

Introduction

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est le rhumatisme inflammatoire chronique auto-immun le plus sévère. Sa prévalence est comprise entre 0,5 et 1,1% en Amérique du Nord et en Europe du Nord, et entre 0,3 et 0,7% en Europe du Sud [1].

La PR se présente comme une polyarthrite bilatérale et symétrique des petites articulations. Des manifestations extra-articulaires telles que les nodules rhumatoïdes, une atteinte pulmonaire, ou encore une vascularite peuvent aussi être présentes [2].

La PR est précédée par l'apparition d'anticorps anti protéines citrullinées (ACPAs). La citrulline est un acide aminé neutre résultat d'une modification post-traductionnelle d'une arginine par des enzymes appelées Peptidyl Arginine Déiminases (PADs).

Dans la PR ACPA-positive, le risque génétique est principalement porté par les molécules HLA-DR porteuses de l'épitope partagé (EP) encodées dans la région du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). L'EP (un motif de cinq acides aminés compris entre les positions 70 et 74 de la chaîne HLA-DRB1) est présent chez approximativement 70% des patients atteints d'une PR ACPA-positive [3,4]. Les différentes combinaisons d'allèles HLA-DR (génotypes) confèrent des risques relatifs différents de développer une PR ACPA-positive, les plus hauts risques correspondant aux génotypes encodant deux copies de l'épitope partagé [5].

Les ACPA présents chez les patients atteints de PR reconnaissent des épitopes citrullinés sur de nombreuses protéines [6]. Un antigène citrulliné majeur exprimé dans les articulations des patients atteints de PR est le fibrinogène, dont les chaînes alpha et bêta sont toutes deux reconnues par les ACPA [7]. Les ACPA sont susceptibles de jouer un rôle dans la physiopathologie de la maladie [8].

La découverte des ACPA a conduit au développement de tests diagnostiques basés sur des peptides citrullinés cyclisés synthétiques (CCP) [9]. Depuis, différentes générations de tests anti-CCP ont été commercialisés [10]. Compte tenu de leur importance, les ACPA ont été intégrés dans les critères de classification ACR/EULAR 2010 de la PR [11].

Outre les tests anti-CCP, la recherche d'anticorps anti-fibrinogène humain citrulliné (AhFibA) peut être utilisée pour le diagnostic sérologique des PR débutantes [12].

Cinq peptides issus du fibrinogène citrulliné (Fib-cit) portent la quasi-intégralité des épitopes reconnus par les sérums des patients atteints de PR ACPA-positives. Ces épitopes immunodominants sont portés par les peptides β 60–74cit, α 36–50cit, α 621–635cit, α 501–515cit et α 171–185cit [7,13,14].

La majorité des études publiées analysent la reconnaissance de 3 (β 60–74cit, α 36–50cit, et α 621–635cit) parmi les 5 épitopes majeurs et étudient des PR récentes définies par les critères ACR de 1987 [15] et non les critères ACR/EULAR de 2010.

L'objectif primaire de ce travail était d'étudier si, dans une cohorte de 184 patients atteints de PR ACPA-positives répondant aux critères ACR/EULAR 2010, un terrain génétique HLA-DR particulier ou des caractéristiques cliniques particulières étaient associées avec la présence d'anticorps dirigés contre les épitopes des 5 peptides majeurs du Fib-cit β 60–74cit, α 36–50cit, α 621–635cit, α 501–515cit et α 171–185cit.

Matériels et méthodes

Patients

Nous avons réalisé une étude prospective sur 184 patients suivis dans le service de rhumatologie de l'hôpital Sainte Marguerite à Marseille. Les patients inclus étaient considérés comme atteints de PR-ACPA positive sur la base de résultats de tests anti-CCP2 obtenus antérieurement avec des tests commerciaux divers et remplissaient les critères ACR/EULAR 2010. Les patients traités par rituximab ont été exclus de l'étude compte tenu de son effet potentiel sur les taux d'ACPA.

Les caractéristiques des patients suivantes ont été collectées dans leurs dossiers médicaux : présence de nodules rhumatoïdes, tabagisme, âge au diagnostic, génotype HLA-DR, présence de facteurs rhumatoïdes, activité de la maladie et caractère érosif de la maladie.

- L'activité de la maladie a été évaluée par le Disease Activity Score calculé avec la valeur de la protéine C réactive (DAS28-CRP) le jour du prélèvement.
- La réponse au traitement a été évaluée en accord avec les critères de réponse au traitement de l'EULAR. Les patients étaient considérés comme ayant une bonne réponse si leur DAS28 était ≤ 3.2 et avait décru de >1.2 [16]. En accord avec la mise à jour de 2019 des recommandations de traitements de la polyarthrite rhumatoïde de l'EULAR, le temps maximal pour atteindre la cible du traitement a été fixé à 6 mois avant de conclure à un échec du traitement [17].
- Les antécédents personnels d'accident vasculaire cérébral non fatal, d'infarctus du myocarde ou d'insuffisance cardiaque ont été définis comme événement cardiovasculaire majeur.
- Les patients étaient classés comme fumeurs (actifs ou sevrés) et non-fumeurs.
- L'atteinte pulmonaire a été diagnostiquée par les médecins radiologues à partir des scanners pulmonaires des patients. Il est à noter que seuls quelques patients avaient bénéficié d'un scanner thoracique.
- Le caractère érosif de la PR était défini selon la définition EULAR d'une PR érosive [18].

- Le syndrome sec oculaire était défini par un test de Schirmer < 5 mm/5 min, ou un Ocular Staining Score > 5. La sécheresse buccale était définie par un flux salivaire non stimulé < 0,1 mL/min.
- L'ostéoporose était définie soit par un antécédent personnel de fracture ostéoporotique, ou par une mesure de densité minérale osseuse avec un T-score inférieur à - 2.5 sur au moins un des deux sites.

Echantillons

Un prélèvement sanguin unique a été réalisé chez les patients à partir duquel le plasma a été isolé. Les échantillons ont été stockés à -80°C. Les tests AhFibA et de fine spécificité des ACPA contre les peptides du fibrinogène ont été analysés et les anti-CCP2 ont été ré-analysés avec un même test chez l'ensemble des patients.

Ethique

Tous les patients ont donné leur consentement écrit pour cette étude. Les données des patients ont été pseudo-anonymisées. La collection d'échantillons a été approuvée par le comité d'éthique sous le numéro DC-2008-327. Cette étude a été déclarée à l'Assistance Publique – Hôpitaux de Marseille (AP-HM) sous le numéro PADS19-332.

Dosage des ACPA et des Facteurs rhumatoïdes

Pour l'ensemble des tests d'ACPA, nous avons utilisé un seuil de positivité (N) correspondant à une spécificité diagnostique à 95%.

Les dosages anti-CCP2 ont été réalisés en utilisant le kit ELISA CCPlus® IMMUNOSCAN (Euro Diagnostica, Arnhem, Pays Bas) selon les recommandations du fabricant. Les titres d'anticorps exprimés en unités arbitraires (AU/mL) ont été considérés comme positifs au-delà de 25 AU/mL.

Les auto-anticorps IgG anti-fibrinogène humain citrulliné ont été détectés par un test ELISA précédemment décrit (AhFibA). Les titres d'anticorps au-delà de 0,056 ont été considérés positifs [7,19].

Les dosages de facteurs rhumatoïdes (FR) IgM ont été analysés par le kit ELISA Facteur Rhumatoïde IgM (ORGENTEC, Mainz, Allemagne) et considérés comme positifs au-delà de 20 UI/mL.

