentation de la vitesse de sédimentation (VS) et de la protéine C réactive (CRP), anémie normochrome normocytaire, leucocytose, thrombocytose et hypergammaglobulinémie polyclonale (1,4). Dans 10% des cas on peut observer une éosinophilie (8).

Le bilan biologique peut être complété par un examen morphologique par imagerie. Les radiographies peuvent montrer un rétrécissement trachéal, des calcifications dans le

cartilages des oreilles, du nez et de la trachée. La tomodensitométrie (TDM) permet d'identifier les atteintes laryngées, trachéales et bronchiques précoces. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) peut mettre en évidence une inflammation caractéristique du périchondre et des épiphyses cartilagineuses à des stades précoces de la maladie. La Tomographie par Émission de Positrons (PET) permet d'évaluer l'activité de la maladie. Et enfin l'échographie cardiaque a un rôle dans l'évaluation de l'atteinte cardiovasculaire (13).

L'examen histologique est peu contributif et peu réalisé en pratique (8,13,24). Il serait potentiellement utile dans les formes précoces ou atypiques de la maladie. Il révèle alors une infiltration de la partie périchondrale du cartilage par les lymphocytes T CD4+ et les plasmocytes. En immunofluorescence, on peut retrouver un dépôt d'immunoglobuline et de protéine C3 dans la matrice cartilagineuse (26).

Devant l'absence de marqueurs biologiques, d'anomalies spécifiques à l'imagerie et à l'anatomopathologie, le diagnostic de la PCA reste donc essentiellement clinique.

5. Critères diagnostiques de la PCA

Les premiers critères diagnostiques ont été proposés par McAdam *et al.* en 1976 (11), ils ont été étendus par Damiani *et al.* en 1979 (27) et enfin modifiés par Michet *et al.* en 1986 (5) afin d'éviter le recours systématique à la biopsie (Tableau II) (1).

Tableau II. Critères diagnostiques de la PCA : proposés par McAdam, Damiani et Michet (13,18).

Critères diagnostiques de Mc Adam (McAdam et al.,1976)

Présence d'au moins trois critères sur six

1. Chondrite bilatérale des pavillons
 2. Chondrite nasale
 3. Chondrite du tractus respiratoire
 4. Polyarthrite non érosive séronégative
 5. Inflammation oculaire
 5. Atteinte vestibulo-cochleaire
-

Critères diagnostiques de Damiani (Damiani et al.,1979)

Présence d'au moins un des critères suivants

- A. Présence de trois critères de McAdam
 - B. Présence d'un critère de McAdam et d'une image histologique typique
 - C. Présence de deux critères de McAdam et réponse aux corticostéroïdes ou dapsons
-

Critères diagnostiques de Michet (Michet et al., 1986)

Présence de deux critères majeurs ou de un critère majeur et deux critères mineurs

1. Critères majeurs
 1. Chondrite auriculaire
 2. Chondrite nasale
 3. Chondrite laryngo-trachéale
2. Critères mineurs
 1. Inflammation oculaire
 2. Hypoacousie
 3. Syndrome vestibulaire
 4. Polyarthrite séronégative

Un score clinico-biologique, le *Relapsing Polychondritis Disease Activity Index* (RPDAI) a récemment été conçu pour évaluer l'activité de la maladie. Il peut être utilisé pour le suivi des patients et l'évaluation de la réponse thérapeutique au cours d'études cliniques. Il se compose de 26 items cliniques et un biologique (élévation de la CRP) avec des pondérations individuelles différentes (Annexe I). Le score théorique maximal est de 265 (29).

6. Biomarqueurs et auto-immunité

Papo *et al.* a montré que les ANCA pouvaient être présents chez 24% des patients, avec un titre significativement corrélé à l'activité de la maladie (30). Dans une étude de Zeuner *et al.* les anticorps anti-cardiolipine ont été retrouvés dans le sérum de 8 patients sur 21 et les anticorps anti-phosphatidylsérine (PS) chez un patient. En revanche, aucun anticorps anti-β2Glycoprotéine I (β2GPI) n'est mis en évidence (31). La prévalence des

anticorps anti-nucléaire (ANA) est faible dans la PCA lorsqu'elle n'est pas associée à une autre maladie (32). De manière discordante, dans les travaux de Zeuner *et al.* 66% des patients avaient des ANA (7). Quand les ANA sont présents, l'aspect en immunofluorescence indirecte sur cellules Hep2 est homogène ou moucheté (32).

La cible antigénique de la réponse auto-immune est inconnue pour le moment. Toutefois, le cartilage étant la cible principale des manifestations de la maladie, il est raisonnable de penser qu'un des auto-antigènes cibles soit cartilagineux. Le collagène II représente 95% de la composante totale du cartilage, les types VI, IX, X et XI seulement 5% (26). Foidart *et al.* a mis en évidence la présence d'anticorps anti-collagène II dans le sérum de 33% des patients (5 patients sur 15) (20). Ces anticorps sont détectés au début de la maladie et leur titre paraît corrélé à la sévérité de la maladie (33). Cependant les anticorps anti-collagène II ne sont pas spécifiques de la PCA car ils ont également été retrouvés dans la polyarthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux disséminé (34,35). Il a été montré que la spécificité épitopique des anti-collagène II de la PCA différait de celle de la polyarthrite rhumatoïde, ce qui pourrait expliquer les différences phénotypiques entre ces deux maladies (36). Sur le plan expérimental, les rats immunisés avec le collagène II développent des chondrites auriculaires qui miment les symptômes des patients ayant une PCA (37). Ils peuvent présenter une inflammation des articulations périphériques (38). Une réponse auto-immune contre les antigènes des collagènes IX et XI a été mise en évidence dans plusieurs études mais elle n'était pas corrélée avec l'activité de la maladie (19,39,40).

La matriline-1 est une protéine spécifique du cartilage retrouvée dans la matrice extracellulaire. On la retrouve principalement dans les cartilages de la trachée, du nez et des oreilles. La notion qu'elle puisse avoir un rôle dans la PCA remonte au début des années 90 lorsque que des fragments de matriline-1 ont été identifiés dans le sérum de patients pendant les poussées de la maladie (22). Par la suite, il a été décrit chez un patient avec une PCA et une atteinte essentiellement trachéo-bronchique une réponse humorale et cellulaire spécifique de la matriline-1 (21). Ensuite, Hansson *et al.* a décrit la présence d'anticorps anti-matriline-1 chez 13 patients sur 97. Ces anticorps étaient corrélés à la présence de symptômes respiratoires dans 69% des cas. Ils ne sont cependant pas spécifiques car ils ont pu être détectés chez des patients avec une granulomatose de Wegener ou un lupus érythémateux disséminé (40).

COMP est une protéine présente dans les cartilages de l'oreille, de la trachée et du nez. Son intérêt dans la PCA a été évoqué pour la première fois dans la description d'un patient de 50 ans (41). Les taux sériques de COMP ont ainsi été suivis pendant 3 ans d'évolution de la maladie. Son taux sérique était dans les limites des valeurs normales quand la maladie était active et redevenait normal au moment de l'amélioration des symptômes respiratoires (22,41). Plus récemment, une étude a confirmé que les concentrations de COMP étaient inversement corrélées à l'activité de la maladie (42). Les concentrations sériques élevées de COMP seraient le reflet d'un haut niveau de renouvellement du cartilage. Les anticorps anti-COMP ont été détectés chez seulement 7 patients sur 97, leur présence n'était cependant pas corrélée avec les atteintes trachéales ou articulaires. Dans cette étude, les patients avaient également des anticorps anti-matriline 1 (40).

Tanaka *et al.* a mis en évidence, dans une série de onze patients atteints de PCA quatre nouveaux auto-antigènes qui ne sont pas spécifiques du cartilage (43). Dans le but de détecter les protéines qui réagissaient avec les sérums de patients, ils ont d'abord réalisé une électrophorèse des protéines associée à un *Western Blot* sur les extraits protéiques d'une lignée cellulaire de chondrosarcome. Ils ont ensuite confirmé par une technique *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) l'antigénicité des protéines retrouvées. Les auto-antigènes identifiés sont la tubuline α , la vimentine, l' α -enolase et la calréticuline. Leurs rôles dans la physiopathologie de la maladie n'ont pas encore été élucidés. La tubuline α est l'un des composants principaux des microtubules du cytosquelette. La vimentine est un membre de la famille des filaments intermédiaires. Des auto-anticorps contre la vimentine ont été décrits dans la polyarthrite rhumatoïde et les pneumopathies interstitielles diffuses (44,45). L' α -enolase est une enzyme glycolytique ubiquitaire dont les auto-anticorps sont retrouvés dans le lupus érythémateux disséminé, la sclérodermie systémique, la polyarthrite rhumatoïde et la vascularite à ANCA (46–48). La calréticuline est une protéine chaperonne du calcium qui se lie au complexe Ro52/SS-A. Des auto-anticorps contre la calréticuline peuvent être présent chez des patients atteints de lupus érythémateux disséminé ou de polyarthrite rhumatoïde (43,49).

De manière plus anecdotique, des anticorps circulants dirigés contre l'organe cochléo-vestibulaire, contre l'épithélium de la cornée et la desmine ont été décrits (25,50,51).

B. Les puces à protéines

1. Historique

A la fin des années 80, Ekins suggère pour la première fois l'utilisation de méthodes d'exploration immunologiques miniaturisées nommées *ambient analyte immunoassay* (52). Ce concept permet la mesure simultanée de dizaines ou centaines de substances dans un même échantillon. Dans la décennie suivante, l'équipe de Schena a développé un système de puce pour analyser l'expression d'une grande quantité de gènes simultanément le *DNA microarray* (53). Les auteurs ont amplifié différents fragments d'ADN complémentaire à partir d'*Arabidopsis thaliana* et chacun de ces fragments a été imprimé sur des puces en verre par un robot à haute vitesse (jusqu'à 20 000 fragments d'ADN sur une seule puce). Cependant, cette technologie s'est retrouvée limitée par l'absence de corrélation entre l'activité du gène et l'expression protéique (54). Les puces à protéines ont alors été développées dans les années 2000 (55). Dans les puces à protéines, le système de détection de protéines repose sur les interactions antigènes/anticorps. Robinson et ses collègues ont proposé la production de puces contenant une centaine d'auto-antigènes connus dans le but d'établir le profil des maladies auto-immunes (56).

2. Trois catégories de puces à protéines

Il existe trois catégories principales de puces à protéines : les puces en phase reverse, les puces analytiques et les puces fonctionnelles (Figure 1) (57–59).

a. Puces à protéines en phase reverse

Dans les puces à protéines en phase reverse, les lysats protéiques extraits de cellules ou de tissus sont immobilisés sur la lame. La puce est incubée avec un anticorps spécifique qui détecte l'expression de la protéine cible, la puce est ensuite révélée par chimiluminescence ou fluorescence. Elle peut permettre de déterminer la présence d'une protéine altérée en cas de maladie. L'inconvénient majeur de cette approche est qu'elle dépend fortement de la disponibilité et de la spécificité des anticorps produits dans le commerce (57).

b. Puces à protéines analytiques

La puce analytique est utilisée pour détecter l'expression de protéines connues dans un échantillon selon le principe de l'interaction antigène/anticorps. Dans cette configuration, l'antigène est directement fixé sur le support puis est reconnu par un anticorps. Une méthode alternative dite *sandwich* a été décrite. Elle utilise deux anticorps de haute affinité, le premier, appelé de capture, immobilise la protéine cible sur une phase solide et le second, appelé rapporteur génère un signal qui permet de détecter la présence d'antigènes. Cette technique est à rapprocher de la technique ELISA mais permet d'étudier différentes protéines avec un seul dépôt d'échantillons. Elle peut être utilisée pour le diagnostic clinique et l'identification de biomarqueurs (57–59).

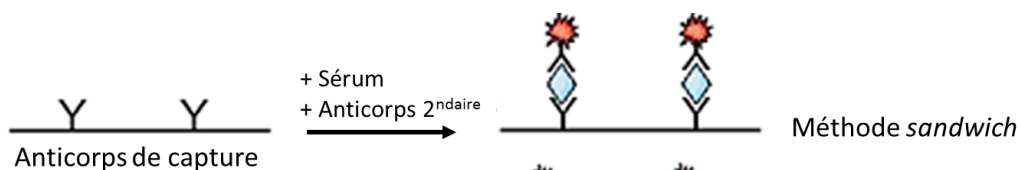
c. Puces à protéines fonctionnelles

Contrairement aux puces analytiques, les protéines des puces fonctionnelles sont entières. Elles sont synthétisées par un organisme vivant (*E.coli*, *S.cerevisaie*, cellules de mammifères, baculovirus/cellules d'insectes) et sont ensuite immobilisées sur une lame. Les puces à protéines fonctionnelles sont utilisées pour découvrir des nouvelles interactions : protéines-protéines (60,61), protéines-drogues (62) ou protéines-anticorps. Elles permettent ainsi d'identifier de nouveaux biomarqueurs diagnostique (57–59). Dans la suite de ce travail, nous utiliserons les puces à protéines fonctionnelles pour leur intérêt dans la recherche d'auto-anticorps.

Puce de phase reverse



Puce analytique



Puce fonctionnelle

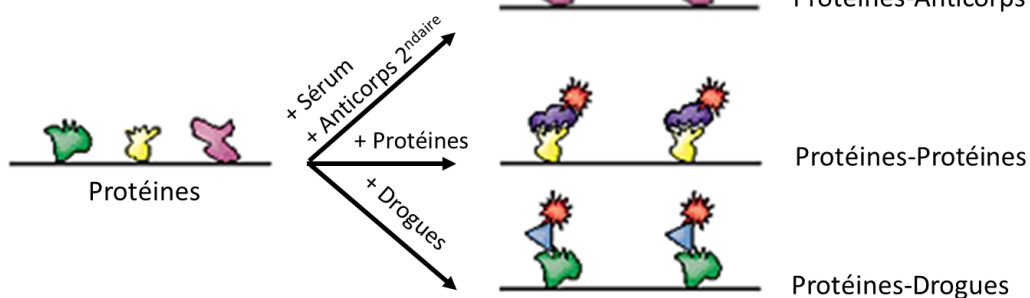


Figure 1. Les trois principaux types de puces à protéines : de phase reverse, analytique et fonctionnelle (57,59).

3. Applications des puces à protéines pour la recherche d'auto-anticorps

Dans un contexte clinique, les puces à protéines constituent un outil d'analyse du profil des auto-anticorps dans maladies humaines comme les cancers et les maladies auto-immunes (63).

Au cours de l'évolution d'un cancer, des auto-anticorps dirigés contre des auto-antigènes associé aux tumeurs (TAA) peuvent apparaitre (63). Il est possible que la présence d'un répertoire d'auto-anticorps spécifiques soit corrélée soit au diagnostic positif soit à un pronostic donné dans la maladie tumorale. Plusieurs équipes proposent la recherche

d'auto-anticorps spécifiques comme technique alternative dans la détection d'un cancer (64). Parmi elles, Gnjatic *et al.* a décrit des répertoires d'auto-anticorps spécifiques dans les cancers de l'ovaire et du pancréas : en comparant des sérums de patients avec ceux de contrôles sains ils ont mis en évidence 202 cibles protéiques dans le cancer de l'ovaire et 29 dans celui du pancréas dont certaines étaient en commun (65). Syed *et al.* a étudié le profil de patients atteints d'un gliome à différents grades. Ils ont ainsi mis en évidence des auto-antigènes qui distinguent les malades des contrôles sains (IGHG1, EYA1, SNX1 et PQBP1), un potentiel marqueur pronostic (NEDD9) et des répertoires d'auto-anticorps différents selon le grade de gliome (66).