Dosage des anticorps dirigés contre les peptides du Fib-cit

Les peptides dont les séquences sont citées ci-après ont été synthétisés avec soit des arginines (R) pour les peptides contrôles soit des citrullines (R) dans les peptides cibles, et utilisés dans les tests d'ELISA :

- β 60–74: RPAPPPISGGGYRAR
- α 36–50: GPRVVERHQSACKDS
- α 621–635: RGHAKSRPVRGIHTS
- α 501–515: biotine-ahx*-SGIGTLDGFRHRHPD
- α 171–185: biotine-ahx*-VDIDIKIRSCRGSCS

*: ahx : acide amino-hexanoïque

Les auto-anticorps IgG dirigés contre les peptides citrulinés dérivés du fibrinogène β 60–74cit, α 36–50cit, et α 621–635cit ont été testés par ELISA selon une méthode décrite précédemment où les peptides sont adsorbés passivement sur des plaques de microtitration [7,19]. Les auto-anticorps IgG dirigés contre les peptides α 501–515cit et α 171–185cit ont été testés par ELISA avec des peptides biotinylés fixés sur de l'avidine. Brièvement, les plaques (Maxisorp; NUNC, VWR International, Fontenay-sous-Bois, France) ont été incubées durant la nuit avec de l'Avidine à 5 μ g/mL. Après lavage avec du PBS 0,1% Tween-20 (PBS-T), les peptides biotinylés ont été incubés 1 heure à 1 μ g/mL dans du PBS 2% BSA (PBS-BSA). Après 3 lavages, les plaques ont été incubées pendant une heure avec le plasma des patients dilué au 1/100 dans du PBS-BSA et lavées 3 fois avec du PBS-T. Un anticorps de chèvre anti-IgG humaine conjugué à de la peroxydase (Southern Biotechnology) dilué au 1/2500 dans du PBS-BDA a été incubé pendant 1 h et, après 3 lavages, la réactivité a été révélée par de l'ortho-phenylenediamine dihydrochloride et du peroxyde d'hydrogène dans un tampon citraté à pH 5. La réaction a été stoppée par de l' H_2SO_4 après 5 min et la densité optique (DO) a été lue à 492 nm. Toutes les étapes ont été réalisées à température ambiante d'environ 20°C [7]. La réactivité anticorps spécifique a été définie par la différence de DO entre les peptides

citrullinés et contrôles non citrullinés. Les variations inter-manipulations ont été corrigées par une analyse par régression linéaire en utilisant un peptide et un plasma de référence testés sur chaque plaque. Les ΔOD inférieures à la valeur seuil de 0,25 étaient considérées comme négatives. Les patients avec une ΔOD supérieure à la valeur seuil étaient divisés en 3 groupes égaux avec des titres faibles, moyens, ou élevés. Les patients des groupes titres moyens et élevés étaient considérés ensemble comme ayant un haut niveau de réactivité.

Analyse statistique

Les études d'association ont été réalisées grâce à des tables de contingence en utilisant le test du Chi2 et le test exact de Fisher quand le test Chi2 n'était pas utilisable. Le test de Pearson a été utilisé pour déterminer la significativité des corrélations de titres entre anti-CCP2, AhFibA, et anticorps dirigés contre les peptides.

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel PRISM pour Windows (GraphPad Software, San Diego, Californie, USA). Le seuil de significativité était fixé à $p \leq 0,05$. Nous avons considérés que les valeurs $p \leq 0,09$ représentaient une tendance vers la significativité compte tenu du faible effectif de notre cohorte.

Résultats

Description clinique de la population (Tableau 1)

Les caractéristiques cliniques des 184 patients atteints de PR ACPA-positive sont montrées dans le tableau 1.

Profil sérologique des 184 patients atteints PR ACPA-positive (Tableau 2, Figure 1)

Les caractéristiques biologiques des 184 patients atteints de PR ACPA-positive recrutés sont montrées dans le tableau 2. Après ré-analyse avec un même test de référence, 98,51% des patients étaient porteurs d'anticorps anti-CCP2. Par ailleurs, 83,23% étaient positifs au test AhFibA, et 69,98% avaient des FR IgM.

- **Parmi les peptides du Fib-cit,**
 - 76,13% des patients reconnaissent le peptide biotine- α 171–185cit.
 - 67,10% reconnaissent le peptide biotine- α 501–515cit.
 - 58,06 % reconnaissent le peptide β 60–74cit.
 - 45,16% reconnaissent le peptide α 621–635cit.
 - 14,84% reconnaissent le peptide α 36–50cit.
- **Profil de reconnaissance épitopique des ACPA chez 20 patients tirés au hasard (Figure 1)**

Une analyse des profils de reconnaissance des épitopes par les ACPA a été réalisée chez 20 patients tirés au sort et met en évidence que :

- 19% des patients reconnaissent les 4 peptides β 60–74cit, α 501–515cit, α 621–635cit, et α 171–185cit.
- 15% des patients reconnaissent les 3 peptides β 60–74cit, α 501–515cit, et α 171–185cit.
- 4% des patients seulement reconnaissent α 171-185cit.

Corrélations entre les titres des anti-CCP2 et des anticorps anti peptides du Fib-cit (Figure 2)

Les titres d'anti-CCP2 et AhFibA sont fortement corrélés (r_s : 0,7037; $p = 5,69 \times 10^{-29}$ Pearson)

Les titres d'anti-CCP2 et des anticorps anti-peptides du Fib-cit sont fortement corrélés pour 4 des 5 peptides:

- $\beta 60-74\text{cit}$ (r_s : 0,5162; $p = 5,43 \times 10^{-14}$, Pearson)
- $\alpha 621-635\text{cit}$ (r_s : 0,2703; $p = 0,0002$, Pearson)
- $\alpha 501-515\text{cit}$ (r_s : 0,2979; $p = 3,82 \times 10^{-5}$, Pearson)
- $\alpha 171-185\text{cit}$ (r_s : 0,6473 ; $p = 2,41 \times 10^{-23}$, Pearson)

En revanche, il n'y a pas de corrélation des titres d'anti-CCP2 et des anticorps anti- $\alpha 36-50\text{cit}$ (r_s : 0,0078; $p = 0,916$, Pearson).

Terrain génétique HLA-DRB1

Parmi les 184 patients atteints de PR ACPA-positive, 155 ont été génotypés pour HLA-DRB1.

Leurs caractéristiques cliniques n'étaient pas différentes de celles de l'ensemble des 184 patients (voir Tableaux supplémentaires 1 et 2).

67,1% des patients étaient porteurs de l'EP (49% des patients exprimaient une copie de l'EP et 18,1% en exprimaient deux copies).

Statut HLA-DR et caractéristiques cliniques

44/155 patients expriment HLA-DRB1*0401 parmi lesquels 11 ont des nodules rhumatoïdes, 111/155 patients n'expriment pas HLA-DRB1*0401 parmi lesquels 19 ont des nodules rhumatoïdes (Chi2, OR = 2,15 [0,91 – 5,25]; $p = 0,081$). Ainsi, HLA-DRB1*04:01 est associé à la présence de nodules rhumatoïdes. Les autres caractéristiques cliniques n'étaient associées à aucun allèle HLA-DRB1.

HLA-DRB1 et reconnaissance des peptides du Fib-cit (Tableau 3)

1/ Effet dose de l'EP sur le nombre de peptides du Fib-cit reconnus

Les patients porteurs de deux copies de l'EP reconnaissent plus de 3 peptides du Fib-cit (OR = 3,02 [1,12 – 8,74]; $p = 0,034$).

2/ Allèles HLA-DRB1 et spécificité épitopiques envers les peptides du Fib-cit

HLA-DRB1*0401 était associé à la présence d'anticorps dirigés contre $\alpha 501-515\text{cit}$ (OR = 5,52 [2,00 – 13,64]; $p=0,0003$), ainsi qu'avec l'absence d'anticorps dirigés contre $\alpha 621-625\text{cit}$ (OR=0,46 [0,23 – 0,95]; $p=0,036$).

Spécificité épitopique des anticorps dirigés contre les peptides du Fib-cit et caractéristiques cliniques (Tableau 4 et Tableau supplémentaire 3)

1/ Reconnaissance de multiples peptides

42 des 184 patients reconnaissent plus de 3 peptides du Fib-cit. Les 142 patients restants reconnaissent 3 peptides du Fib-cit ou moins. Les patients qui reconnaissent plus de 3 peptides du Fib-cit présentent une meilleure réponse aux anti-TNF-alpha (OR = 2,93 [1,16 – 7,48]; p = 0,025) et ont une PR non érosive (OR = 0,45 [0,19 – 1,04]; p = 0,051).

2/ La reconnaissance des épitopes portés par le peptide α501–515cit est associée à la présence de FR et de nodules rhumatoïdes (Tableau 4)

30/180 patients ont des nodules rhumatoïdes et 130 n'en ont pas. Les données sont manquantes pour 20 patients.

- Une réactivité envers α501–515cit présente une tendance à une association avec les nodules rhumatoïdes (OR= 2,32 [0,95 – 5,80], p = 0,08).
- Un haut niveau de réactivité envers α501–515cit est associé avec la présence de nodules rhumatoïdes. 79/184 patients ont un haut niveau de réactivité envers α501–515cit parmi lesquels 18 patients ont des nodules rhumatoïdes. 61/184 patients n'avaient pas de haut niveau de réactivité envers α501–515cit parmi lesquels seulement 6 patients ont des nodules rhumatoïdes (OR=2,71 [1,00 – 7,16], p= 0,044).
- Les anticorps anti-α501–515cit sont associés avec la présence de FR (OR=2,31 [1,10 – 4,78], p= 0,026).

Discussion

Nous avons étudié les associations entre le terrain génétique HLA-DR, les spécificités des ACPA pour des épitopes portés par le fibrinogène citrulliné, et les caractéristiques cliniques de 184 patients atteints de PR ACPA-positif remplissant les critères ACR-EULAR 2010.

Les caractéristiques cliniques et biologiques de la population atteinte de PR étudiée étaient classiques [5].

L'analyse des spécificités épitopiques des ACPA dans nos 184 plasmas montrent en partie des différences avec celles décrites dans les études pilotes, en particulier pour le peptide α 36-50cit, ainsi que pour les peptides α 501-515cit et α 171-185cit qui furent utilisés biotinylés dans la présente étude :

- 58% ont des anticorps anti- β 60-74cit versus 70% des patients dans les études pilotes.
- 15% ont des anticorps anti- α 36-50cit versus 60% des patients dans les études pilotes.
- 45% ont des anticorps anti- α 621-635cit versus 50% des patients dans les études pilotes.
- 67% ont des anticorps anti- α 501-515cit versus 45% des patients dans les études pilotes.
- 76% ont des anticorps anti- α 171-185cit versus 45 % des patients dans les études pilotes.

Pour les deux peptides α 501-515cit et α 171-185cit, la différence résulte de la différence de sensibilité des tests ELISA utilisés. En effet, dans les études pilotes [7], les peptides étaient adsorbés sur des plaques de polystyrène alors que dans cette étude, les peptides sous une forme biotinylée ont été liés à de l'avidine adsorbée sur les plaques d'ELISA. Un tel accroissement de la sensibilité des dosages est bien connue et a déjà été démontrée pour les peptides citrulinés [20].

Dans un premier temps, nous avons analysé les associations entre des spécificités épitopiques multiples et les caractéristiques cliniques.

La reconnaissance de multiples peptides (> 3) n'étaient pas associées à la présence d'une PR érosive alors que les données publiées montrent une association entre la présence d'érosions et de hauts niveaux d'ACPA [21,22].

La reconnaissance de multiples peptides (> 3) était associée à une meilleure réponse aux anti-TNF-alpha. Sur ce point, les données de la littérature sont contradictoires. En effet, la présence d'ACPA a été décrite comme associée à la fois à une moins bonne réponse [23], comme sans influence sur la réponse [24], ou bien encore comme associée à une meilleure réponse [25]. Cette meilleure réponse aux anti-TNF-alpha observée chez nos patients reconnaissant de multiples peptides pourraient expliquer la prédominance de PR non érosives. En effet, les traitements anti-TNF-alpha ont été décrits comme limitant la progression radiographique des patients atteints de PR [26].

En ce qui concerne les lésions pulmonaires, celles-ci ne furent pas étudiées compte tenu du nombre limité de patients ayant bénéficié d'une tomodensitométrie thoracique dans cette étude, rendant cette analyse trop peu robuste.

Par la suite, nous avons analysés les associations entre les reconnaissances des peptides du Fib-cit, le terrain génétique HLA, et les caractéristiques cliniques des patients.

Nous avons trouvé que :

1/ HLA-DRB1*0401 était associé à la présence d'anticorps anti-α501–515cit.

2/ Les nodules rhumatoïdes sont associés à HLA-DRB1*0401.

3/ Un haut niveau de réactivité envers α501–515cit était associé à la présence de nodules rhumatoïdes et de facteurs rhumatoïdes.

1/ HLA-DRB1*0401 était associé à la présence d'anticorps anti-α501–515cit.

En effet, 44/155 patients exprimaient HLA-DRB1*0401 parmi lesquels 76 avaient des anticorps anti-α501-515cit, et 111/155 patients n'exprimaient pas HLA-DRB1*0401 parmi lesquels 65 avaient des anticorps anti-α501-515cit (OR = 5,52 [2,00-13,64] ; p = 0,0003) (Tableau 3).

Lorsque l'on s'intéresse au développement d'une réponse anticorps IgG, les molécules HLA-DR interviennent dans la présentation antigénique de peptides à des lymphocytes T follicular helper (Tfh) qui apportent un signal d'aide aux lymphocytes B présentant une IgM de surface de spécificité donnée. Or, la spécificité de la réponse anticorps est basée sur la spécificité de l'IgM de surface de la cellule B, et non pas au peptide antigénique présenté par HLA-DR.

Ainsi, l'association d'HLA-DRB1*0401 avec la présence d'anticorps anti- α 501-515cit n'indiquent pas que cet allèle associé à la PR est capable de choisir entre différents épitopes B. En revanche, cela suggère que la présence d'HLA-DRB1*0401 pourrait contribuer à apporter un signal d'aide aux cellules B spécifiques du peptide α 501-515cit du Fib-cit que les autres allèles HLA-DRB1 ne peuvent fournir.

Ceci suggère donc une efficacité toute particulière d'HLA-DRB1*0401 en tant que présentateur de peptide apprêté ce qui permet en retour le développement d'une réponse Tfh plus efficace. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que les molécules HLA-DR encodées par HLA-DRB1*0401 ont été démontrées comme suivant un raccourci du réticulum endoplasmique aux lysosomes permettant une association avec des peptides antigéniques mieux apprêtés [27,28].

2/ Les nodules rhumatoïdes sont associés à HLA-DRB1*0401.

En effet, 44/155 patients expriment HLA-DRB1*0401 parmi lesquels 11 ont des nodules rhumatoïdes, et 111/155 patients n'expriment pas HLA-DRB1*0401 parmi lesquels 19 ont des nodules rhumatoïdes (OR = 2,15 [0,91 – 5,25] ; p = 0,081).

L'association d'HLA-DRB1*0401 avec la présence de nodules rhumatoïdes est bien connue et classique [22,29].

3/ Un haut niveau de réactivité envers α 501–515cit était associé à la présence de nodules rhumatoïdes et de facteurs rhumatoïdes.

En effet, 79/184 patients ont un haut niveau de réactivité envers α 501–515cit, parmi lesquels 18 patients ont des nodules rhumatoïdes, et 61/184 patients n'ont pas de haut niveau de réactivité envers α 501–515cit, parmi lesquels 6 patients ont des nodules rhumatoïdes (OR=2,71 [1,00 – 7,16], p= 0,044). D'autre part, la présence d'anticorps anti- α 501–515cit est également associée à la présence de facteurs rhumatoïdes (OR=2,31 [1,10 – 4,78], p= 0,026).

Il est intéressant de noter que l'analyse histologique des nodules rhumatoïdes démontre que leur centre nécrotique contient du fibrinogène ainsi que des IgG. Il a également été mis en évidence la présence au sein de ces centres nécrotiques de protéines citrullinées mais également d'IgM [30,31]. A la lumière de ces éléments immuno-histologiques, nos données suggèrent que les anticorps anti- α 501–515cit formeraient des complexes immuns avec le Fib-cit et les facteurs rhumatoïdes, et ainsi être à l'origine des nodules rhumatoïdes.

En conclusion, nous avons analysé les spécificités épitopiques des ACPA en utilisant les cinq peptides majeurs du fibrinogène citrulliné et recherché si elles étaient associées avec des caractéristiques cliniques, biologiques, ou génétiques particulières. Notre principale découverte est l'association de la présence d'anticorps dirigés contre des épitopes portés par le peptide citrulliné α 501–515 présent sur la chaîne alpha du fibrinogène avec HLA-DRB1*0401 ainsi qu'avec la présence de nodules rhumatoïdes. Cette spécificité épitopique inattendue des ACPA chez les patients porteurs de l'allèle HLA-DRB1*0401 pourrait être liée au trajet intra-cellulaire original d'HLA-DRB1*0401. L'association des anticorps anti- α 501–515cit avec les nodules rhumatoïdes suggérerait que les anticorps anti- α 501–515cit contribueraient particulièrement à la formation des complexes immuns à l'origine des nodules rhumatoïdes.

Références

- 1 Alamanos Y, Drosos A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews* 2005;**4**:130–6. doi:10.1016/j.autrev.2004.09.002
- 2 Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *The Lancet* 2016;**388**:2023–38. doi:10.1016/S0140-6736(16)30173-8
- 3 Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987;**30**:1205–13. doi:10.1002/art.1780301102
- 4 de Almeida DE, Ling S, Holoshitz J. New insights into the functional role of the rheumatoid arthritis shared epitope. *FEBS Letters* 2011;**585**:3619–26. doi:10.1016/j.febslet.2011.03.035
- 5 Balandraud N, Picard C, Reviron D, *et al.* HLA-DRB1 Genotypes and the Risk of Developing Anti Citrullinated Protein Antibody (ACPA) Positive Rheumatoid Arthritis. *PLoS ONE* 2013;**8**:e64108. doi:10.1371/journal.pone.0064108
- 6 Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, *et al.* Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998;**101**:273–81. doi:10.1172/JCI1316
- 7 Sebbag M, Moinard N, Auger I, *et al.* Epitopes of human fibrin recognized by the rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins. *Eur J Immunol* 2006;**36**:2250–63. doi:10.1002/eji.200535790
- 8 England BR, Thiele GM, Mikuls TR. Anticitrullinated protein antibodies: origin and role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. 2017. doi:info:doi/10.1097/BOR.0000000000000356
- 9 Schellekens GA, Visser H, Hazes JMW, *et al.* The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 1999;**42**:537–47.
- 10 Ji M, Hur M, Moon H-W, *et al.* Comparison of second- and third-generation immunoassays for detection of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 2018;**78**:477–82. doi:10.1080/00365513.2018.1499957
- 11 Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis & Rheumatism* 2010;**62**:2569–81. doi:10.1002/art.27584
- 12 Nogueira L, Sebbag M, Chapuy-Regaud S, *et al.* Autoantibodies to deiminated fibrinogen are the most efficient serological criterion for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research*;4:38.
- 13 Nogueira L, Cornillet M, Singwe-Ngandeu M, *et al.* In Black Africans with rheumatoid arthritis, ACPA recognize citrullinated fibrinogen and the derived

peptides α 36-50Cit38,42 and β 60-74Cit60,72,74, like in Caucasians. *Clinical Immunology* 2014;**152**:58–64. doi:10.1016/j.clim.2014.02.011