L'utilisation des puces à protéines dans l'identification de biomarqueurs dans les pathologies auto-immunes est en expansion depuis ces dernières années. En 2010 Song *et al.* a employé cette technologie pour différencier les hépatites auto-immune et non auto-immune. Ils ont développé une méthode en deux phases (phase de *training* et phase de *test*), la première est un large criblage avec un nombre restreint de patients (par le biais d'une puce à protéine contenant 5 136 protéines) et la seconde, la confirmation des auto-antigènes mis en évidence dans une cohorte plus étendue comprenant des patients avec différentes maladies auto-immunes. De cette manière, trois néo-antigènes hautement spécifiques ont été mis en évidence : *Ribosomal Protein S20* (RPS20), *Alba like* et dUTPase (67). Grâce à cette méthode en deux temps, Huang *et al.* a identifié dans le lupus érythémateux disséminé un nouvel auto-antigène *Chloride Intracellular Channel 2* (CLIC2). Cet antigène paraît positivement corrélé avec la sévérité de la maladie (68). Les puces à protéines peuvent avoir un intérêt pour l'étude de biomarqueurs dans les liquides biologiques disponibles en faible quantité comme le liquide céphalo-rachidien (LCR). En effet, dans le LCR des patients avec une sclérose en plaque, Querol *et al.* a révélé une réactivité anti-*Recombinase binding protein J* (RBPJ), non retrouvée dans les LCR des patients contrôles (atteints d'autres maladies inflammatoire neurologique tel que la méningite ou neurosyphilis) (69).

C. Problématique

1. Défi diagnostique de la PCA

La PCA pose un problème diagnostique devant l'absence de signes cliniques spécifiques et de biomarqueurs. En effet, le délai moyen au diagnostic est de 2,9 ans. De plus, un tiers des patients doit consulter au moins cinq médecins avant que la maladie soit formellement identifiée (28). La PCA est probablement une maladie auto-immune impliquant des auto-anticorps. Toutefois, les anticorps déjà identifiés (anti-collagène II, matriline 1, COMP) ne sont ni sensibles ni spécifiques. Ils ne permettent pas le diagnostic biologique.

2. Les puces à protéines fonctionnelles disponibles dans le commerce

Les techniques d'immunologie conventionnelle (ELISA, Luminex®) sont à la fois chronophages et limitées dans la détection d'anticorps rares. Les puces à protéines permettent de cribler ces anticorps dans la mesure où des milliers de protéines sont étudiées simultanément. Les deux modèles de puces avec le plus large répertoire de protéines recombinantes humaines disponibles dans le commerce sont les puces Protoarray™ (Invitrogen™) et HuProt™ (CDI Laboratories, Inc). Protoarray™ contient 9000 protéines synthétisées par le système baculovirus/cellules d'insectes. HuProt™ contient 22272 protéines qui sont synthétisées par *S.cerevisiae*. Avec ces deux systèmes de production les protéines sont exprimées avec les modifications post-traductionnelles et sont donc fonctionnelles. Nous avons sélectionné la puce HuProt™ parce qu'elle permet d'explorer un plus grand nombre de protéines.

3. Objectif du travail

L'hypothèse de travail est qu'il existe des auto-anticorps encore non identifiés dans la PCA dont la présence permettrait d'améliorer le diagnostic biologique. La détection d'auto-anticorps par puce à protéines est devenue une des approches exploratrices les plus prometteuses dans le cadre des maladies auto-immunes. Il nous a semblé important d'évaluer l'apport pour le diagnostic biologique de la PCA. Pour cela nous avons utilisé la puce à protéine HuProt™ dans une série de patients dont le diagnostic est certain.

II. MATERIELS ET METHODES

A. Matériel

Dix-neuf patients atteints de PCA, un patient avec une cirrhose biliaire primitive, un avec un syndrome des anti-synthétases et un patient lupique ont été recrutés dans le service de médecine interne 2 (Pr Amoura) de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière entre 2009 et 2015. Leurs sérums ont été conservés dans la sérothèque du service d'Immunochimie (Dr Musset) du même hôpital. Afin de vérifier la validité diagnostique des HuProt™, les trois patients avec la cirrhose biliaire primitive, le lupus érythémateux disséminé et le syndrome des anti-synthétases ont été préalablement analysés (contrôles de la validité de HuProt™). Les contrôles pour les manipulations des patients PCA sont : un flacon d'Immoglobulines Intraveineuses (IgIV) (Tegeline® LFB-issu d'un pool de plasma de 20 000 donneurs au maximum) et les sérums de sept donneurs de sang sains (sujets sains) issus de l'Établissement Français du Sang (EFS). Les patients et les donneurs de sang ont signé un consentement pour la recherche biomédicale.

B. Méthode

1. Données cliniques

Les informations cliniques des patients ont été récupérées par le Dr Mathian. Les données biologiques sont issues du laboratoire d'Immunochimie de l'hôpital de la Pitié Salpêtrière. Les ANA sont mis en évidence par immunofluorescence indirecte sur cellules Hep2. Le dépistage des anticorps anti-antigène nucléaire soluble (ENA) est réalisé par une technique ELISA. Enfin, les ANCA sont recherchés par immunofluorescence indirecte sur frottis de polynucléaires neutrophiles fixés à l'éthanol.

2. Fabrication des puces à protéines HuProt™

HuProt™ (CDI laboratories,Inc) est une puce composée d'une lame recouverte de protéines représentant environ 74% du génome humain, soit plus de 20 000 protéines humaines ayant un large spectre d'activité (Figure 2).

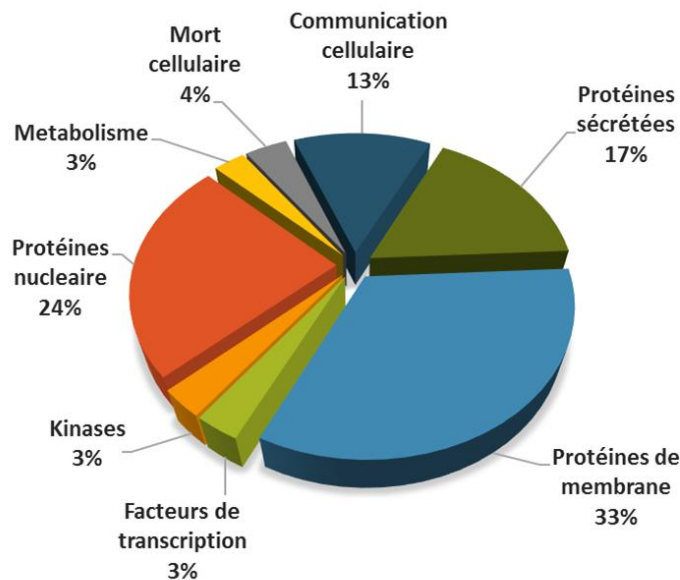


Figure 2. Spectre d'activité des protéines de la puce à protéines HuProt™ (CDI laboratories,Inc).

Les puces à protéines sont produites par le laboratoire américain CDI Laboratories. La construction d'une puce à protéine se déroule en plusieurs étapes successives. Les séquences de cadre de lecture ouverte humaines (ORF) sont insérées par recombinaison Gateway™ (Invitrogen™) dans un vecteur d'expression de la levure (pEGH-A) galactose inducible (GAL1). La taille des inserts est vérifiée par une digestion enzymatique (BsrGI) suivie d'une migration par électrophorèse. Les clones dont la taille est correcte sont transfectés dans la levure *S. cerevisiae*. Les protéines recombinantes produites possèdent une étiquette Glutathione S Transférase (GST)-poly-histidine (His6) en N-terminal. La qualité et pureté des protéines synthétisées sont déterminées par un *Western Blot* avec une révélation par un anticorps anti-GST. Les protéines sont alors purifiées par chromatographie d'affinité sur résine glutathione-sépharose. Les protéines avec l'étiquette GST-His6 sont sélectionnées. L'équipe de Jeong estime que 98% des protéines produites ont le poids moléculaire attendu (70,71).

Les 22272 protéines produites ainsi que les protéines contrôles décrites dans le tableau III sont déposées en duplicat sur une puce de Super Epoxy2™ (Arrayit Corp) à l'aide d'une imprimante Arrayit NanoPrint™ (Enterprise Level Microarrays) avec une pointe-plume dans une chambre froide sans poussières. Les puces mesurent 75mm(L) x 25mm(l) x 1mm(H) et contiennent 4 x 12 blocs de 31 lignes de 32 spots soit 16 protéines par ligne. Les spots mesurent 100 µm de diamètre. Les protéines se lient de manière covalente à la surface. Les puces sont conservées à -80°C dans un environnement sec.

Tableau III. Types et rôles des protéines contrôles de la puce à protéines HuProt™ (CDI laboratories, Inc).

Symboles	Noms	Rôles
Contrôles positifs		
H1, H2 (A+B), H3, H4	Histones H1, H2A, H2B, H3, H4	Non spécifiques
IgG 488/594	Alexa fluor 488/594	Repère pour la détection dans les canaux 488-594
IgG 555/647	Alexa fluor 555/647	Repère pour la détection dans les canaux 555-647
GST10n	GST à 10 ng/µl	Mode de conservation et du marquage
GST50n	GST à 50 ng/µl	
GST100n	GST à 100 ng/µl	
GST200n	GST à 200 ng/µl	
Souris anti-biotine		Interaction avec la streptavidine
Lapin anti-biotine		
Biotine-BSA		
Souris-IgM		En cas de marquage avec un IgM anti-humain
Contrôles négatifs		
BSA		Interactions non spécifiques
Buffer		

BSA : *Bovine Serum Albumine* ; GST : Glutathion S-Transférase ;
IgG : Immunoglobuline G, IgM : Immunoglobuline M

3. Protocole de marquage de la puce à protéines HuProt™

a. Préparation des Pucés

Les pucés sont bloqués 2h dans 5mL de tampon de blocage (10% Sérum de chèvre/*Phosphate Buffered Saline* (PBS)-0.1% Tween 20, pH 7.4) sous agitation constante à température ambiante.

b. Préparation des échantillons

Les sérums des contrôles de la validité de HuProt™ ont été dilués à 1/1000 dans un tampon contenant 2% *Bovine Serum Albumine* (BSA)/PBS-0.1% Tween 20. Deux séries de manipulations des patients PCA ont été réalisées. Dans la première série, les sérums de dix patients PCA ont été dilués à 1/1000 et l'échantillon contrôle IgIV à 1/5000 dans un tampon contenant 2%BSA/PBS-0.1% Tween 20. Dans la seconde série les sérums de neuf patients PCA et des sept sujets sains ont été dilués à 1/500 dans le même tampon. L'anticorps de chèvre anti-GST biotinylé (Abcam®) à la concentration finale de 0.5 µg/ml est ajouté à chaque échantillon.

c. Fixation des anticorps primaires

Les pucés sont incubées avec le sérum dilué et l'anticorps anti-GST biotinylé pendant 2h pour les contrôles de la validité de HuProt™ et la première série de patients PCA et toute la nuit pour la seconde sous agitation constante à température ambiante. Les pucés sont ensuite lavées trois fois 10 min avec 5 mL de PBS-0.1% Tween 20.

d. Fixation les anticorps secondaires

L'anticorps secondaire de chèvre IgG anti-humain (H+L) couplés avec à Alexa-Fluor 546 (Life Technologies™) permet de révéler les auto-anticorps IgG fixés sur les protéines de la puce. La streptavidine couplée à l'Alexa-Fluor 635 (Life Technologies™) permet de révéler l'anticorps anti-GST biotinylé fixé à l'étiquette GST-His6 des protéines (Figure 4). Ces anticorps secondaires sont dilués dans 5 mL de tampon de blocage (10% sérum de chèvre/PBS-0.1% Tween 20) à la concentration finale de 1 µg/mL. La solution est ajoutée sur chaque puce et incubée 2h sous agitation constante à température ambiante à l'obscurité.

Une puce contrôle négative est ajoutée à chaque série de manipulation. Elle est préparée en parallèle des autres puces. Elle est incubée avec l'anticorps anti-GST biotinylé et les anticorps secondaires sans être au contact des échantillons patients PCA et contrôles.

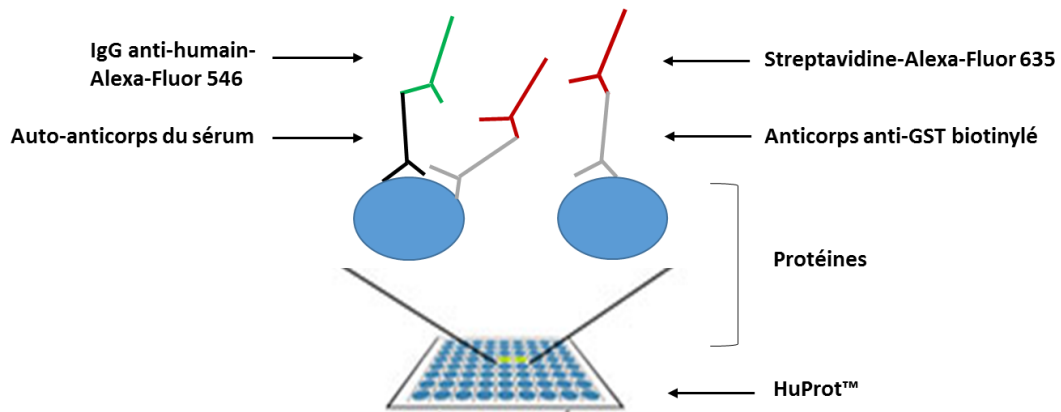


Figure 3. Marquage des puces à protéines HuProt™.

e. Acquisition des puces par scanner à fluorescence

Après trois lavages de 10 min avec 5mL de PBS-0.1% Tween 20 les puces sont rincées au ddH₂O. Pour retirer le ddH₂O, les puces sont centrifugées 800 rpm pendant 3 min. Elles peuvent alors être conservées à 4°C à l'abri de la lumière et doivent être scannées dans les trois jours. Pour cette étude, les puces ont été scannées avec le scanner Tecan LS400 (Tecan Inc., Durham, NC) par le laboratoire anglais Cambridge Protein Array® (distributeur en Europe des HuProt™). La résolution est de 10 µm par pixels. Deux acquisitions sont faites pour chaque puce à deux longueurs d'ondes d'excitation : à 633 nm correspondante à la lecture de la streptavidine couplé à l'Alexa-Fluor 635 et 532 nm pour la lecture de l'IgG anti-humain couplé à l'Alexa-Fluor 546.

4. Analyse des données de l'acquisition des puces HuProt™

Le logiciel ScanArray express est utilisé pour interpréter les résultats. L'alignement des spots est effectué manuellement. Le logiciel permet de déterminer les intensités de fluorescence des marquages par la streptavidine couplée à l'Alexa-Fluor 635 et l'IgG anti-

humain couplé à l'Alexa-Fluor 546 dans les puces tests et contrôles. Deux scores sont établis : le *hit score* (HS), et *interaction score* (IS) pour déterminer la significativité du signal.

a. Hit Score (HS)

Il s'agit de la force du signal de la cible antigénique. La fluorescence de l'anticorps secondaire IgG anti-humain couplé à l'Alexa-Fluor 546 est utilisée. Il est calculé selon la formule suivante :

$$HS = (F_{\text{protéine}} - F_{\text{moyenne}}) / SD$$

$F_{\text{protéine}}$ correspond à la fluorescence de la cible dans le spot de laquelle la fluorescence autour de ce spot est soustraite. A cette valeur est ensuite soustraite la fluorescence correspondante sur la puce contrôle.

F_{moyenne} est la moyenne de toutes les $F_{\text{protéine}}$ de toutes les cibles de la puce sans les protéines contrôles.

SD est la Déviation Standard de toutes $F_{\text{protéine}}$ de toutes les cibles de la puce sans les protéines contrôles.

Le HS d'une cible est la moyenne des HS des deux cibles du duplicat. Ce score a une distribution gaussienne. Une valeur seuil de positivité de 2 a été établie par le fabricant.

b. Interaction Score (IS)

L'IS est l'affinité de la liaison entre l'anticorps présent dans l'échantillon du patient et une protéine cible. Il est calculé selon la formule suivante :

$$IS = (HS / F_{GST\psi\ spot}) * 10\ 000$$

HS : Hit Score de la protéine cible

$F_{GST\psi\ spot}$ correspond à la moyenne de la fluorescence par le marquage par la streptavidine couplé à l'Alexa-Fluor 635 de la protéine cible. La fluorescence de la cible autour du spot est soustraite à la fluorescence dans le spot.

Une valeur seuil de 2 a été définie par le fabricant.

5. Analyses Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées par les logiciels XLSTAT-Premium, GraphPad Prism 6 et le site Biostatgv. Une *p value* inférieure à 0,05 est considérée comme statistiquement significative. Nous avons utilisé les tests non paramétriques de Mann-Whitney et Fisher. Pour évaluer les performances diagnostiques nous avons employé les sensibilités, spécificités, valeurs prédictives positives (VPP), valeurs prédictives négatives (VPN) et l'aire sous la courbe (AUC). L'AUC est calculé par une courbe *Receiver Operating Characteristic* (ROC) au risque α de 0,05. Nous avons utilisé une classification ascendante hiérarchique (CAH) non supervisée pour analyser les résultats des HS avec le logiciel XLSTAT-Premium. Cette méthode permet de classer les cibles et les individus sans que leurs diagnostics soient pris en compte. La CAH génère deux dendrogrammes montrant la distance entre les individus dans une dimension et la distance entre les cibles dans l'autre. La représentation visuelle de la CAH est la carte thermique (*heat map*). Dans la *heat map*, les valeurs normalisées des HS générées par la CAH sont représentées selon une échelle de couleur : de vert les protéines fortement exprimées (>2) à rouge les protéines faiblement exprimées (<2). Pour éliminer les protéines dont les HS ne sont pas contributifs pour l'analyse, nous avons appliqué le filtre de l'écart interquartile. L'écart interquartile pour une cible antigénique étudiée est une mesure de la dispersion de ses HS dans l'ensemble des individus étudiés, définie par la différence entre le 3^{ème} quartile et le 1^{er} quartile. Les protéines dont l'écart interquartile est inférieur à 0,25 sont éliminées de l'analyse (variabilité faible des HS).

III. RESULTATS

A. Caractéristiques clinico-biologiques des échantillons analysés

Nous avons analysé par HuProt™ les échantillons de dix-neuf patients PCA, sept sujets sains et une IgIV. Dans la première série de manipulation, les sérums de dix patients ont été comparés à l'échantillon d'IgIV. Dans la seconde série, neuf patients ont été comparés aux sept sujets sains. Les patients ne sont pas statistiquement différents entre les deux séries (Table IV). Concernant les sujets sains, l'âge moyen était de 32 ans [20-50], il y avait six femmes et un homme.

Tableau IV. Caractéristiques clinico-biologiques de la cohorte des patients avec une PCA.

Patients PCA		Série 1	Série 2	p
Age moyen (année)		47 [33-63]	47 [36-70]	n.s.
Durée moyenne d'évolution de la PCA (années)		11,3 [1-41]	8,6 [<1-30]	n.s.
Durée moyenne de conservation des prélèvements (mois)		30,3 [2-57]	18,6 [1-70]	n.s.
Sexe	Femme	7	3	n.s.
	Homme	3	6	

PCA : Polychondrite Chronique Atrophiante ; n.s.: non significatif.

B. Contrôle de la qualité des HuProt™

1. Contrôle de la qualité de la manipulation

Cambridge Protein Array® effectue une étape de contrôle de la qualité après l'acquisition des images par le scanner. Elle sert à vérifier la performance du test et permet de valider la manipulation. Les images issues de l'acquisition à 633 nm de la streptavidine Alexa-Fluor® 635 qui révèle les anticorps anti-GST sont utilisées car toutes les protéines de la puce sont marquées. D'abord, une inspection visuelle des puces est réalisée afin d'éliminer les éventuels amas de fluorescence et artefacts (Figure 4). La protéine GST contrôle présente à des concentrations croissantes est vérifiée car elle permet d'apprécier la qualité du

marquage par l'anticorps anti-GST et d'estimer la quantité relative de protéines présentes au niveau de chaque spot.

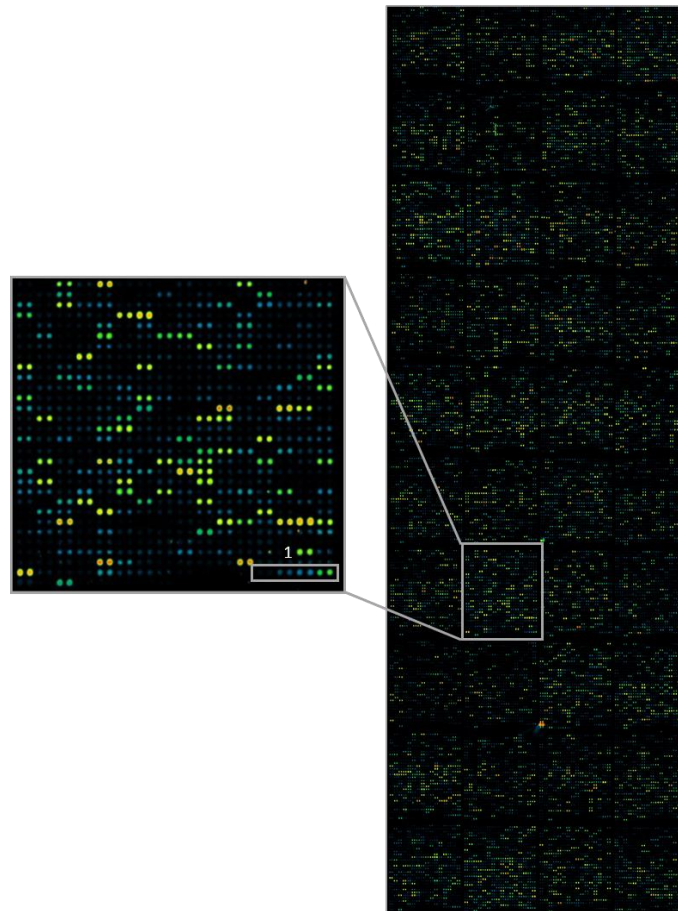


Figure 4. Détection de l'anticorps anti-GST sur HuProt™. La détection de la streptavidine Alexa-Fluor® 635 à la fluorescence d'excitation de 633nm révèle les anticorps anti-GST. L'encart 1 montre les spots de GST qui sont à des concentrations croissantes.

2. Vérification de la validité diagnostique de HuProt™

Préalablement à l'analyse des patients PCA, nous avons vérifié la validité diagnostique de HuProt™ par l'analyse des échantillons des patients qui ont une maladie auto-immune bien définie comme la cirrhose biliaire primitive, le lupus érythémateux disséminé et le syndrome des anti-synthétases anti-Jo1. L'anticorps anti-mitochondrie (dihydrolipoamide S-acetyltransferase qui est un composant du complexe E2 pyruvate deshydrogénase) est retrouvé avec HuProt™ dans l'échantillon du patient atteint de cirrhose biliaire primitive. L'anticorps anti-protéine ribosomale P2 est retrouvé chez le patient présentant un lupus érythémateux disséminé. Ce patient avait un anticorps anti-protéine ribosomale P avec les techniques diagnostiques de routine. Enfin, nous retrouvons avec

HuProt™ l'anticorps anti-histidyl-tRNA synthétase (Jo1/HARS) chez le patient atteint du syndrome des anti-synthétases (Figure 5).

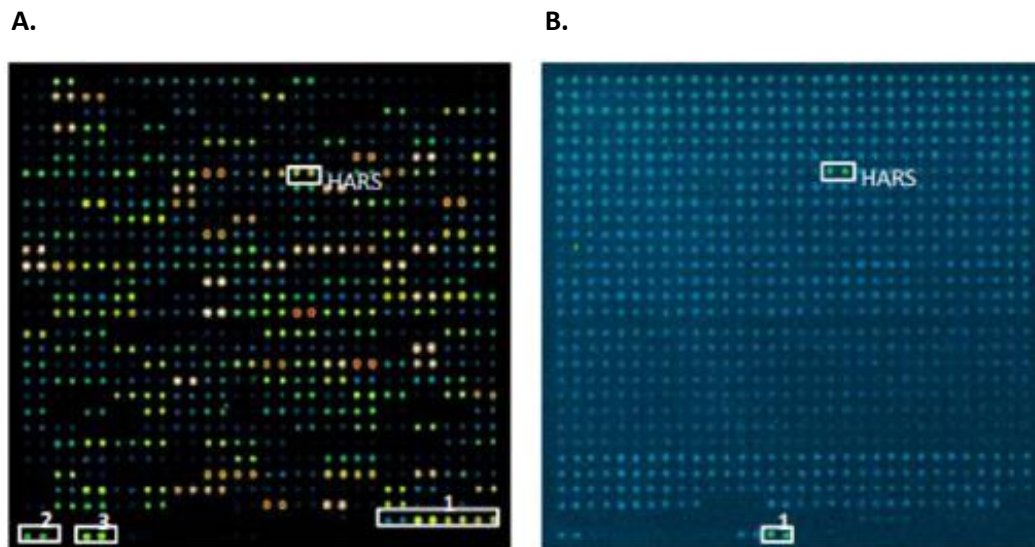


Figure 5. Détection de l'anticorps anti-histidyl-tRNA synthetase (HARS/Jo1) par HuProt™. (A) La détection de la streptavidine Alexa-Fluor® 635 à la fluorescence d'excitation de 633nm révèle les anticorps anti-GST. Parmi les contrôles présentés dans le matériel et méthode, trois sont mis en évidence dans cette figure : les encarts 1, 2, 3 montrent les contrôles, respectivement le GST à des concentrations croissantes, la biotine et le BSA-biotinylé. L'encart HARS montre la position des protéines HARS. (B) La détection de l'IgG anti-humain Alexa-Fluor® 546 à la fluorescence d'excitation de 532 nm montre les auto-anticorps anti-protéine HARS. L'encart 1 est une protéine contrôle fluorescente non couplée avec le GST.

C. Recherche des anticorps déjà décrits dans la littérature

1. Auto-antigènes décrits dans la PCA

Les auto-antigènes identifiés précédemment dans la littérature et présents sur HuProt™ sont : les collagènes II et IX, la matriline-1, le COMP, la tubuline α , l' α -enolase, la vimentine, la calreticuline et la desmine (19,20,25,40,43). Chez les patients et les contrôles (IgIV et sujets sains), nous avons recherché une positivité de ces auto-antigènes avec un HS supérieur à 2 (Figure 6). Les sous-unités $\alpha 2$ du collagène IX et le collagène XI ne sont pas présentes sur HuProt™. La protéine COMP a un HS supérieur à 2 chez les patients PCA -12, -13, -14, -15, -17, -18 et -19 et chez tous les sujets sains. Il n'y a pas de différence significative de HS entre les patients et les contrôles pour COMP. Les IS étaient inférieurs à 2.

Les autres auto-anticorps reconnaissant les autres cibles décrites dans la littérature ne sont pas retrouvés dans les échantillons (HS<2).

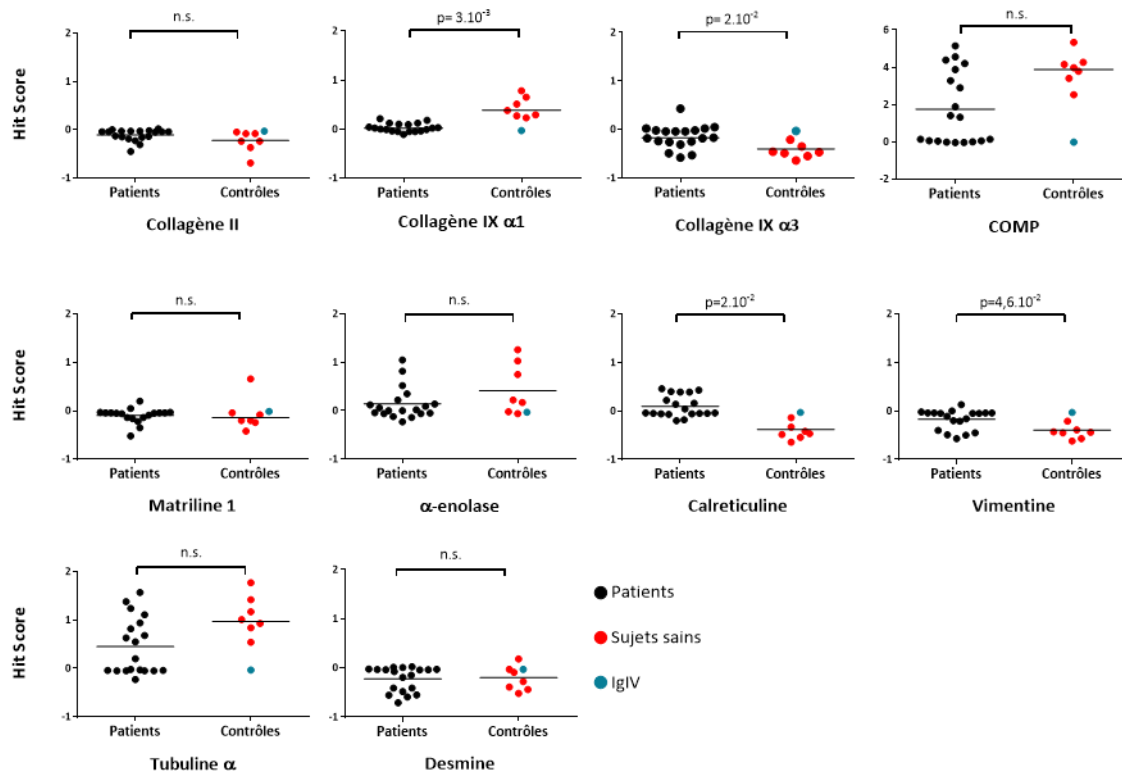


Figure 6. HS des auto-antigènes décrits dans la PCA chez les patients PCA et les contrôles : le collagène II, le collagène IX $\alpha 1$, le collagène IX $\alpha 3$, le COMP, la matriline-1, l' α -enolase, la calréticuline, la vimentine, la tubuline α , et la desmine. n.s. non significatif.

2. Auto-antigènes décrits dans les maladies associées à la PCA

Nous avons recherché chez les patients et les sujets sains les auto-antigènes reconnus par les auto-anticorps présents dans les maladies associées à la PCA (Tableau V). Les auto-antigènes *2-oxoglutarate dehydrogenase* (OGDH), protéine ribosomale P2, l'annexine II et *Sicca Syndrome type B* (SSB) ont un HS supérieur à 2 mais des IS inférieurs à 2. OGDH est retrouvé chez tous les sujets sains et les patients PCA -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18 et -19, la protéine ribosomale P2 chez PCA -17 et -18 et healthy 1, l'annexine II chez PCA-19 et deux sujets sains healthy 3 et 4 et SSB chez deux patients PCA-16 et -18. L'histone H1 a un HS de 9,39 et un IS de 98,6 chez le patient PCA-3. Pour le patient PCA-7, *Glutamate Acid*

Decarboxylase (GAD) avait un HS et un IS supérieur à 2. Pour le patient PCA-19, l'auto-antigène glycoprotéine 210 (Gp210) avait un HS et IS supérieur à 2. L'auto-antigène myéloperoxydase (MPO) a un HS de 4,01 et un IS de 2,49 chez le sujet sain healthy 6.

Tableau V. Auto-antigènes décrits dans les maladies associées à la PCA présents et absents de la puce HuProt™ (72–74).