- 14 Iobagiu C, Magyar A, Nogueira L, *et al.* The antigen specificity of the rheumatoid arthritis-associated ACPA directed to citrullinated fibrin is very closely restricted. *Journal of Autoimmunity* 2011;**37**:263–72. doi:10.1016/j.jaut.2011.07.003
- 15 Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, *et al.* The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 1988;**31**:315–24. doi:10.1002/art.1780310302
- 16 van Gestel AM, Haagsma CJ, van Riel PL. Validation of rheumatoid arthritis improvement criteria that include simplified joint counts. *Arthritis and Rheumatism* 1998;**41**:1845–50. doi:10.1002/1529-0131(199810)41:10<1845::AID-ART17>3.0.CO;2-K
- 17 Smolen JS, Landewé RBM, Bijlsma JWJ, *et al.* EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann Rheum Dis* 2020;:annrheumdis-2019-216655. doi:10.1136/annrheumdis-2019-216655
- 18 van der Heijde D, van der Helm-van Mil AHM, Aletaha D, *et al.* EULAR definition of erosive disease in light of the 2010 ACR/EULAR rheumatoid arthritis classification criteria. *Ann Rheum Dis* 2013;**72**:479–81. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202779
- 19 Chapuy-Regaud S, Nogueira L, Clavel C, *et al.* IgG subclass distribution of the rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated fibrin. *Clinical & Experimental Immunology* 2005;**139**:542–50. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02708.x
- 20 Cornillet M, Babos F, Magyar A, *et al.* Seropositivity and Antibody Profiling of Patients Are Dramatically Impacted by the Features of Peptides Used as Immunosorbents: A Lesson from Anti–Citrullinated Protein/Peptide Antibody. *Jl* 2018;**201**:3211–7. doi:10.4049/jimmunol.1800330
- 21 Joo YB, Park Y-J, Park K-S, *et al.* Association of cumulative anti-cyclic citrullinated protein antibodies with radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2019;**38**:2423–32. doi:10.1007/s10067-019-04554-w
- 22 Scherer HU, van der Woude D, Willemze A, *et al.* Distinct ACPA fine specificities, formed under the influence of HLA shared epitope alleles, have no effect on radiographic joint damage in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2011;**70**:1461–4. doi:10.1136/ard.2010.146506
- 23 Potter C, Hyrich KL, Tracey A, *et al.* Association of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide positivity, but not carriage of shared epitope or *PTPN22* susceptibility variants, with anti-tumour necrosis factor response in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;**68**:69–74. doi:10.1136/ard.2007.084715

- 24 Lv Q, Yin Y, Li X, *et al.* The Status of Rheumatoid Factor and Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody Are Not Associated with the Effect of Anti-TNF α Agent Treatment in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2014;**9**:e89442. doi:10.1371/journal.pone.0089442
- 25 Sokolove J, Schiff M, Fleischmann R, *et al.* Impact of baseline anti-cyclic citrullinated peptide-2 antibody concentration on efficacy outcomes following treatment with subcutaneous abatacept or adalimumab: 2-year results from the AMPLE trial. *Ann Rheum Dis* 2016;**75**:709–14. doi:10.1136/annrheumdis-2015-207942
- 26 Murray E, Ellis A, Butylkova Y, *et al.* Systematic review and network meta-analysis: effect of biologics on radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Journal of Comparative Effectiveness Research* 2018;**7**:959–74. doi:10.2217/ce-2017-0106
- 27 Auger I, Toussiot E, Roudier J. Molecular mechanisms involved in the association of HLA-DR4 and rheumatoid arthritis. *Immunol Res* 1997;**16**:121–6. doi:10.1007/BF02786328
- 28 Roth S, Willcox N, Rzepka R, *et al.* Major Differences in Antigen-Processing Correlate with a Single Arg⁷¹ $\leftrightarrow$ Lys Substitution in HLA-DR Molecules Predisposing to Rheumatoid Arthritis and with Their Selective Interactions with 70-kDa Heat Shock Protein Chaperones. *J Immunol* 2002;**169**:3015–20. doi:10.4049/jimmunol.169.6.3015
- 29 Weyand CM, Xie C, Goronzy JJ. Homozygosity for the HLA-DRB1 allele selects for extraarticular manifestations in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1992;**89**:2033–9. doi:10.1172/JCI115814
- 30 Turunen S, Huhtakangas J, Nousiainen T, *et al.* Rheumatoid arthritis antigens homocitrulline and citrulline are generated by local myeloperoxidase and peptidyl arginine deiminases 2, 3 and 4 in rheumatoid nodule and synovial tissue. *Arthritis Res Ther* 2016;**18**:239. doi:10.1186/s13075-016-1140-9
- 31 Athanasou NA, Quinn J, Woods CG, *et al.* Immunohistology of rheumatoid nodules and rheumatoid synovium. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1988;**47**:398–403. doi:10.1136/ard.47.5.398

Figure 1 : Représentation schématique des différents profils de réactivité dirigés contre les peptides étudiés