Présents sur HuProt™		Absents de HuProt™
Connectivites		
U1-RNP Sm PCNA CCP Ribosomes P0, P1, P2 Centromères	Scl70 PM-Scl SSB Histones H1, H2A et H3	TRIM 21 Filagrine Histones H2B et H4
Syndrome des anti-phospholipides		
β2GPI Annexine II Annexine V	Thrombine	PS Cardiolipine
Vascularite à ANCA		
PR3 MPO LBR Lactoferrine CathepsineG Elastase	Lysosyme Hlamp2 Azurocidine BPI β glucuronidase	
Endocrinopathies auto-immunes		
GAD Ilots de langerhans Insuline IA2	Récepteur de la TSH TPO	Thyroglobuline
Cirrhose biliaire primitive		
Gp210 Sp100 Sp140 PML	Nucleoporine 62 Mitochondries type M2 : PDH et OGDH	

Les protéines en gras sont retrouvées chez un ou plusieurs individus avec un HS supérieur au seuil de 2. β2GPI : β 2 glycoprotéine I ; BPI : *Bactericidal/Permeability Increasing protein* ; CCP : *citrullinated cyclic peptide* ; GAD : *Glutamate Acid Decarboxylase* ; Gp210 : glycoprotéine 210 ; Hlamp2 : *human lysosomal membran protein 2* ; IA2 : tyrosine phosphatase IA-2 ; LBR : *Lamine B Receptor* ; MPO : myéloperoxydase ; Anticorps anti-mitochondrie type M2 comprend la recherche d'anticorps anti-pyruvate déshydrogénase (PDH) et *2-oxoglutarate dehydrogenase* (OGDH) ; PML : *Promyelocyte Leukemia* ; PCNA : *Proliferating Cell Nuclear Antigen* ; PR3 : protéinase 3 ; PS : Phosphatidyl-Sérine ; Scl70 : ADN topoisomérase I ; SSB : *Sicca Syndrome type B* ; TPO : Thyropéroxydase ; TSH : *Thyroid Stimulating Hormon* ; U1-RNP : *U1 ribonucleoprotein*.

D. Analyse de l'expression des *Hit Score* des cibles protéiques

1. Dépendance des résultats au jour de réalisation de la manipulation

Nous avons choisi d'utiliser la *heat map* (carte thermique) comme outil exploratoire statistique. La *heat map* des HS permet de classer dans le même temps les protéines et les

individus (Figure 7). Par le filtre de l'écart interquartile sans tenir compte de valeurs seuil de HS (seuil de positivité à 2), 5458 protéines sont retirées de l'analyse sur 22272.

Avec cette méthode, nous avons observé une différence de distribution des résultats en fonction du jour de la manipulation, créant ainsi une ségrégation des individus selon le jour de la réalisation des HuProt™. Il n'est donc pas possible d'analyser l'ensemble des données de façon globale. Nous avons donc pris la décision d'analyser séparément les deux séries de manipulations. La première série comporte dix patients PCA et IgIV et la seconde neuf patients PCA et sept sujets sains. Nous nous sommes focalisés sur la seconde série car l'analyse est plus pertinente statistiquement au vu du plus grand nombre d'échantillons contrôles.

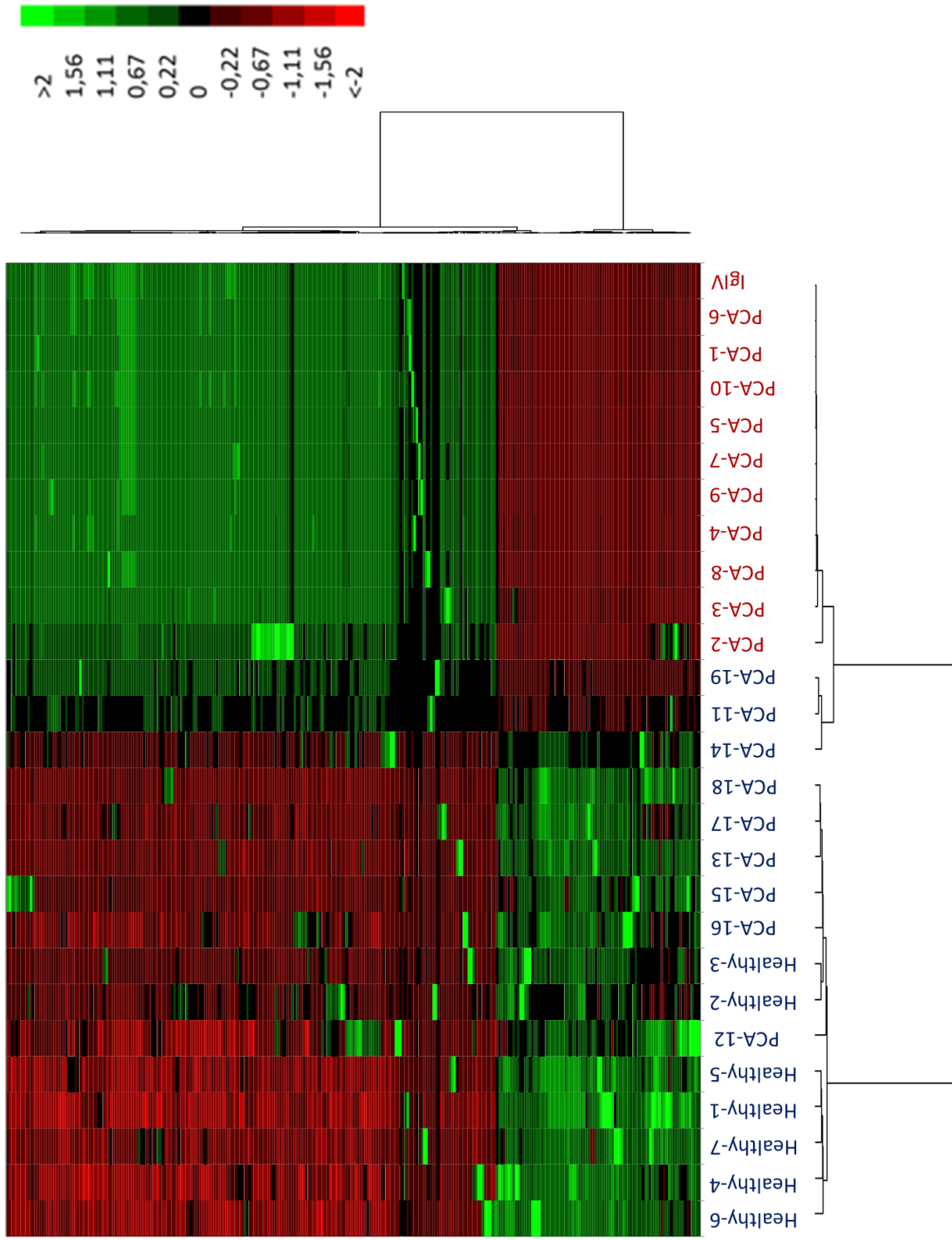


Figure 7. Distribution des résultats selon le jour de la manipulation. Chaque ligne représente une protéine et chaque colonne un individu. Les individus de la première série de manipulation sont en rouge, ceux de la seconde en bleu. Les deux dendrogrammes ségrègent les individus et les protéines. Valeurs normalisées de HS : >2 vert plus exprimé ; <2 rouge moins exprimé. PCA : patients PCA. Healthy : sujets sains IgIV : Immunoglobuline intraveineuse.

2. Différence de répertoire d'auto-anticorps entre les patients PCA et les sujets sains

Dans un premier temps, nous avons étudié le profil de reconnaissance de toutes les protéines de la puce simultanément chez les patients et chez les sujets sains. Nous avons dans ce but réalisé une *heat map* avec les HS de toutes les protéines de HuProt™ des échantillons de la seconde série de manipulation (9 patients et 7 sujets sains) indépendamment du seuil de HS (Figure 8). Le filtrage par l'écart interquartile a éliminé 11218 protéines de l'analyse sur 22272. Nous avons ensuite séparé deux grands groupes d'individus, le premier est composé des patients PCA-11, -19 et -14 et des sujets sains healthy-2, -3 et le second des patients PCA-12, -13, -15, -16, -17 et -18 et les sujets sains healthy-1, -4, -5, -6, -7. Il est important de noter que dans chaque grand groupe, les sous-groupes ne contiennent soit que des malades soit que des sujets sains. L'ensemble des données des puces montre qu'il est possible de séparer les données des patients et des sujets sains sans supervision. Cela signifie qu'il existe bien des profils d'anticorps différents entre les patients et les sujets sains.

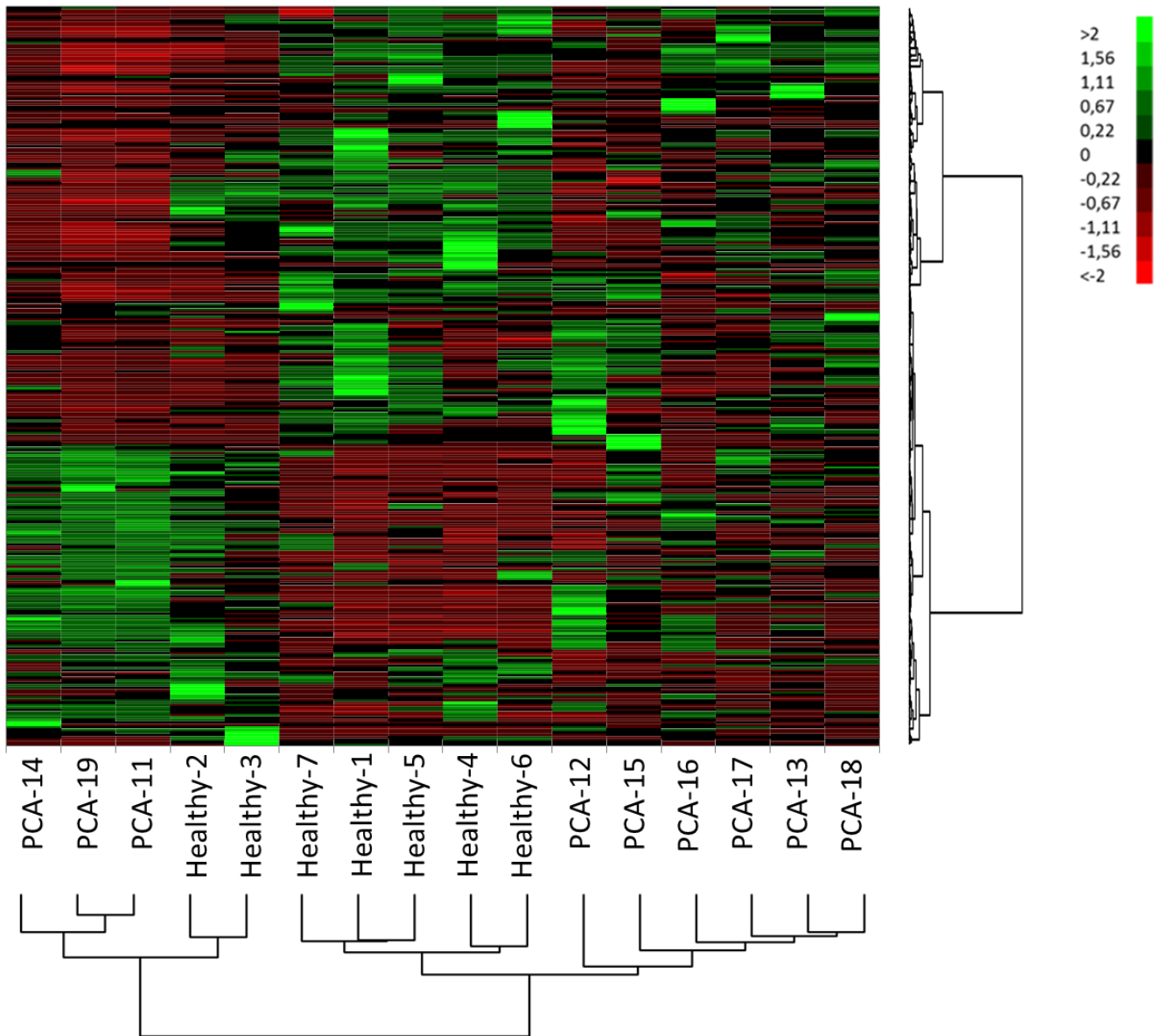


Figure 8. Répertoire d'auto-anticorps chez les patients PCA et les sujets sains. Chaque colonne représente un individu et chaque ligne une protéine. Les deux dendrogrammes ségrégent les individus et les protéines. Valeurs normalisées de HS : >2 vert plus exprimé ; <2 rouge moins exprimé. PCA : patients PCA. Healthy : sujets sains.

Pour affiner l'étude, nous avons sélectionné les protéines avec un HS supérieur à 2 chez au moins deux patients ($n=677$). Nous avons appliqué comme dernier filtre, un IS supérieur à 2. Dix-sept cibles protéiques correspondent ainsi à ces restrictions : *ABI3 family member 3* (ABI3), *Lymphocyte Specific Protein 1* (LSP1), *Membrane Associated Guanylate kinase* (MAGI1), *Dystrobrevin Binding Protein 1* (DTNBP1), *RAB11 Family Interacting Protein*

1 (RAB11FIP1), Taxiline β (TXLNB), Coiled-Coil Domain Containing 97 (CCDC97), HCLS1 Binding Protein 3 (HS1BP3), SUMO-activating enzyme subunit 2 (UBA2), Disabled homologue 1 (DAB1), Calpastatine (CAST), Retinol Deshydrogenase 16 (RDH16) et SH3 domain Binding Protein 2 (SH3BP2), Prolin Rich Haell subfamily 1 (PRH1) et UCN3 Urocortine 3 (UCN3) ABI3 (ABI family member 3), Coiled-Coil Domain Containing 107 (CCDC107), RING Finger protein 13 (RNF13).

Nous avons ensuite réalisé une *heat map* à partir des HS de ces cibles (Figure 9). Le filtre de l'écart interquartile élimine deux protéines : CCDC107 et RNF13 (indiquant que la dispersion des valeurs était faible).