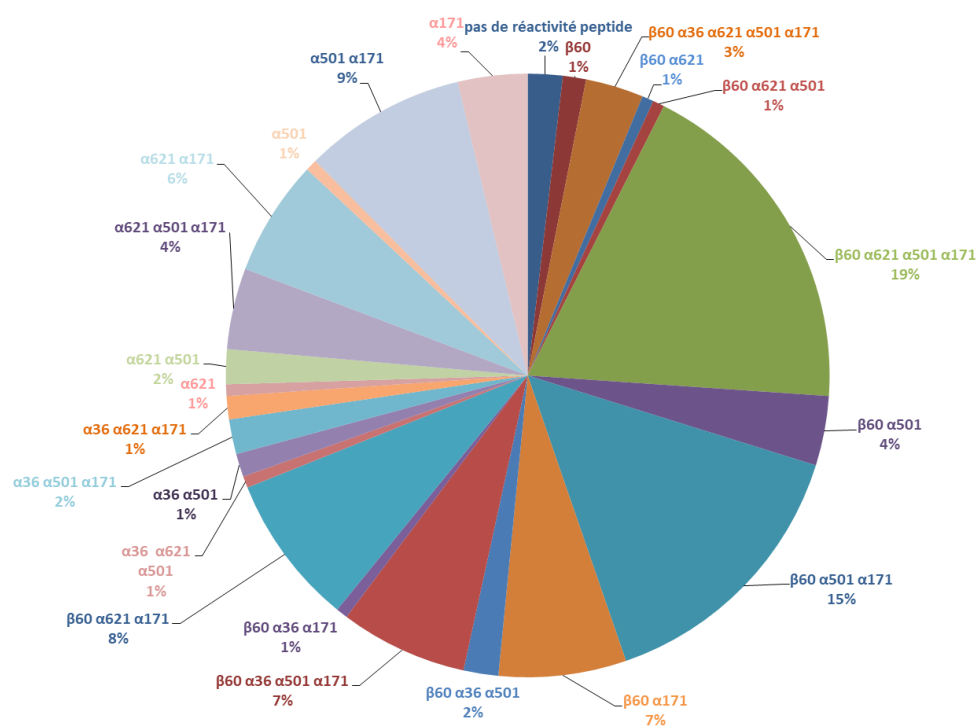
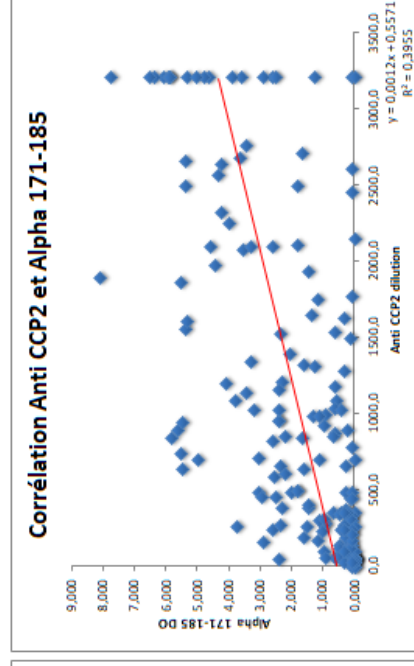
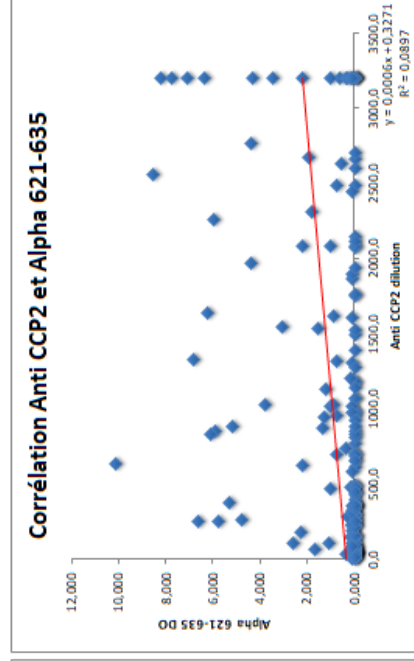
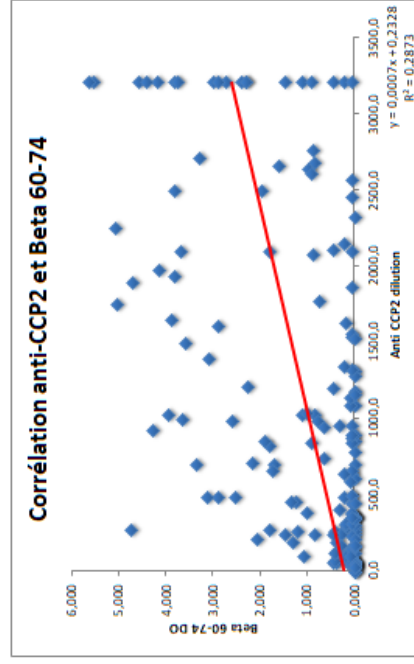
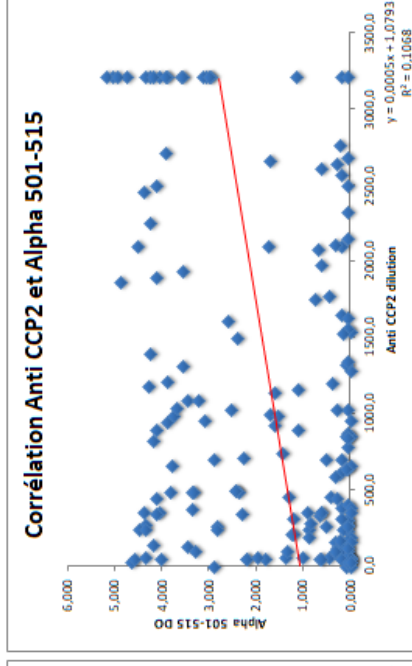
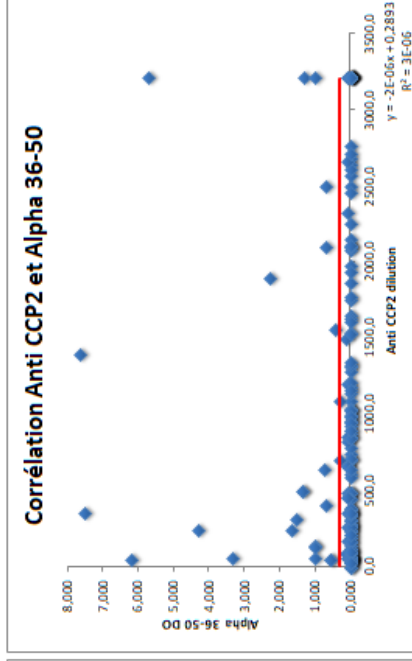
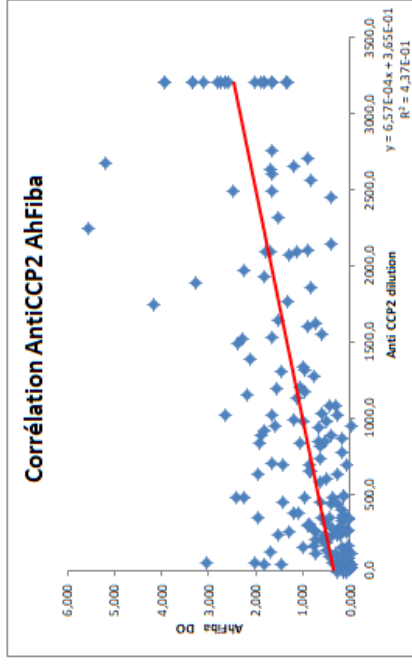


Figure 2 : Corrélation entre les titres d'anticorps anti CCP2 et les densités optiques des tests AhFiba et dirigés contre les différentes spécificités



DO : densité optique

Tableau 1: Caractéristiques cliniques des 184 patients

Nombre de patients	184
Âge (années, moyenne)	62
Sexe féminin (%)	75,5
Délai diagnostique (moyenne, années)	0,9
Âge au diagnostic (moyenne, années)	46,4
Nodules rhumatoïdes	30/180 (16,6 %)
Tabagisme (actif ou sevré)	90/180 (50 %)
DAS28 à l'inclusion	2,44
Événement cardio-vasculaire majeur	15/180 (8,3 %)
Polyarthrite rhumatoïde érosive	64/180 (35,5 %)
Syndrome sec	11/167 (6,6 %)
Facteurs rhumatoïdes	121/161 (75%)
Traitement	Bonne réponse/Nombre de patients traités
Anti-TNF-alpha	90/137 (65,6 %)
Tocilizumab	37/53 (69,8 %)
Abatacept	24/46 (52,1 %)

Tableau 2: Réactivités AhFibA et envers les cinq peptides majeurs dérivés du fibrinogène citrulliné des 184 patients atteints de PR ACPA positive

	Négatifs	Positifs
AhFibA	27/184 (14,67 %)	157/184 (85,33%)
β60–74cit	76/184 (41,30 %)	108/184 (58,70%)
α36–50cit	157/184 (85,33 %)	27/184 (14,67%)
α621–635cit	103/184 (55,98%)	81/184 (44,02%)
α501–515cit	62/184 (33,70 %)	122/184 (66,3%)
α171–185cit	45/184 (24,46 %)	139/184 (75,54%)

Tableau 3: Association entre les spécificités épitopiques des ACPA et les allèles HLA-DRB1

Epitope partagé N=104/155				HLA-DRB1*04:01 N=44/155				HLADRB1*04:04,*04:05, *04:08,*01 N=69/155				HLADRB1*10 :01 N=14/155					
	NON (n)	OUI (n)	Odds Ratio [IC 95%]	p	NON (n)	OUI (n)	Odds Ratio [IC 95%]	p	NON (n)	OUI (n)	Odds Ratio [IC 95%]	p	NON (n)	OUI (n)	Odds Ratio [IC 95%]	p	
β60-74cit	NON (n)	25	40	1,54 [0,80 – 2,98]	0,21	49	16	1,38 [0,68 – 2,84]	0,37	37	28	1,11 [0,58 – 2,13]	0,76	61	4	1,91 [0,60 – 5,72]	0,29
	OUI (n)	26	64			62	28			49	41			80	10		
α36-50cit	NON (n)	45	88	1,36 [0,54 – 3,68]	0,54	95	38	0,93 [0,34 – 2,41]	0,90	77	56	1,99 [0,80 – 4,69]	0,14	120	13	0,44 [0,04 – 2,68]	0,42
	OUI (n)	6	16			16	6			9	13			21	1		
α621-635cit	NON (n)	23	62	0,55 [0,28 – 1,06]	0,08	55	30	0,46 [0,23 – 0,95]	<u>0,04</u>	45	40	0,80 [0,42 – 1,50]	0,48	79	6	1,70 [0,53 – 5,27]	0,34
	OUI (n)	28	42			56	14			41	29			62	8		
α501-515cit	NON (n)	23	28	2,23 [1,10 – 4,55]	<u>0,02</u>	46	5	5,52 [2,00 – 13,64]	<u>0,0003</u>	31	20	1,38 [0,71 – 2,77]	0,35	45	6	0,63 [0,19 – 1,97]	0,40
	OUI (n)	28	76			65	39			55	49			96	8		
α171-185cit	NON (n)	15	22	1,55 [0,74 – 3,28]	0,26	30	7	1,96 [0,78 – 5,00]	0,14	22	15	1,24 [0,60 – 2,71]	0,58	35	2	1,65 [0,41 – 7,81]	0,52
	OUI (n)	36	82			81	37			64	54			106	10		
Nombre de spécificités	≤3	42	77	1,63 [0,71 – 4,01]	0,25	85	34	0,96 [0,42 – 2,20]	0,92	69	50	1,54 [0,74 – 3,28]	0,25	111	8	2,78 [0,85 – 8,31]	0,07
	>3	9	27			26	10			17	19			30	6		

n = nombre ; IC = intervalle de confiance

Table 4 : Association des nodules rhumatoïdes et des facteurs rhumatoïdes avec les réactivités envers les peptides

		Nodules rhumatoïdes (n = 30/180)				Facteur rhumatoïde (n = 122/161)			
		NON (n)	OUI (n)	Odds Ratio [IC 95%]	p	NON (n)	OUI (n)	Odds Ratio [IC 95%]	p
Facteur rhumatoïde (n=122/161)	NON (n)	35	3	2,89 [0,88 – 9,52]	0,08				
	OUI (n)	97	24						
β60-74cit	NON (n)	63	11	1,25 [0,55 – 2,69]	0,59	15	54	0,79 [0,37 – 1,68]	0,52
	OUI (n)	87	19			24	68		
α36-50cit	NON (n)	130	26	0,23 [0,33 – 2,89]	0,99	36	102	2,35 [0,70 – 7,83]	0,17
	OUI (n)	20	4			3	20		
α621-635cit	NON (n)	81	19	0,68 [0,32 – 1,53]	0,35	25	68	1,42 [0,66 – 2,88]	0,36
	OUI (n)	69	11			14	54		
α501–515cit**	NON (n)	55	6	2,32 [0,95 – 5,80]	0,08**	18	33	2,31 [1,10 – 4,78]	<u>0,026</u>
	OUI (n)	95	24			21	89		
α171–185cit	NON (n)	37	7	1,08 [0,45 – 2,75]	0,88	11	30	1,21 [0,56 – 2,68]	0,65
	OUI (n)	113	23			28	92		
Nombre de spécificités	≤ 3	119	21	1,65 [0,69 – 3,78]	0,26	35	93	2,73 [0,91 – 7,61]	0,07
	> 3	31	9			4	29		

N = nombre de patients

** Un haut niveau de réactivité envers α501–515cit était significativement associé à la présence de nodules rhumatoïdes

79/184 patients ont un haut niveau de réactivité envers α501–515cit, parmi lesquels 18 patients ont nodules rhumatoïdes

61/184 patients n'ont pas un haut niveau de réactivité envers α501–515cit, parmi lesquels 6 patients ont des nodules rhumatoïdes.

OR = 2,71 [1,00 – 7,16], p= 0,044

Tableau supplémentaire 1 : Caractéristiques de la population génotypée pour HLA-DRB1

Nombre de patients	155
Age (années, moyenne)	61,781
Sexe féminin (%)	75,817
Délai diagnostique (moyenne, années)	1,013
Âge au diagnostic (moyenne, années)	46,68
Nodules rhumatoïdes	26/152 (17,11 %)
Tabagisme (actif ou sevré)	78/153 (50,98 %)
DAS28 à l'inclusion	2,49
Événement cardiovasculaire majeur	15/152 (9,87 %)
Polyarthrite rhumatoïde érosive	52/152 (34,21 %)
Nombre moyen d'érosions	5,357
Ostéoporose	28/146 (19,18 %)
Syndrome sec	11/150 (7,33 %)
Traitement	Bons répondeurs / Nombre de patients traités
Anti-TNF-alpha	80/117 (68,4%)
Tocilizumab	27/41 (65,8%)
Abatacept	23/39 (58,9%)

Tableau supplémentaire 2 : Caractéristiques biologiques de la population génotypée

	Négatifs	Positifs
AhFibA	26/155 (16,77 %)	129/155 (83,23 %)
β60–74cit	65/155 (41,94 %)	90/155 (58,06 %)
α36–50cit	132/155 (85,16 %)	23/155 (14,84 %)
α621–635cit	85/155 (54,84 %)	70/155 (45,16 %)
α501–515cit	51/155 (32,90 %)	104/155 (67,10 %)
α171–185cit	37/155 (23,87 %)	118/155 (76,13 %)

Tableau supplémentaire 3 : Associations entre les caractéristiques cliniques et les spécificités épitopiques des ACPA

	Nodules rhumatoïdes (n = 30/180)		Bons répondeurs anti-TNF-alpha (n = 90/137)		Bonne réponse au tocilizumab (n = 37/ 53)		Bonne réponse à l'abatacept (n = 24/46)		Facteurs rhumatoïdes (n = 121/161)		Polyarthrite rhumatoïde érosive (n = 64/180)		Tabagisme (actif ou sevré) (n = 90/180)	
	Odds Ratio [IC 95%]	p	Odds Ratio [IC 95%]	P	Odds Ratio [IC 95%]	p	Odds Ratio [IC 95%]	p	Odds Ratio [IC 95%]	p	Odds Ratio [IC 95%]	p	Odds Ratio [IC 95%]	p
Facteurs rhumatoïdes (n= 121/161)	2,89 [0,88 – 9,52]	0,087	1,13 [0,49 – 2,70]	ns	1,28 [0,35 – 4,81]	ns	0,66 [0,20 – 2,33]	ns			0,91 [0,44 – 1,87]	ns	2,37 [1,10 – 4,78]	0,022
Positivité β60-74cit	1,25 [0,55 – 2,69]	ns	1,22 [0,61 – 2,55]	ns	0,79 [0,23 – 2,53]	ns	0,68 [0,22 – 2,39]	ns	0,79 [0,37 – 1,68]	ns	1,03 [0,57 – 1,91]	ns	1,45 [0,80 – 2,67]	ns
Positivité α36-50cit	1,63 [0,61 – 4,64]	ns	1,96 [0,72 – 5,10]	ns	0,53 [0,13 – 2,34]	ns	4,20 [0,58 – 53,48]	ns	2,35 [0,70 – 7,83]	ns	0,67 [0,26 – 1,66]	ns	0,58 [0,25 – 1,31]	ns
Positivité α621-635cit	0,68 [0,32 – 1,53]	ns	1,54 [0,74 – 3,18]	ns	0,98 [0,33 – 3,15]	ns	2,92 [0,84 – 9,82]	0,077	1,42 [0,66 – 2,88]	ns	0,71 [0,38 – 1,35]	ns	1,26 [0,70 – 2,27]	ns
Positivité α501–515cit	2,32 [0,95 – 5,80]	0,08**	1,03 [0,48 – 2,13]	ns	0,23 [0,05 – 1,07]	0,065	1,43 [0,41 – 5,38]	ns	2,31 [1,10 – 4,78]	0,026	0,97 [0,51 – 1,79]	ns	1,16 [0,63 – 2,15]	ns
Positivité α171–185cit	1,08 [0,45 – 2,75]	ns	0,89 [0,38 – 2,09]	ns	1,21 [0,35 – 4,86]	ns	0,59 [0,17 – 2,15]	ns	1,21 [0,56 – 2,68]	ns	1,37 [0,66 – 2,77]	ns	1,44 [0,74 – 2,91]	ns
Nombre de spécificités > 3	1,65 [0,69 – 3,78]	ns	2,93 [1,16 – 7,48]	0,025	0,61 [0,16 – 2,16]	ns	4,12 [0,90 – 21,06]	0,086	2,73 [0,91 – 7,61]	0,069	0,45 [0,19 – 1,04]	0,051	1,56 [0,78 – 3,08]	ns

NS: non significatif IC : intervalle de confiance. ** Pour un haut niveau de réactivité, les anticorps anti-α501–515cit sont significativement associés à la présence de nodules rhumatoïdes
OR =2,71 [1,00 – 7,16], p= 0,044

**Association between HLA-DRB1*04:01, rheumatoid nodules
 and particular epitopes of citrullinated Fibrin in patients
 with RA**

Journal:	<i>Annals of the Rheumatic Diseases</i>
Manuscript ID	annrheumdis-2020-219356
Article Type:	Extended report
Date Submitted by the Author:	20-Oct-2020
Complete List of Authors:	Larid, Guillaume; AP-HM, rheumatology Pancarte, Mikael; Toulouse 2 University, INSERM U1056 Offer, Geraldine; Toulouse 2 University, INSERM U1056 Clavel, Cyril; University of Toulouse - CNRS UMR5165, INSERM U1056, Laboratory of Epidermis Differentiation and Rheumatoid Autoimmunity; Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Toulouse, Institut Fédératif de Biologie, Laboratory of Cell Biology and Cytology Martin, Marielle; Aix-Marseille-University, INSERM UMRs1097 auto immune arthritis Pradel, Vincent; AP-HM, Laboratoire de Santé Publique Auger, Isabelle; Aix-Marseille-University, INSERM UMRs1097 auto immune arthritis Lafforgue, Pierre; AP-HM, Rheumatology Serre, Guy; Toulouse 2 University, INSERM U1056 Roudier, Jean; AP-HM, Rheumatology ; Aix-Marseille-University, INSERM UMRs1097 Arthrites auto immunes Balandraud, Nathalie; AP-HM, Rheumatology ; Aix-Marseille-University, INSERM UMRs1097 Arthrites auto immunes
Keywords:	Arthritis, Rheumatoid, Anti-Citrullinated Protein Antibodies, Rheumatoid Factor, Polymorphism, Genetic



I, the Submitting Author has the right to grant and does grant on behalf of all authors of the Work (as defined in the below author licence), an exclusive licence and/or a non-exclusive licence for contributions from authors who are: i) UK Crown employees; ii) where BMJ has agreed a CC-BY licence shall apply, and/or iii) in accordance with the terms applicable for US Federal Government officers or employees acting as part of their official duties; on a worldwide, perpetual, irrevocable, royalty-free basis to BMJ Publishing Group Ltd ("BMJ") its licensees and where the relevant Journal is co-owned by BMJ to the co-owners of the Journal, to publish the Work in this journal and any other BMJ products and to exploit all rights, as set out in our [licence](#).