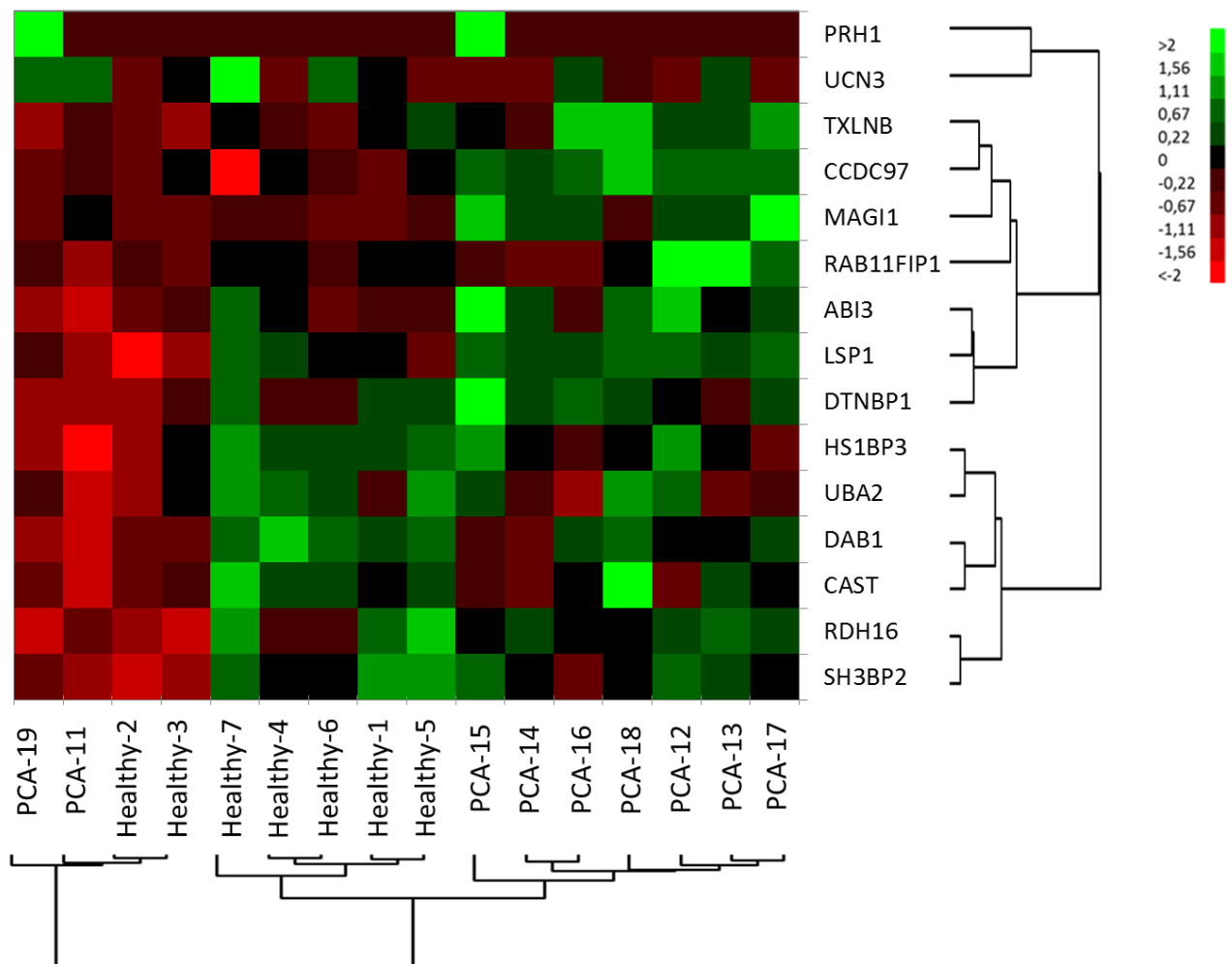


Figure 9. Quinze cibles protéiques permettent de distinguer les sujets sains et les patients PCA. Chaque colonne représente un individu et chaque ligne une protéine. Les deux dendrogrammes ségrégent les individus et les protéines Valeurs normalisées de HS : >2 vert plus exprimé ; <2 rouge moins exprimé. PCA : patients PCA. Healthy : sujets sains.

Cette *heat map* sur les 15 protéines sélectionnées montre une distribution comparable à celle réalisée sur l'ensemble des protéines de la puce. Les individus sont dissociés en deux groupes. Le premier comprend deux sous-groupes distincts de sept patients avec une PCA et de cinq sujets sains. Le second comprend deux patients et deux sujets sains. Cette analyse montre qu'il est donc possible de ségréger les patients et les malades à l'aide de 15 cibles protéiques. Le dendrogramme des protéines isole trois grands groupes. Le premier groupe se compose de TXLNB, CCDC97, MAGI1, RAB11FIP1, ABI3, LSP1, DTNBP1 dont les auto-anticorps sont plus exprimés chez les patients par rapport aux sujets sains. Un deuxième groupe : SH3BP2, HS1BP3, UBA2, DAB1 et CAST dont les HS sont plus exprimés chez les sujets sains. Et un troisième groupe PRH1 et UCN3 qui peut être présent chez les patients et les sujets sains. A la lumière de cette analyse, il semblerait que les cibles antigéniques du premier groupe soient celles qui sont les plus contributives pour le diagnostic de la PCA.

3. Corrélation clinico-biologique

Les données cliniques et biologiques des malades sont indiquées dans le tableau suivant (Tableau VI). Le patient PCA-16 est le seul avec un syndrome myélodysplasique associé à la PCA. Nous n'observons pas de corrélation entre la ségrégation des patients mise en évidence précédemment (Figure 9) et les caractéristiques clinico-biologiques des patients.

Nous n'avons pas trouvé de différences entre les patients des deux groupes : PCA-11 et -19 et PCA-12, -13, -14, -15, -16, -17 et -18 (Table VII).

Tableau VI. Caractéristiques clinico-biologiques des patients de la seconde série de manipulation.

Patients de la seconde série de manipulation		PCA 11	PCA 12	PCA 13	PCA 14	PCA 15	PCA 16	PCA 17	PCA 18	PCA 19
Données démographiques	Age au moment du prélèvement (années)	49	38	40	36	47	70	60	37	44
Sexe		F	M	M	F	M	M	F	M	M
	Durée d'évolution de la maladie (année)	15	2	1	2	5	12	30	N.D.	<1
	Chondrite auriculaire	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	N.D.	oui
	Oreille en choux	oui	oui	non	non	non	non	non	N.D.	non
	Chondrite nasale	oui	non	oui	oui	non	oui	oui	N.D.	non
	Nez en "selle"	non	non	non	oui	non	non	non	N.D.	non
	Perte auditive	non	non	non	oui	non	non	non	N.D.	oui
	Dysfonction vestibulaire	non	non	non	non	non	non	non	N.D.	non
	Atteinte laryngée	non	non	oui	non	oui	oui	oui	N.D.	non
	Atteinte tracheal	non	non	non	non	non	non	non	N.D.	non
	Arthrite	oui	non	oui	oui	non	oui	oui	N.D.	oui
	Atteinte oculaire	oui	oui	non	oui	oui	oui	non	N.D.	oui
	Atteinte aortique	non	non	non	non	non	non	non	N.D.	non
	Arterite des gros vaisseaux	non	non	non	non	non	non	non	N.D.	non
	Atteinte cutanée	non	non	non	non	non	oui	non	N.D.	oui
	Myelodysplasie	non	non	non	non	non	oui	non	N.D.	non
	Poussée	non	oui	oui	oui	non	N.D.	non	N.D.	oui
	RPDAI	0	10	19	25	0	N.D.	0	N.D.	11
	Traitement	oui	oui	oui	oui	oui	N.D.	oui	N.D.	non
	CRP (mg/l)	<5	18	<5	82	<5	24	<5	<5	35
	Aspect et dilution en immunofluorescence indirecte sur cellules Hep2	N.D.	Moucheté-1/80	Négatif	Moucheté-1/80 et Homogène 1/80	N.R.	N.R.	Moucheté-1/160 et Homogène 1/160	N.D.	Négatif
	Recherche ENA	N.D.	N.R.	N.R.	Négative	N.R.	N.R.	Négative	N.D.	Négative
	Recherche ANCA	N.D.	Négative	Négative	Négative	N.R.	N.R.	N.R.	N.D.	Négative
	EPP	N.D.	Normale	Normale	N.R.	N.R.	N.R.	Hypogammaglobulinémie	N.D.	Normale

ANCA : Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles, CRP : protéine C réactive Recherche d'ENA : Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles. EPP : électrophorèse des protéines, N.D. Non disponible, N.R. Non réalisé, PCA : patients PCA

Tableau VII. Caractéristiques des deux groupes de patients ségrévés avec les protéines cibles d'intérêts.

Patients PCA		PCA-11-19	PCA-12-13-14-15-16-17-18	P
Age moyen (année)		47 [44-49]	47 [36-70]	n.s.
Durée moyenne d'évolution de la PCA (années)		7,3 [<1-15]	8,9 [1-30]	n.s.
Durée moyenne de conservation des prélèvements (mois)		37 [5-69]	13,3 [1-70]	n.s.
Sexe	Femme	1	2	n.r.
	Homme	1	5	

PCA : Polychondrite Chronique Atrophiante ; n.s. : non significatif ; n.r. : non réalisable.

4. Contribution au diagnostic de la PCA des cibles protéiques d'intérêts

Nous avons déterminé pour chaque protéine cible identifiée par la *heat map* un seuil de positivité du HS (de contribution diagnostique) par l'analyse d'une courbe ROC. A partir de ces seuils, nous avons calculé les sensibilités, spécificités, VPP et VPN pour chacune de ces protéines (Tableau VIII).

Tableau VIII. Valeur diagnostique des cibles protéiques d'intérêts.

Symboles	Noms	AUC	HS Seuil	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)
Groupe 1							
TXLNB	Taxiline β	0,730	13	67	86	86	67
CCDC97	<i>Coiled-Coil Domain Containing 97</i>	0,841	20	78	100	100	78
MAGI1	<i>Membrane Associated Guanylate kinase</i>	0,889	20	78	100	100	78
RAB11FIP1	<i>RAB11 family interacting protein 1</i>	0,540	8	44	100	100	58
ABI3	<i>ABI family member 3</i>	0,619	17	56	86	83	60
LSP1	<i>Lymphocyte Specific Proteine 1</i>	0,794	13	67	86	86	67
DTNBP1	<i>Dystrobrevin Binding Protein 1</i>	0,587	12	56	57	63	50
Groupe 2							
HS1BP3	<i>HCLS1 Binding Protein 3</i>	0,317	12	33	14	33	14
UBA2	<i>SUMO-activating enzyme subunit 2</i>	0,349	13	33	43	43	33
DAB1	<i>Disabled homologue 1</i>	0,286	11	22	43	33	30
CAST	Calpastatine	0,333	14	22	43	33	33
RDH16	<i>Retinol Deshydrogenase 16</i>	0,508	12	11	57	25	33
SH3BP2	<i>SH3 domain Binding Protein 2</i>	0,413	10	0	71	0	36
Groupe 3							
UCN3	Urocortine 3	0,429	2	33	71	60	46
PRH1	<i>Prolin Rich Haell subfamily 1</i>	0,746	2	22	100	100	50

AUC : aire sous la courbe, HS : Hit Score, VPN : valeur prédictive négative, VPP : valeur prédictive positive.

a. Groupe 1 des cibles protéiques d'intérêts

Dans ce groupe, nous retrouvons les protéines TXLNB, CCDC97, MAGI1, ABI3, LSP1, DTNBP1 et RAB11FIP1. La figure 10 présente les HS de ces protéines chez les patients PCA et les sujets sains. Les HS des cibles CCDC97 et MAGI1 sont significativement plus élevés chez les patients par rapport aux sujets sains (respectivement $p=3.10^{-2}$ et $p=8.10^{-3}$). Pour les autres protéines il n'y a pas de différence significative.

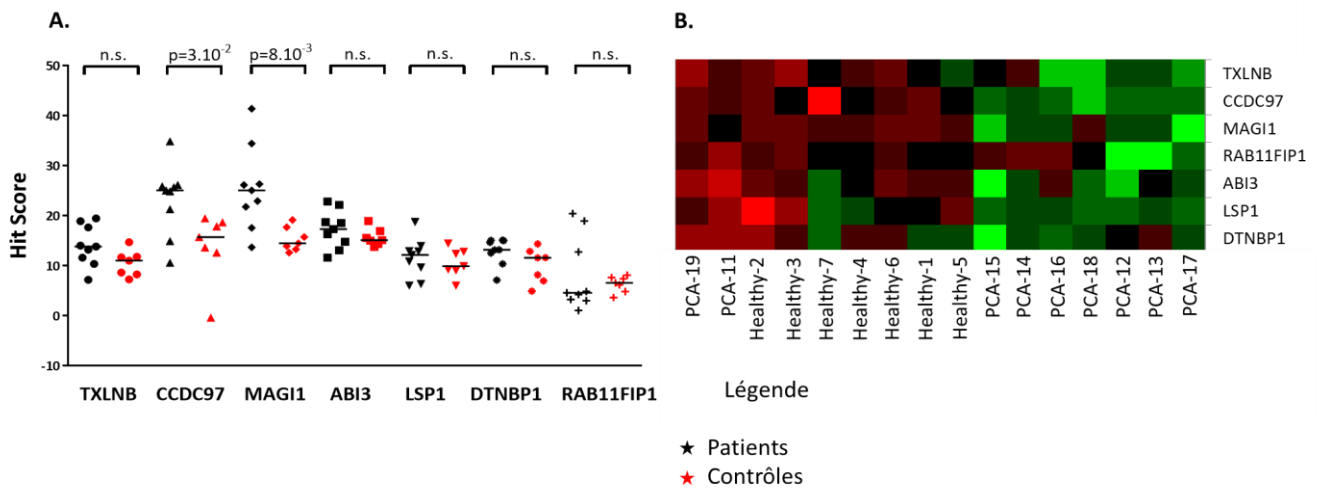


Figure 10. Groupe 1 des cibles protéiques d'intérêts : TXLNB, CCDC97, MAGI1, ABI3, LSP1, DTNBP1 et RAB11FIP1. (A) Distribution des HS des protéines du groupe 1 chez les patients PCA et les sujets sains. (B) *Heat map* des protéines du groupe 1 chez les patients PCA et les sujets sains. Healthy : sujets sains, PCA : patients PCA, n.s. non significatif.

b. Groupe 2 des cibles protéiques d'intérêts

Ce second groupe comprend les protéines HS1BP3, UBA2, DAB1, CAST, RDH16 et SH3BP2. La figure 11 montre la distribution des HS de ces protéines chez les patients et les sujets sains. Il n'y a pas de différence significative du HS pour chaque protéine entre les patients et les sujets sains.

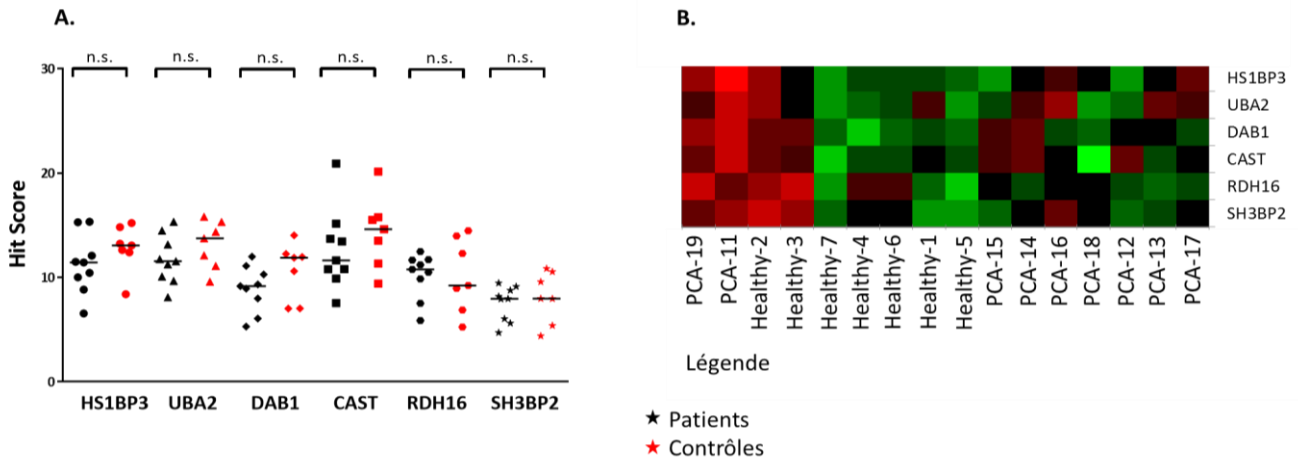


Figure 11. Groupe 2 des cibles protéiques d'intérêts : HS1BP3, UBA2, DAB1, CAST, RDH16 et SH3BP2. (A) Distribution des HS des protéines du groupe 2 chez les patients PCA et les sujets sains. (B) *Heat map* des protéines du groupe 2 chez les patients PCA et les sujets sains. Healthy : sujets sains, PCA : patients PCA, n.s. non significatif.

c. Groupe 3 des cibles protéiques d'intérêts

Le dernier groupe de cibles comprend les protéines PRH1 et UCN3. La figure 12 montre la distribution des HS des deux protéines chez les patients et les sujets sains. Les HS de chaque protéine ne sont pas différents statistiquement entre les patients et les sujets sains.

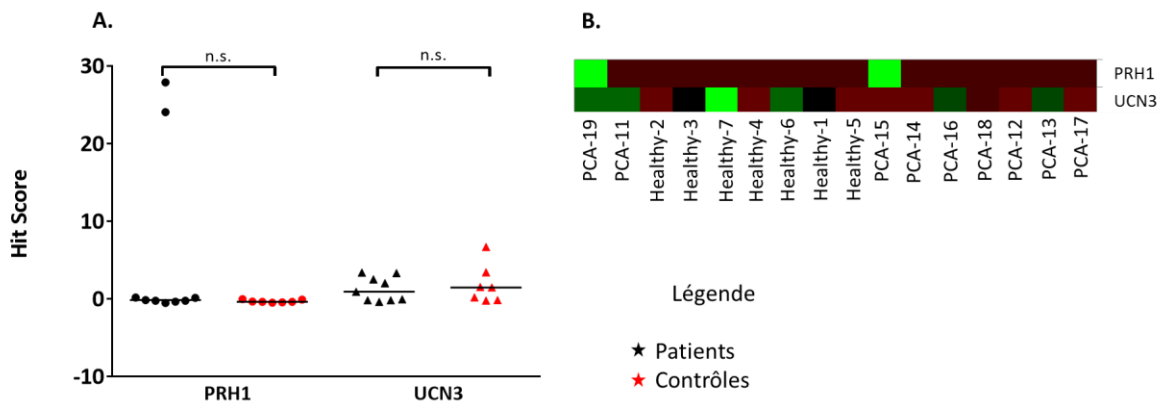


Figure 12. Groupe 3 des cibles protéiques d'intérêts : PRH1 et UCN3. (A) Distribution des HS des protéines du groupe 3 chez les patients PCA et les sujets sains. (B) *Heat map* des protéines du groupe 3 chez les patients PCA et les sujets sains. Healthy : sujets sains, PCA : patients PCA, n.s. non significatif.

5. Sélection des biomarqueurs pour le diagnostic de la PCA

Les résultats de l'exploration des puces à protéines ne mettent pas en évidence une cible protéique unique mais plusieurs combinaisons. Nous avons schématisé les résultats de la *heat map* (Figure 9) dans le but d'identifier les liens entre les combinaisons de protéines et la répartition des individus (Figure 13). De cette analyse nous en tirons deux informations. Premièrement, le groupe de protéines ABI3, LSP1, CCDC97, MAGI1, TXLNB, DTNBP1, RAB11FIP1 est exprimé de manière plus forte chez les patients PCA -12, -13, -14, -15, -16, -17 et -18. On peut supposer que la présence de cette combinaison de cibles chez des patients pourrait être corrélée avec la présence de la maladie. La seconde information est que les protéines DAB1, CAST, SH3BP2, HS1BP2, RDH16 et UBA2 semblent plus exprimées chez les sujets sains. On pourrait supposer que la présence de cette combinaison de cibles exclurait la maladie.

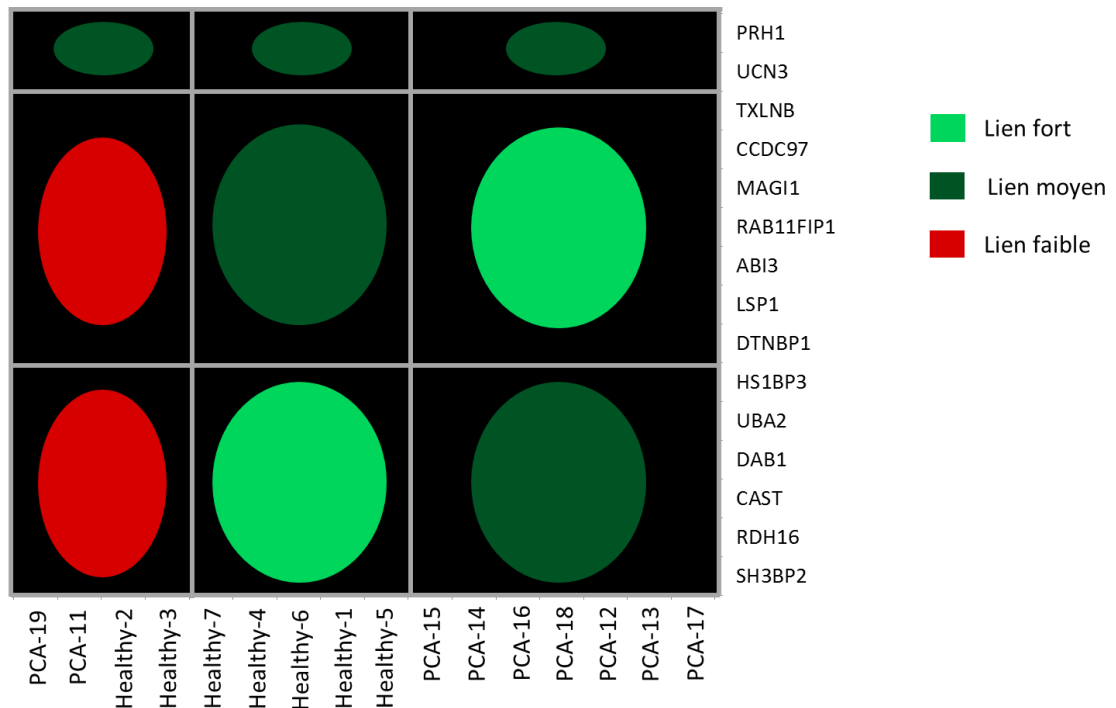


Figure 13. Schéma d'interprétation des résultats de HuProt™. Les couleurs représentent le lien entre la combinaison de cibles et les individus. PCA : patients PCA, healthy : sujets sains.

Avec les nouveaux seuils d'HS (Table VIII), nous avons déterminé que lorsque quatre des auto-anticorps du groupe 1 (TXLNB, CCDC97, MAGI1, ABI3, LSP1, DTNBP1 et RAB11FIP1) étaient présent dans le sérum, la sensibilité diagnostique est 78%, la spécificité 100%, la VPP 100% et la VPN 78%. Si on considère que la présence d'auto-anticorps du groupe 2 (HS1BP3, UBA2, DAB1, CAST, RDH16 et SH3BP2) dans le sérum exclut la maladie, lorsque que trois de ces auto-anticorps sont présents, la probabilité que l'individu soit sain est 83% (VPP du test). La probabilité qu'il soit malade quand ces anticorps sont absents est alors 80% (VPN du test).

6. Analyse complémentaire des échantillons de la première série de patients

Nous avons voulu confirmer dans la première série la présence des auto-anticorps retrouvés dans la deuxième série de manipulation. Nous avons appliqué les mêmes critères de sélection des protéines que précédemment (les cibles dont les HS et IS sont supérieurs à 2). Parmi les protéines reconnues que nous avons décrites, nous avons retrouvés CAST et MAGI1 chez 33% (n=3/10) de ces patients, Les anticorps anti-DAB1, HS1BP3 et UCN3 sont retrouvés chez un malade sur 10 (Figure 14). Certains anticorps sont donc retrouvés dans les deux séries en dépit de biais venant de la réalisation de ces séries à des dates différentes.

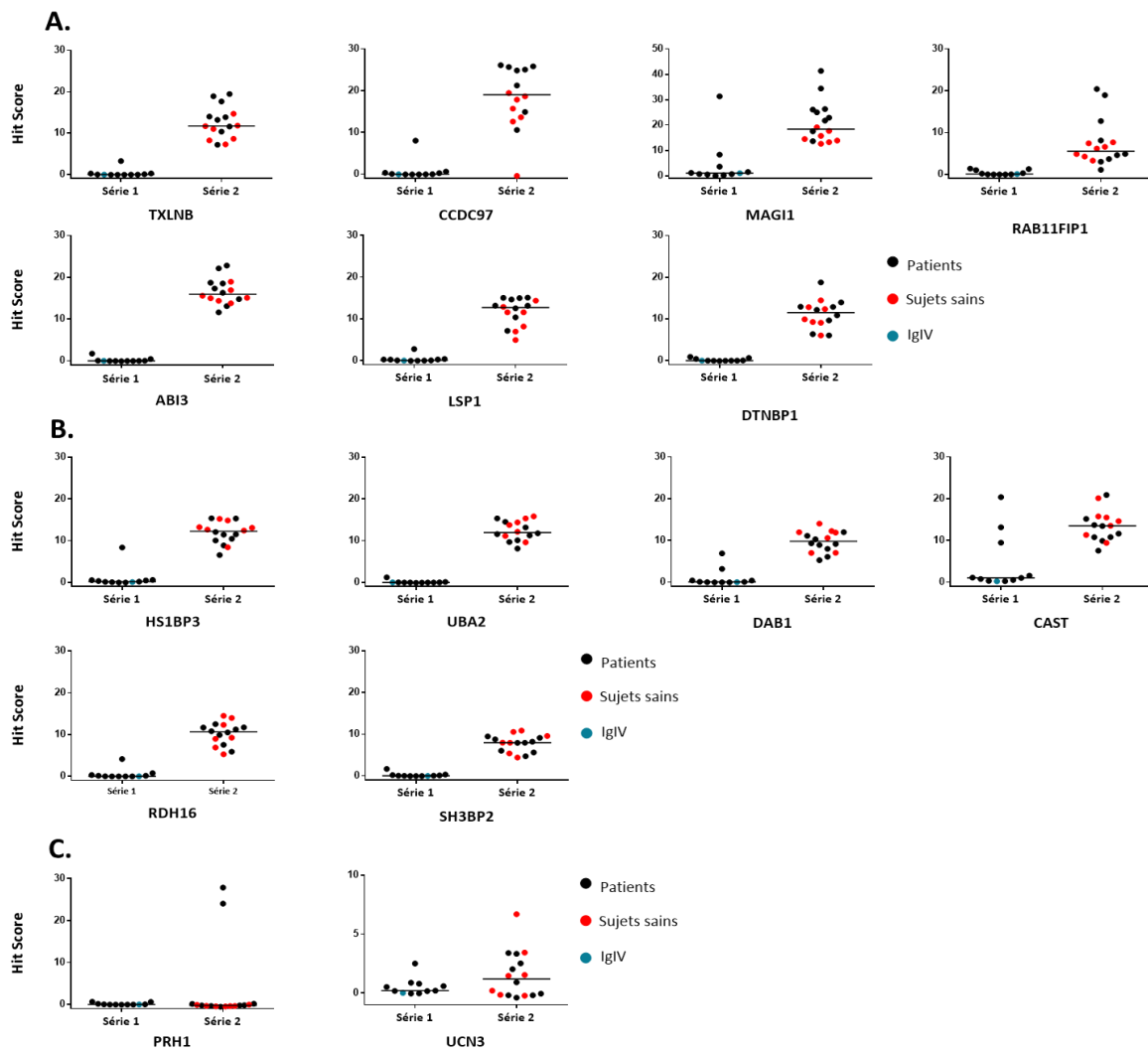


Figure 14. HS des cibles protéiques d'intérêt dans les deux séries de manipulations. (A) Groupe 1 des protéines TXLNB, CCDC97, MAG11, RAB11FIP1, ABI3, LSP1 et DTNBP1. (B) Groupe 2 des protéines HS1BP3, UBA2, DAB1, CAST, RDH16 et SH3BP2 (C) Groupe 3 des protéines PRH1 et UCN3.

IV. DISCUSSION

L'objectif du travail réalisé était l'identification de nouveaux biomarqueurs de la PCA. Le diagnostic biologique de la maladie reste de nos jours un défi. Ce travail est fondé sur l'hypothèse qu'il pourrait exister des auto-anticorps qui n'ont pas encore été identifiés. Leur identification permettrait alors d'améliorer et accélérer le diagnostic de la maladie. Les puces à protéines HuProt™ sont une technologie nouvelle qui permet d'analyser simultanément des milliers de cibles protéiques pour un même échantillon. Il nous a semblé intéressant d'évaluer cette technique sur des patients atteints de PCA dont le diagnostic est certain. Nous avons recruté dix-neuf patients suivis dans le service de médecine interne 2 de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière et choisi deux types de contrôles, sept échantillons provenant de donneurs de sang issus de l'EFS (sujets sains) et un échantillon d'IgIV. Les âges et sexes des patients concordent avec les données épidémiologiques de la littérature (4,8).

Dans un premier temps, nous avons recherché les auto-anticorps décrits dans la littérature présents dans la PCA (19–22,25,43) et également dans les maladies auto-immunes associées à la PCA. De façon surprenante, nous n'avons retrouvés aucun de ces auto-anticorps répondant à nos critères de positivité (HS et IS supérieur à 2). Nous avons ensuite utilisé une méthode de classification non supervisée des résultats, la classification hiérarchique ascendante et sa traduction visuelle, la *heat map*. Dans la mesure où la *heat map* montrait une ségrégation des individus selon le jour de réalisation de la manipulation nous n'avons pas pu analyser l'ensemble des patients par une approche globale. En effet, la distribution des résultats a semblé dépendre du jour de la manipulation. Il était donc nécessaire d'analyser séparément les deux séries de manipulations. Nous avons décidé de concentrer nos efforts sur la seconde série qui comporte des sujets contrôles sains, la première série étant moins pertinente statistiquement car nous n'avions qu'un seul contrôle (IgIV).

L'analyse de la *heat map* a permis de mettre en évidence trois combinaisons de cibles protéiques. La première est composée de *ABI3 family member 3* (ABI3), *Lymphocyte Specific Protein 1* (LSP1), *Membrane Associated Guanylate kinase* (MAGI1), *Dystrobrevin Binding Protein 1* (DTNBP1), *RAB11 Family Interacting Protein 1* (RAB11FIP1), Taxiline β (TXLNB),

Coiled-Coil Domain Containing 97 (CCDC97), la seconde de *HCLS1 Binding Protein 3* (HS1BP3), *SUMO-activating enzyme subunit 2* (UBA2), *Disabled homologue 1* (DAB1), Calpastatine (CAST), *Retinol Deshydrogenase 16* (RDH16) et *SH3 domain Binding Protein 2* (SH3BP2) et la dernière des deux protéines *Prolin Rich Haell subfamily 1* (PRH1) et Urocortine 3 (UCN3). Aucun des patients n'avait dans son sérum l'ensemble des auto-anticorps décrits. La première combinaison de protéines est celle qui semble la plus discriminante car elle regroupe des anticorps les plus exprimés chez les malades par rapport aux sujets sains.

LSP1 et MAGI 1 sont exprimés dans la membrane cellulaire sur le versant intracellulaire. Les deux protéines sont impliquées dans la transduction du signal. LSP1 est une protéine du cytosquelette exprimée par les cellules de la lignée hématopoïétiques (lymphocytes T du cortex thymique, les lymphocytes B circulant, plasmocytes, macrophages et cellules dendritiques) et les cellules endothéliales. Elle a un rôle dans l'induction de l'inflammation par le recrutement des lymphocytes (75). Chez les personnes atteintes de polyarthrite rhumatoïde, le taux de LSP1 est bas (76). Les auteurs suggèrent qu'un taux bas de LSP1 diminue le seuil d'activation des lymphocytes T et donc augmenterait les capacités migratoires des cellules inflammatoires. MAGI1 est une protéine d'assemblage localisée aux jonctions cellule-cellule. Elle augmente l'adhésion des cellules à l'endothélium vasculaire et est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation intracellulaire (dont celle de la phosphatidylinositol-3-kinase PI3K). *In vitro*, l'expression anormale de MAGI1 influence l'adhésion et l'invasion des cellules cancéreuses, d'après Feng *et al.* MAGI1 pourrait être un suppresseur de tumeur (77). DTNBP1, CCDC97 et TXLNB sont des protéines cytoplasmiques. DTNBP1 est liée à la biogénèse des lysosomes dans les tissus neuronaux. CCDC97 est une protéine super enroulée qui agit comme un facteur de transcription. Un variant génétique de CCDC97 a récemment été décrit associé à la maladie coronarienne (78). La taxiline β est une syntaxine impliquée dans le trafic intracellulaire des vésicules. La protéine ABI3 est localisée dans le cytoplasme et le noyau. Elle régule la polymérisation de l'actine et agit dans la migration cellulaire. Elle a un rôle anti-oncogène car son expression ectopique réduirait la croissance cellulaire par induction de la sénescence (79). RAB11FIP1 est une GTPase de la membrane du réticulum endoplasmique. Elle a un rôle dans l'endocytose et le recyclage des vésicules.