The Submitting Author accepts and understands that any supply made under these terms is made by BMJ to the Submitting Author unless you are acting as an employee on behalf of your employer or a postgraduate student of an affiliated institution which is paying any applicable article publishing charge ("APC") for Open Access articles. Where the Submitting Author wishes to make the Work available on an Open Access basis (and intends to pay the relevant APC), the terms of reuse of such Open Access shall be governed by a Creative Commons licence – details of these licences and which [Creative Commons](#) licence will apply to this Work are set out in our licence referred to above.

Other than as permitted in any relevant BMJ Author's Self Archiving Policies, I confirm this Work has not been accepted for publication elsewhere, is not being considered for publication elsewhere and does not duplicate material already published. I confirm all authors consent to publication of this Work and authorise the granting of this licence.

Association between HLA-DRB1*04:01, rheumatoid nodules and particular epitopes of citrullinated fibrin in patients with RA

Guillaume LARID¹, Mikael PANCARTE², Géraldine OFFER², Cyril CLAVEL², Marielle MARTIN³, Vincent PRADEL⁴, Isabelle AUGER³, Pierre LAFFORGUE¹, Jean ROUDIER^{1, 3}, Guy SERRE², Nathalie BALANDRAUD^{1, 3*}

¹ Rhumatologie, IML, AP-HM, 270 Boulevard de Sainte Marguerite, 13009 Marseille, France

² UMR 1056 Inserm - Université de Toulouse Hôpital Purpan Place du Dr Baylac - TSA 40031 31059 Toulouse, France

³ Aix Marseille Université, INSERM UMRs 1097, Arthrites autoimmunes, 163 Avenue de Luminy, 13288 Marseille, France

⁴ CEIP de Marseille (PACA-Corse, Centre Associé), Laboratoire de Santé Publique, Faculté de Médecine, Marseille, France

*Corresponding author : Nathalie Balandraud: Nathalie.balandraud@ap-hm.fr

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Objectives: Rheumatoid arthritis (RA) is associated with HLA-DRB1 genes encoding the shared epitope (SE), a 5 amino acid motive. RA is preceded by the emergence of anti-citrullinated protein antibodies (ACPAs). Citrullin is a neutral amino acid resulting from post translational modification of arginin by Peptidyl Arginyl Deiminases (PADs). ACPA recognize epitopes from citrullinated human fibrinogen (Fib-cit) and can be specifically detected also with the AhFibA assay. Five peptides derived from Fib-cit together present almost all of the epitopes recognized by patients with ACPA-positive RA: β 60–74cit, α 36–50cit, α 621–635cit, α 501–515cit and α 171–185cit. Our objective was to study whether clinical characteristics and HLA-DRB1 genetic background were associated with a specific reactivity against these epitopes.

Methods: 184 ACPA positive RA patients fulfilling the 2010 ACR/EULAR criteria were studied. Patients characteristics, including HLA-DRB1 genotype, were collected from their medical files. Anti-CCP2, AhFibA, and antibodies against the five major Fib-cit peptides were analyzed using ELISA assays.

Results: Anti- α 505-515cit antibodies were associated with HLA-DRB1*04:01 (OR = 5.52 [2.00 – 13.64]; p = 0.0003). High level anti- α 505-515cit antibodies were significantly associated with rheumatoid nodules (OR = 2.71 [1.00 – 7.16], p= 0.044).

Conclusion: These findings highlight the role played by the HLA-DRB1*04:01 molecule and its rapid intracellular route into the lysosomes, enabling original antigen processing. Immune complexes containing anti- α 501–515cit antibodies and rheumatoid factors might be involved in the development of rheumatoid nodules on the HLA-DRB1*04:01 background.

Key words ; ACPA, Rheumatoid arthritis, HLA-DRB1, AhFiba, α 501–515cit

Key messages:

We analyzed whether the epitopic specificities of ACPAs were associated with particular HLA-DR alleles or clinical features in 184 patients with ACPA positive RA. Anti-fibrinogen α 501–515cit antibodies are associated with HLA-DRB1*0401 and with rheumatoid nodules.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is the most severe type of chronic autoimmune arthritis. Its prevalence ranges from 0.5% to 1.1% in North America and northern Europe, and between 0.3 and 0.7% in southern Europe[1].

RA features symmetrical bilateral polyarthritis of the small joints. Extra-articular manifestations such as rheumatoid nodules, lung damage, or vasculitis can also be present[2].

RA is preceded by the emergence of anti citrullinated protein antibodies (ACPAs). Citrullin is a neutral amino acid resulting from post translational modification of arginin by Peptidyl Arginyl Deiminases (PADs).

In anti-citrullinated protein (ACPA) positive RA, the genetic risk is mostly carried by shared epitope (SE) positive HLA-DR molecules encoded in the major histocompatibility complex (MHC). The SE (a five amino acids motif encompassing positions 70 to 74 of the HLA-DRB1 chain) is present in approximately 70% of patients with ACPA-positive RA [3,4]. Different combinations of HLA-DR alleles (genotypes) confer different relative risks of developing ACPA-positive RA, with highest risks for genotypes encoding two copies of the SE [5].

ACPA present in patients with RA recognize citrullinated epitopes on numerous proteins [6]. A major citrullinated antigen expressed in the rheumatoid joint is Fibrin and both its alpha and beta chain are recognized by ACPA [7]. ACPA are likely to play a role in the pathophysiology of the disease [8].

The discovery of ACPA led to the development of diagnostic tests based on synthetic cyclic citrullinated peptides (CCP) [9]. Since then different generations of anti-CCP tests have been commercialised [10]. ACPAs have become one of the 2010 American College of Rheumatology (ACR)/EULAR RA classification criteria [11].

Besides anti-CCP tests, anti-human citrullinated fibrinogen antibodies (AhFibA) can be used for the serological diagnosis of early RA [12].

Five peptides from citrullinated fibrinogen (Fib-cit) together present almost all of the epitopes recognised by patient's sera with ACPA-positive RA. These immunodominant epitopes are borne by the peptides $\beta 60-74$ cit_{60,72,74}, $\alpha 36-50$ cit_{38,42}, $\alpha 621-635$ cit_{621,627,630}, $\alpha 501-515$ cit_{510,512} and $\alpha 171-185$ cit_{178,181}[7,13,14].

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Most published studies analyse the recognition of 3 (β 60–74cit, α 36–50cit, α 621–635cit) out of the 5 major epitopes and study early RA defined by the 1987 ACR criteria[15] not the 2010 ACR/EULAR criteria.

The primary objective of this work was to study whether, in a cohort of 184 patients with ACPA-positive RA fulfilling the 2010 ACR/EULAR criteria, a particular HLA-DR background or original clinical patterns were associated with antibodies to the epitopes from the 5 major Fib-cit peptides β 60–74cit, α 36–50cit, α 621–635cit, α 501–515cit and α 171–185cit.

Confidential: For Review Only

Material and methods

Patients

We carried out a prospective study on 184 patients followed at the rheumatology department of Sainte Marguerite Hospital in Marseille. Patients included were considered ACPA-positive RA based on previous anti-CCP2 results obtained with various commercial assays and fulfilled the 2010 ACR/EULAR criteria. Patients treated with rituximab were excluded due to its potential effect on ACPA levels.

Patient characteristics were collected from their medical files: presence of rheumatoid nodules, smoking habits, age at diagnosis, HLA-DR genotype, rheumatoid factors (RF), activity and erosive characteristics of the disease.