Les anticorps de la seconde combinaison, HS1BP3, UBA2, DAB1, CAST, RDH16 et SH3BP2 sembleraient plus exprimés chez les sujets sains. On peut supposer que cette association permettrait d'exclure le diagnostic de la maladie. Il faut toutefois nuancer cette interprétation parce que deux sujets sains ne possèdent pas cette combinaison de cibles. DAB1, CAST et SH3BP2 sont des protéines cytoplasmiques. SH3BP2 est exprimée par les cellules hématopoïétiques et régule positivement les activités transcriptionnelles des lymphocytes T, NK et basophiles. Les mutations de ce gène provoquent un chérubisme (80). DAB1 est une protéine de la transduction du signal qui agit avec la voie des protéines kinases pour réguler la position neuronale au cours du développement par son action sur la protéine Reelin (glycoprotéine sécrétée par les neurones du cerveau en cours de développement). CAST est une protéine inhibitrice de la calpaïne (protéase calcium dépendante). Elle est impliquée dans l'exocytose des vésicules neuronales. Des auto-anticorps anti-CAST ont été décrits chez des patients atteints d'une polyarthrite rhumatoïde (81). RDH16 et HS1BP3 sont tous les deux présentes dans le réticulum endoplasmique. RDH16 est membranaire et joue un rôle dans la biosynthèse de l'acide rétinoïde. La protéine HS1BP3 est impliquée dans l'activation des lymphocytes par régulation de la signalisation de l'IL2. Enfin, UBA2 est à la fois cytoplasmique et nucléaire. Elle est également appelée SAE2 (*SUMO-activating enzyme subunit 2*) et est impliquée dans la modification post-traductionnelle des protéines par sumoylation. Des auto-anticorps anti-SAE sont retrouvés chez des patients avec une dermatomyosite auto-immune (82). Il existe des auto-anticorps dit naturels chez les sujets sains : ils sont ubiquitaires, polyréactifs et d'affinités variables (83,84). Ils auraient un rôle dans l'homéostasie du système immunitaire (83,85). Il n'existe pas dans la littérature d'articles portant sur la présence d'auto-anticorps contre les protéines de la seconde combinaison chez les sujets sains.

Le dernier groupe PRH1 et UCN3 est présent chez les patients et chez les sujets sains. Il semble peu contributif dans le diagnostic de la PCA.

Nous avons analysé la première série d'expérience selon les mêmes critères (HS et IS supérieur à 2) et avons retrouvé quelques anticorps (DAB1, CAST, MAGI1, HS1BP3 et UCN3) en commun avec la seconde série. Malgré le caractère innovant de cette technologie il semble qu'il existe un problème de variabilité inter-manipulations.

La faible reproductibilité expérimentale est le principal inconvénient de la technique des puces à protéines (57,59,64,70,86). Il existe deux types de variabilités : systématique et aléatoire. Les variabilités systématiques sont liées aux artefacts (variabilité spatiale) dues à l'impression des protéines sur la puce. Les variabilités aléatoires sont liées à la fabrication des protéines, l'hétérogénéité de la surface des puces et l'incubation des échantillons (87). Néanmoins l'ensemble des procédures de contrôles utilisées permettent de limiter au maximum ces biais.

Par ailleurs, il n'existe pas de protocole consensuel pour interpréter les résultats des puces à protéines. Néanmoins, les différents biais à contrôler ont été identifiés. Les résultats nécessitent une normalisation pour limiter l'impact des variabilités et réduire le bruit de fond. L'équipe de Zhu propose une procédure *Protein chip analysis tool* (ProCAT) pour homogénéiser les résultats d'une puce à protéine fonctionnelle. Notre technique d'analyse est proche de ProCAT. ProCAT applique une fenêtre carrée autour du spot étudié en incluant les spots voisins. De cette manière, il est possible de réduire le bruit de fond en utilisant la médiane du signal de fond de tous les spots de la fenêtre. L'utilisation de cette fenêtre permet de maîtriser la variabilité spatiale en normalisant le signal avec les signaux des spots présents dans la fenêtre. Ensuite, pour identifier les protéines positives, la méthode ProCAT définit un seuil de deux déviations standards au-dessus de la moyenne de fluorescence des spots de la fenêtre. Il faut éliminer ensuite toutes les cibles qui sont également positives dans la puce contrôle (incubée seulement avec l'anticorps anti-GST et les anticorps secondaires) et celles dont la déviation standard dans le duplicat est élevée. Cette méthode ressemble à notre définition du HS mais nous prenons en compte, dans notre analyse, toutes les protéines de la puce. Enfin, comme l'affinité de la liaison peut être biaisée si la protéine est peu abondante, la méthode ProCAT normalise le signal d'une protéine en fonction de la fluorescence de la protéine marquée par un anticorps contrôle (88), ce qui correspond à notre IS. D'après Sboner *et al.* ProCAT n'est pas une méthode optimale pour la détection d'auto-anticorps car il faut identifier des auto-antigènes dont la différence de réactivité peut être subtile entre les puces. Un des problèmes des puces à protéine est la variabilité entre les puces et ProCAT en se focalisant sur un seul échantillon ne la prend pas en compte. Sboner *et al.* propose un autre modèle, *Robust Linear Model* (RLM) qui considère la quantité de protéines dans le spot, l'affinité de la liaison, un effet de lame qui inclut les différences

entre les puces liées aux conditions expérimentales et une constante d'erreur aléatoire (87). En résumé, les données de la littérature montrent qu'il n'y a pas de méthode unique pour analyser les données des puces à protéines. Toutefois l'ensemble de ces méthodes ont pour caractéristiques communes d'essayer de limiter au maximum les biais liés aux variabilités.

V. CONCLUSION

Malgré les problèmes de variabilités et reproductibilité, nous avons pu exploiter les données des puces HuProt™ et pu identifier deux combinaisons d'auto-antigènes : une qui permettrait d'établir le diagnostic et une qui permettrait de l'exclure. La technologie des puces à protéines ne permet toutefois de cribler des cibles protéiques que sur un nombre limité de malade car la technologie reste extrêmement couteuse. Il reste nécessaire de confirmer les données obtenues avec les puces sur un plus grand nombre de malade avec des techniques spécifiques comme les ELISAs.

BIBLIOGRAPHIE

1. Sharma A, Gnanapandithan K, Sharma K, Sharma S. Relapsing polychondritis: a review. *Clin Rheumatol*. 2013 Nov 26;32(11):1575–83.
2. Jaksch-Wartenhorst R. Polychondropathia. *Wien Arch Inn Med*. 1923;6:93–100.
3. Giroux L, Paquin F, Guérard-Desjardins MJ, Lefavre A. Relapsing polychondritis: an autoimmune disease. *Semin Arthritis Rheum*. 1983 Nov;13(2):182–7.
4. Kent PD, Michet CJ, Luthra HS. Relapsing polychondritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2004;16(1):56–61.
5. Michet CJ, McKenna CH, Luthra HS, O'Fallon WM. Relapsing polychondritis. Survival and predictive role of early disease manifestations. *Ann Intern Med*. 1986 Jan;104(1):74–8.
6. Belot A, Duquesne A, Job-Deslandre C, Costedoat-Chalumeau N, Boudjemaa S, Wechsler B, et al. Pediatric-Onset Relapsing Polychondritis: Case Series and Systematic Review. *J Pediatr*. 2010;156(3):484–9.
7. Zeuner M, Straub RH, Rauh G, Albert ED, Schölmerich J, Lang B. Relapsing polychondritis: clinical and immunogenetic analysis of 62 patients. *J Rheumatol*. 1997 Jan;24(1):96–101.
8. Lahmer T, Treiber M, von Werder A, Foerger F, Knopf A, Heemann U, et al. Relapsing polychondritis: An autoimmune disease with many faces. *Autoimmun Rev*. Elsevier B.V.; 2010;9(8):540–6.
9. Papo T, Wechsler B, Bletry O, Piette a M, Godeau P, Piette JC. Pregnancy in relapsing polychondritis: twenty-five pregnancies in eleven patients. *Arthritis Rheum*. 1997;40(7):1245–9.
10. Lang B, Rothenfusser A, Lanchbury JS, Rauh G, Breedveld FC, Urlacher A, et al. Susceptibility to relapsing polychondritis is associated with HLA-DR4. *Arthritis Rheum*. 1993;36(5):660–4.
11. McAdam LP, O'Hanlan MA, Bluestone R, Pearson CM. Relapsing polychondritis: prospective study of 23 patients and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 1976 May;55(3):193–215.
12. Vitale A, Sota J, Rigante D, Lopalco G, Molinaro F, Messina M, et al. Relapsing Polychondritis: an Update on Pathogenesis, Clinical Features, Diagnostic Tools, and Therapeutic Perspectives. *Curr Rheumatol Rep*. 2016;18(1):1–12.
13. Cantarini L, Vitale A, Brizi MG, Caso F, Frediani B, Punzi L, et al. Diagnosis and classification of relapsing polychondritis. *J Autoimmun*. 2014 Feb;48-49:53–9.
14. Arniaud D, Mattei JP, Pham T, Guis S, Baïada-Demoux AL, Serratrice J, et al. Coexistent dermatomyositis, relapsing polychondritis, and positive Lyme serology. A case-report. *Rev Rhum Engl Ed*. 1997 Oct;64(10):589–90.
15. Watanabe M, Suzuki H, Ara T, Nishizuka M, Morita M, Sato C, et al. Relapsing Polychondritis Complicated by Giant Cell Myocarditis and Myositis. *Intern Med*. 2013;52(12):1397–402.
16. Firestein GS, Gruber HE, Weisman MH, Zvaifler NJ, Barber J, O'Duffy JD. Mouth and genital ulcers with inflamed cartilage: MAGIC syndrome. Five patients with features of relapsing polychondritis and Behçet's disease. *Am J Med*. 1985 Jul;79(1):65–72.
17. Azuma N, Nishioka A, Kuwana M, Sano H. Relapsing polychondritis coexisting with immune

- thrombocytopenic purpura: an unusual association. *Rheumatology (Oxford)*. 2013 Apr;52(4):757–9.
18. Arlettaz L, Ribi C. Polychondrite chronique atrophiante. *Rev médicale suisse*. 2010 Apr 21;6(245):830–4.
 19. Alsalameh S, Mollenhauer J, Scheuplein F, Stöss H, Kalden JR, Burkhardt H, et al. Preferential cellular and humoral immune reactivities to native and denatured collagen types IX and XI in a patient with fatal relapsing polychondritis. *J Rheumatol*. 1993 Aug;20(8):1419–24.
 20. Foidart JM, Abe S, Martin GR, Zizic TM, Barnett E V, Lawley TJ, et al. Antibodies to type II collagen in relapsing polychondritis. *N Engl J Med*. 1978 Nov 30;299(22):1203–7.
 21. Buckner JH, Wu JJ, Reife RA, Terato K, Eyre DR. Autoreactivity against matrilin-1 in a patient with relapsing polychondritis. *Arthritis Rheum*. 2000 Apr;43(4):939–43.
 22. Saxne T, Heinegard D. Serum concentrations of two cartilage matrix proteins reflecting different aspects of cartilage turnover in relapsing polychondritis. *Arthritis Rheum*. 1995 Feb;38(2):294–6.
 23. Navarro MJ, Higgins GC, Lohr KM, Myers LK. Amelioration of relapsing polychondritis in a child treated with oral collagen. *Am J Med Sci*. 2002 Aug;324(2):101–3.
 24. Puéchal X, Terrier B, Mouthon L, Costedoat-Chalumeau N, Guillemin L, Le Jeune C. Relapsing polychondritis. *Jt Bone Spine*. Elsevier Masson SAS; 2014;81(2):118–24.
 25. Menge T, Rzepka R, Melchers I. Monoclonal autoantibodies from patients with autoimmune diseases: specificity, affinity and crossreactivity of MAbs binding to cytoskeletal and nucleolar epitopes, cartilage antigens and mycobacterial heat-shock protein 60. *Immunobiology*. 2002;205(1):1–16.
 26. Arnaud L, Mathian A, Haroche J, Gorochov G, Amoura Z. Pathogenesis of relapsing polychondritis: A 2013 update. *Autoimmun Rev*. Elsevier B.V.; 2014;13(2):90–5.
 27. Damiani JM LH. Relapsing polychondritis--report of ten cases. 1979. p. 929–46.
 28. Trentham DE, Le CH. Relapsing polychondritis. *Ann Intern Med*. 1998 Jul 15;129(2):114–22.
 29. Arnaud L, Devilliers H, Peng SL, Mathian A, Costedoat-Chalumeau N, Buckner J, et al. The Relapsing Polychondritis Disease Activity Index: development of a disease activity score for relapsing polychondritis. *Autoimmun Rev*. 2012 Dec;12(2):204–9.
 30. Papo T, Piette JC, Le Thi Huong D u, Godeau P, Meyer O, Kahn MF, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in polychondritis. *Ann Rheum Dis*. 1993;52(5):384–5.
 31. Zeuner M, Straub RH, Schlosser U, Rauh G, Schmitz G, Scholmerich J, et al. Anti-phospholipid-antibodies in patients with relapsing polychondritis. *Lupus*. 1998;7(1):12–4.
 32. Piette JC, El-Rassi R, Amoura Z. Antinuclear antibodies in relapsing polychondritis. *Ann Rheum Dis*. 1999;58(10):656–7.
 33. Ebringer R, Rook G, Swana GT, Bottazzo GF, Doniach D. Autoantibodies to cartilage and type II collagen in relapsing polychondritis and other rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*. 1981;40(5):473–9.
 34. Rowley MJ, Mackay IR, Brand CA, Bateman JF, Chan D. Epitope specificity of antibodies to type II collagen in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*. 1992;12(2):65–9.
 35. Terato K, Shimozuru Y, Katayama K, Takemitsu Y, Yamashita I, Miyatsu M, et al. Specificity of antibodies to type II collagen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1990 Oct;33(10):1493–500.
 36. Burkhardt H, Koller T, Engström A, Nandakumar KS, Turnay J, Kraetsch HG, et al. Epitope-specific

- recognition of type II collagen by rheumatoid arthritis antibodies is shared with recognition by antibodies that are arthritogenic in collagen-induced arthritis in the mouse. *Arthritis Rheum.* 2002;46(9):2339–48.
37. Cremer MA, Pitcock JA, Stuart JM, Kang AH, Townes AS. Auricular chondritis in rats. An experimental model of relapsing polychondritis induced with type II collagen. *J Exp Med.* 1981;154:535–40.
 38. Trentham DE, Townes AS, Kang AH, David JR. Humoral and cellular sensitivity to collagen in type II collagen-induced arthritis in rats. *J Clin Invest.* 1978;61(1):89–96.
 39. Yang CL, Brinckmann J, Rui HF, Vehring KH, Lehmann H, Kekow J, et al. Autoantibodies to cartilage collagens in relapsing polychondritis. *Arch Dermatol Res.* 1993;285(5):245–9.
 40. Hansson AS, Heinegård D, Piette JC, Burkhardt H, Holmdahl R. The occurrence of autoantibodies to matrilin 1 reflects a tissue-specific response to cartilage of the respiratory tract in patients with relapsing polychondritis. *Arthritis Rheum.* 2001 Oct;44(10):2402–12.
 41. Saxne T, Heinegård D. Involvement of nonarticular cartilage, as demonstrated by release of a cartilage-specific protein, in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1989 Sep;32(9):1080–6.
 42. Kempta Lekpa F, Piette JC, Bastuji-Garin S, Kraus VB, Stabler T V, Poole AR, et al. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) level is a marker of disease activity in relapsing polychondritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2010;28(4):553–5.
 43. Tanaka Y, Nakamura M, Matsui T, Iizuka N, Kondo H, Tohma S, et al. Proteomic surveillance of autoantigens in relapsing polychondritis. *Microbiol Immunol.* 2006;50(2):117–26.
 44. El-Gabalawy HS, Wilkins JA. Anti-Sa antibodies: prognostic and pathogenetic significance to rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(2):86–9.
 45. Yang Y, Fujita J, Bando S, Ohtsuki Y, Yamadori I, Yoshinouchi T, et al. Detection of antivimentin antibody in sera of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and non-specific interstitial pneumonia. *Clin Exp Immunol.* 2002 Apr;128(1):169–74.
 46. Pratesi F, Moscato S, Sabbatini A, Chimenti D, Bombardieri S, Migliorini P. Autoantibodies specific for alpha-enolase in systemic autoimmune disorders. *J Rheumatol.* 2000 Jan;27(1):109–15.
 47. Saulot V, Vittecoq O, Charlionet R, Fardellone P, Lange C, Marvin L, et al. Presence of autoantibodies to the glycolytic enzyme alpha-enolase in sera from patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002 May;46(5):1196–201.
 48. Moodie FD, Leaker B, Cambridge G, Totty NF, Segal a W. Alpha-enolase: a novel cytosolic autoantigen in ANCA positive vasculitis. *Kidney Int. Elsevier Masson SAS;* 1993;43(3):675–81.
 49. Eggleton P, Llewellyn DH. Pathophysiological roles of calreticulin in autoimmune disease. *Scand J Immunol.* 1999;49(5):466–73.
 50. Issing WJ, Selover D, Schulz P. Anti-labyrinthine antibodies in a patient with relapsing polychondritis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1999;256(4):163–6.
 51. Albers FW, Majoor MH, Van der Gaag R. Corneal autoimmunity in a patient with relapsing polychondritis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1992;249(5):296–9.
 52. Ekins RP. Multi-analyte immunoassay. *J Pharm Biomed Anal.* 1989;7(2):155–68.

53. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995 Oct 20;270(5235):467–70.
54. Zhu H, Snyder M. Protein arrays and microarrays. *Curr Opin Chem Biol*. 2001 Feb;5(1):40–5.
55. MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*. 2000 Sep 8;289(5485):1760–3.
56. Robinson WH, DiGennaro C, Hueber W, Haab BB, Kamachi M, Dean EJ, et al. Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat Med*. 2002 Mar 1;8(3):295–301.
57. Sutandy FXR, Qian J, Chen C-S, Zhu H. Overview of Protein Microarrays. In: *Current Protocols in Protein Science*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2013. p. 27.1.1–27.1.16.
58. Uzoma I, Zhu H. Interactome mapping: using protein microarray technology to reconstruct diverse protein networks. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2013;11(1):18–28.
59. Zhu H, Snyder M. Protein chip technology. *Curr Opin Chem Biol*. 2003;7(1):55–63.
60. Fan Q, Huang L-Z, Zhu X-J, Zhang K-K, Ye H-F, Luo Y, et al. Identification of proteins that interact with alpha A-crystallin using a human proteome microarray. *Mol Vis*. 2014;20:117–24.
61. Fan B, Lu K-Y, Reymond Sutandy FX, Chen Y-W, Konan K, Zhu H, et al. A human proteome microarray identifies that the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) recognizes the 5' terminal sequence of the hepatitis C virus RNA. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13(1):84–92.
62. Zhang HN, Yang L, Ling JY, Czajkowsky DM, Wang JF, Zhang XW, et al. Systematic identification of arsenic-binding proteins reveals that hexokinase-2 is inhibited by arsenic. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(49):15084–9.
63. Desmetz C, Mange A, Maudelonde T, Solassol J. Autoantibody signatures: Progress and perspectives for early cancer detection. *J Cell Mol Med*. 2011;15(10):2013–24.
64. Liu BC-S, Dijohnson DA, O'Rourke DJ. Antibody profiling with protein antigen microarrays in early stage cancer. *Expert Opin Med Diagn*. 2012;6(3):187–96.
65. Gnjatic S, Ritter E, Büchler MW, Giese NA, Brors B, Frei C, et al. Seromic profiling of ovarian and pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(11):5088–93.
66. Syed P, Gupta S, Choudhary S, Pandala NG, Atak A, Richharia A, et al. Autoantibody Profiling of Glioma Serum Samples to Identify Biomarkers Using Human Proteome Arrays. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2015 Sep 15;5:13895.
67. Song Q, Liu G, Hu S, Zhang Y, Tao Y, Han Y, et al. Novel autoimmune hepatitis-specific autoantigens identified using protein microarray technology. *J Proteome Res*. 2010;9(1):30–9.
68. Huang W, Hu C, Zeng H, Li P, Guo L, Zeng X, et al. Novel systemic lupus erythematosus autoantigens identified by human protein microarray technology. *Biochem Biophys Res Commun*. Elsevier Inc.; 2012;418(2):241–6.
69. Querol L, Clark PL, Bailey M a., Cotsapas C, Cross AH, Hafler D a., et al. Protein array-based profiling of CSF identifies RBPJ as an autoantigen in multiple sclerosis. *Neurology*. 2013 Sep 10;81(11):956–63.
70. Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor a, Bertone P, et al. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science*. 2001;293(5537):2101–5.

71. Jeong JS, Jiang L, Albino E, Marrero J, Rho HS, Hu J, et al. Rapid identification of monospecific monoclonal antibodies using a human proteome microarray. *Mol Cell Proteomics*. 2012 Jun;11(6):O111.016253.
72. Granito A, Muratori P, Quarneti C, Pappas G, Cicola R, Muratori L. Antinuclear antibodies as ancillary markers in primary biliary cirrhosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2012 Jan;12(1):65–74.
73. Granito A, Yang W-H, Muratori L, Lim MJ, Nakajima A, Ferri S, et al. PML nuclear body component Sp140 is a novel autoantigen in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 2010 Jan;105(1):125–31.
74. Beauvillain C, Delneste Y, Renier G, Jeannin P, Subra JF, Chevailler A. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: How should the biologist manage them? *Clin Rev Allergy Immunol*. 2008;35(1-2):47–58.
75. Jongstra-Bilen J, Jongstra J. Leukocyte-specific protein 1 (LSP1): a regulator of leukocyte emigration in inflammation. *Immunol Res*. 2006;35(1-2):65–74.
76. Hwang S-H, Jung S-H, Lee S, Choi S, Yoo S-A, Park J-H, et al. Leukocyte-specific protein 1 regulates T-cell migration in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci*. 2015 Nov 24;112(47):E6535–43.
77. Feng X, Jia S, Martin TA, Jiang WG. Regulation and involvement in cancer and pathological conditions of MAGI1, a tight junction protein. *Anticancer Res*. 2014 Jul;34(7):3251–6.
78. Miller CL, Pjanic M, Wang T, Nguyen T, Cohain A, Lee JD, et al. Integrative functional genomics identifies regulatory mechanisms at coronary artery disease loci. *Nat Commun*. 2016;7(May):12092.
79. Latini FRM, Hemerly JP, Freitas BCG, Oler G, Riggins GJ, Cerutti JM. ABI3 ectopic expression reduces in vitro and in vivo cell growth properties while inducing senescence. *BMC Cancer*. 2011;11:11.
80. Ueki Y, Tiziani V, Santanna C, Fukai N, Maulik C, Garfinkle J, et al. Mutations in the gene encoding c-Abl-binding protein SH3BP2 cause cherubism. *Nat Genet*. 2001 Jun;28(2):125–6.
81. Mimori T, Suganuma K, Tanami Y, Nojima T, Matsumura M, Fujii T, et al. Autoantibodies to calpastatin (an endogenous inhibitor for calcium-dependent neutral protease, calpain) in systemic rheumatic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(16):7267–71.
82. Tarricone E, Ghirardello A, Rampudda M, Bassi N, Punzi L, Doria A. Anti-SAE antibodies in autoimmune myositis: identification by unlabelled protein immunoprecipitation in an Italian patient cohort. *J Immunol Methods*. 2012 Oct 31;384(1-2):128–34.
83. Avrameas S. Natural autoantibodies: from “horror autotoxicus” to “gnothi seauton.” *Immunol Today*. 1991;12(5):154–9.
84. Lacroix-Desmazes S, Kaveri S V., Mouthon L, Ayoub A, Malanchère E, Coutinho A, et al. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J Immunol Methods*. 1998;216(1-2):117–37.
85. Comtesse N, Heckel D, Maldener E, Glass B, Meese E. Probing the human natural autoantibody repertoire using an immunoscreening approach. *Clin Exp Immunol*. 2000;121(3):430–6.
86. Ayoglu B, Schwenk JM, Nilsson P. Antigen arrays for profiling autoantibody repertoires. *Bioanalysis*. 2016 May;8(10):1105–26.
87. Sboner A, Karpikov A, Chen G, Smith M, Mattoon D, Freeman-Cook L, et al. Robust-Linear-Model Normalization To Reduce Technical Variability in Functional Protein Microarrays. *J Proteome Res*.

2010;9(1):636–636.

88. Zhu X, Gerstein M, Snyder M. ProCAT: a data analysis approach for protein microarrays. *Genome Biol.* 2006;7(11):R110.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Score RPDAI (29)

Parameters for the final model	RPDAI Item weights
Arthritis	1
Fever	2
Purpura	3
Raised C-reactive protein level	3
Manubriosternal chondritis	3
Sternoclavicular chondritis	4
Hematuria	4
Costochondritis	4
Episcleritis	5
Proteinuria	6
Vestibular dysfunction	8
Nasal chondritis	9
Pericarditis	9
Uveitis	9
Auricular chondritis	9
Scleritis	9
Corneal ulcer	11
Motor or sensorimotor neuropathy	12
Sensorineural deafness	12
Retinal vasculitis	14
Respiratory chondritis without ARF	14
Large and/or medium sized vessel involvement	16
Myocarditis	17
Renal failure	17
Acute aortic or mitral insufficiency	18
Encephalitis	22
Respiratory chondritis with ARF	24

ANNEXE 2 : Caractéristiques clinico-biologiques des patients de la première série de manipulation.

Patients de la première série de manipulation		PCA-1	PCA-2	PCA-3	PCA-4	PCA-5	PCA-6	PCA-7	PCA-8	PCA-9	PCA-10
Données démographiques	Age au moment du prélèvement (années)	49	51	33	42	42	50	63	33	47	60
	Sexe	F	F	F	M	F	M	F	M	F	F
	Durée d'évolution de la maladie (année)	35	10	2	1	10	0	41	8	4	2
	Chondrite auriculaire	oui	oui	non	non	oui	oui	oui	oui	non	oui
	Oreille en chou	non	non	non	non	non	non	oui	non	non	non
	Chondrite nasale	oui	oui	oui	non	non	non	non	non	non	non
	Nez en "selle"	oui	non	oui	oui	non	non	oui	non	oui	non
	Perte auditive	non	oui	non	non	non	non	non	non	non	non
	Dysfonction vestibulaire	oui	oui	non	non	non	non	non	non	non	non
	Atteinte laryngée	oui	non	oui	non	non	non	oui	non	non	non
	Atteinte tracheal	non	non	oui	oui	oui	non	oui	oui	oui	non
	Arthrite	oui	oui	non	non	non	non	non	non	non	non
	Atteinte oculaire	oui	oui	oui	non	oui	oui	oui	oui	oui	non
	Atteinte aortique	non	oui	non	non	non	non	non	non	non	non
	Arterite des gros vaisseaux	non	non	non	non	non	non	non	non	non	non
	Atteinte cutanée	non	non	non	non	non	non	non	non	non	non
	Myelodysplasie	oui	non	oui	non	non	oui	non	non	non	non
	Poussée	14	0	15	0	0	18	0	1	0	0
	RPDAI	oui	oui	oui	oui	non	non	oui	oui	oui	non
	Traitement	oui	oui	oui	oui	non	non	oui	oui	oui	non
	CRP (mg/l)	<5	<5	13	<5	<5	<5	<5	13	<5	<5
	Aspect et dilution en immunofluorescence indirecte sur cellules Hep2	Moucheté-1/320 et Homogène-1/320	N.R.	N.R.	Négative	Moucheté-1/80	Moucheté-1/80 et Homogène-1/80	N.R.	N.D.	Moucheté-1/80	N.R.
	Recherche ENA	N.R.	N.R.	N.R.	Négative	Négative	Négative	N.R.	N.D.	N.R.	N.R.
	Recherche ANCA	Négative	Négative	Négative	N.R.	Négative	Négative	Négative	N.D.	Négative	Négative
	EPP	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	Normale	Normale	N.R.	N.D.	N.R.	Normale

ANCA : Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles, ENA : Recherche d'anticorps anti-antigène nucléaires solubles. EPP : électrophorèse des protéines, N.D. Non disponible, N.R. Non réalisé, PCA : patients PCA.

ANNEXE 3 : Tableau des caractéristiques démographiques et biologiques des sujets sains.

Sujets sains	Healty-1	Healty-2	Healty-3	Healty-4	Healty-5	Healty-6	Healty-7	
Données démographiques	Age au moment du prélèvement (années)	28	32	26	50	46	20	23
	Sexe	F	F	F	F	M	F	F
Caractéristiques biologiques	Aspect et dilution en Immunofluorescence indirecte sur cellules Hep2	Moucheté type DFS-1/320	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Moucheté type DFS - 1/160	Moucheté type DFS - 1/320
	Recherche ENA	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative

DFS : *Dense Fine Speckled* ; Recherche ENA : Recherche d'anticorps anti-antigènes nucléaires solubles.

Titre :

Évaluation de la technique des puces à protéines pour l'identification de biomarqueurs diagnostiques de la polychondrite chronique atrophiante.

Résumé :

La polychondrite chronique atrophiante (PCA) est une maladie auto-immune marquée par une inflammation récurrente et progressive du tissu cartilagineux. Il n'existe pas de marqueur biologique spécifique de la PCA. Il est donc nécessaire d'en déterminer de nouveaux afin de compléter un diagnostic qui reste clinique. Une puce à protéine a été développée (Zhu *et al.* 2001) permet de tester un grand nombre de cibles antigéniques potentielles au cours d'une seule manipulation. L'objectif du travail de thèse est la détermination de nouveaux auto-anticorps pour le diagnostic de la PCA à l'aide d'une puce à protéines. Dix-neuf sérums provenant de patients atteints de PCA ont été sélectionnés. Les données obtenues chez les patients ont été comparées à celles de sept sérums de sujets sains ainsi qu'à celles d'un lot d'immunoglobulines intraveineuses en deux manipulations distinctes. L'analyse des puces à protéines a montré que la distribution des résultats semble dépendre du jour de réalisation de la manipulation. Nous nous sommes focalisés sur la seconde série de patients, la première étant moins pertinente statistiquement. Dans cette série de patients nous avons mis en évidence deux combinaisons de cibles protéiques. Les auto-anticorps contre la première semblent les plus discriminants car ils sont les plus exprimés chez les patients par rapport au sujet sains. La seconde combinaison semblerait plus exprimée chez les sujets sains. On peut supposer qu'elle permettrait d'exclure le diagnostic de la PCA. Nous avons pu démontrer qu'il existe deux combinaisons de cibles qui permettraient de différencier sur le plan biologique les patients avec une PCA des sujets sains.

Mots clés :

polychondrite chronique atrophiante, diagnostique, puces à protéines, biomarqueurs, combinaisons d'auto-anticorps, reproductibilité

**Université Paris Descartes
Faculté de Médecine Paris Descartes
15, rue de l'École de Médecine
75270 Paris cedex 06**