- Disease activity was measured using the Disease Activity Score calculated with the level of C-reactive protein (DAS28-CRP) on the day of the sample.
- Treatment response was evaluated according to the EULAR response criteria. Patients are considered to have shown a good response if their DAS28 is ≤ 3.2 and has decreased by >1.2 [16]. According to the 2019 update of EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis, the time needed to achieve treatment target has been set at 6 months before concluding to treatment failure [17].
- Patient personal history of a cerebrovascular accident, myocardial infarction or heart failure was defined as a major cardiovascular event.
- Patients were classed as smokers (active or previous smokers) or non-smokers.
- Lung damage was diagnosed by radiologists from CT chest scans. It should be noted that only some of the patients had had a CT chest scan.
- Erosive RA was defined according to the EULAR definition of erosive RA [18].
- Dry eye syndrome was defined as a Schirmer's test value ≤ 5 mm/5 min, or an Ocular Staining Score ≥ 5 . Dry mouth was defined as an unstimulated salivary flow rate of $\leq 0,1$ mL/min.
- Osteoporosis was defined either by personal history of an osteoporosis fracture, or by bone mineral density with a T-score below $-2,5$ for at least one of the testing sites.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Samples

Patients gave a single blood sample from which plasma was isolated. Samples were stored at -80°C. AhFibA and ACPA fine specificities to Fibrinogen peptides were assayed and anti-CCP2 were re-assayed with a same test in all patients.

Ethics

All patients gave informed written consent for this study. Patient data was pseudo-anonymized. Sample collection was approved by the ethics committee under the number DC-2008-327. This study was declared to the Assistance Publique – Hôpitaux de Marseille (AP-HM) under the number PADS19-332.

ACPA testing

For all these ACPA tests, we used the positivity threshold (N) corresponding to 95% diagnostic specificity.

Plasma anti-CCP2 assays were performed using the ELISA CCPlus® IMMUNOSCAN kit (Euro Diagnostica, Arnhem, The Netherlands) according to the manufacturer’s recommendations. Antibody titres expressed in arbitrary units (AU/mL) were considered positive above 25 AU/mL.

Anti-human citrullinated fibrinogen IgG autoantibodies were detected with a previously described ELISA (AhFibA). Antibody titres above 0.056 were considered positive [7,19].

IgM Rheumatoid Factor (RF) was assayed with the RF ELISA from Orgentec and considered positive if >20 UI/mL.

Antibodies to Fib-cit peptides

Peptides with the following sequences were synthesized with either arginines (R) in control peptides or citrullines (R) in target peptides, and used as immunosorbents:

- β60–74: RPAPPPISGGGYRAR
- α36–50: GPRVVERHQSACKDS
- α621–635: RGHAKSRPVRGIHTS
- α501–515: biotin-ahx*-SGIGTLDGFRHRHPD
- α171–185: biotin-ahx*-VDIDIKIRSCRGSCS

*: ahx : aminohexanoic acid

IgG autoantibodies to the Fibrin-derived citrullinated peptides α 36–50cit, β 60–74cit, α 621–635cit were tested by ELISA according to a previously described method where peptides are passively adsorbed on microtitration plates [7,19]. IgG autoantibodies to the peptides α 501–515cit and α 171–185cit were tested by ELISA with biotinylated peptides fixed on Avidin. Briefly, plates (Maxisorp; NUNC, VWR International, Fontenay-sous-Bois, France) were incubated overnight with Avidin at 5 μ g/mL. After washing with PBS 0.1% Tween-20 (PBS-T) biotinylated peptides were incubated for 1 hour at 1 μ g/mL in PBS 2% BSA (PBS-BSA). After 3 washings the plates were incubated for 1 hour with patient plasma diluted to 1/100 in PBS-BSA then washed 3 times in PBS-T. A peroxidase-conjugated goat anti-human IgG antibody (Southern Biotechnology) diluted to 1/2500 in PBS-BSA was incubated for 1h and, after 3 washings, reactivity was revealed by ortho-phenylenediamine dihydrochloride and hydrogen peroxide in a citrate buffer at pH 5. The reaction was stopped after 5min with H_2SO_4 and optical density (OD) read at 492 nm. All the steps were performed at room temperature around 20°C [7]. The specific antibody reactivity was defined as the OD difference between the citrullinated and non-citrullinated control peptide. Interassay variations were corrected by linear regression analysis using reference peptide and plasma, tested on each plate. Δ OD below the cut-off value of 0.25 were considered negative. Patients with Δ OD over the cut-off value were divided into 3 equal groups with weak, medium or high titres, and patients from the medium and high titre groups, considered together to have a "high level" reactivity.

Statistical analysis

Association studies were carried out with contingency tables using the Chi2 test and Fisher's exact test when Chi2 was not applicable. Pearson's test was used to determine significance of the titre correlations between anti-CCP2, AhFibA, and antibodies to the peptides.

Statistical analysis was carried out using PRISM software for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). The significance threshold was set at $p \leq 0.05$. We considered that $p \leq 0.09$ was a tendency towards significance given the small numbers in our cohort.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Results

Clinical description of the population (Table 1)

The clinical characteristics of the 184 patients with ACPA-positive RA are shown in Table 1.

Serological profile of the 184 patients with ACPA positive RA (Table 2, Figure 1)

The biological characteristics of the 184 patients recruited as ACPA-positive RA based on their anti-CCP2 status are shown in Table 2. When re-assayed with a same reference assay, 98.51% of patients had anti-CCP2. On the other hand, 83.23% had AhFibA, and 69.98% had IgM RF.

- **Among the Fib-cit peptides,**
 - 76.13% of patients recognized biotin- α 171–185cit.
 - 67.10% recognised biotin- α 501–515cit.
 - 58.06 % recognised β 60–74cit.
 - 45.16% recognised α 621–635cit.
 - 14.84% recognised α 36–50cit.
- **Epitope recognition profile of ACPA in 20 random RA patients (Figure 1)**

Analysis of epitope recognition was performed in 20 randomly chosen patients:

 - 19% of patients recognized the 4 peptides β 60–74cit, α 501–515cit, α 621–635cit, and α 171–185cit.
 - 15% of patients recognized the 3 peptides β 60–74cit, α 501–515cit, and α 171–185cit.
 - 4% of patients only recognised α 171-185cit.

Correlations of the titres of anti-CCP2 and anti-Fib-cit peptides antibodies (Figure 2)

Anti-CCP2 and AhFibA titres are strongly correlated (r_s : 0.7037; $p = 5.69 \times 10^{-29}$ Pearson's)

Anti-CCP2 and anti-Fib-cit peptides titres are strongly correlated for 4 of the 5 peptides:

- β 60–74cit (r_s : 0.5162; $p = 5.43 \times 10^{-14}$, Pearson's)
- α 621-635cit (r_s : 0.2703; $p = 0.0002$, Pearson's)
- α 501–515cit (r_s : 0.2979; $p = 3.82 \times 10^{-5}$, Pearson's)
- α 171-185cit (r_s : 0.6473 ; $p = 2.41 \times 10^{-23}$, Pearson's)

By contrast there is no correlation of anti-CCP2 titres and anti- α 36–50cit titres (r_s : 0.0078; p = 0.916).

HLA-DRB1 background

Among the 184 patients with ACPA-positive RA, 155 were genotyped for HLA-DRB1. Their clinical characteristics were not different from those in the total 184 patients (see supplementary Tables 1 and 2).

67.1% of patients were SE positive (49% of patients expressed one copy of the SE, 18.1% expressed two copies).

HLA-DR status and clinical characteristics

44/155 patients expressed HLA-DRB1*0401 of whom 11 had rheumatoid nodules, 111/155 patients did not express HLA-DRB1*0401 of whom 19 had rheumatoid nodules (Chi2, OR = 2.15 [0.91 – 5.25]; p = 0.081). Thus, HLA-DRB1*04:01 was associated with rheumatoid nodules. Other clinical characteristics were not associated with any HLA-DRB1 allele.

HLA-DRB1 and recognition of Fib-cit peptides (Table 3)

1/ SE dose effect on the number of Fib-cit peptides recognized

Patients with two copies of the SE recognized more than 3 Fib-cit peptides (OR = 3.02 [1.12 – 8.74]; p = 0.034)

2/ HLA-DRB1 alleles and Fib-cit epitope specificity

HLA-DRB1*0401 was associated with antibodies to α 501-515 (OR = 5.52 [2.00 – 13.64]; p =0.0003), and with absence of antibodies to α 621-625 (OR=0.46 [0.23 – 0.95]; p =0.036).

Epitope specificity of anti-Fib-cit antibodies and clinical characteristics (Table 4 and supplementary Table 3)

1/ Multiple peptide recognition

42 of 184 patients recognized more than 3 Fib-cit peptides. The 142 remaining patients recognized 3 Fib-cit peptides or less. Patients who recognized more than 3

1
2 Fib-cit peptides showed better responses to TNF-alpha inhibitors (OR = 2.93 [1.16 –
3 7.48]; p = 0.025) and had non erosive RA (OR = 0.45 [0.19 – 1.04]; p = 0.051).
4
5
6

7 **2/ Recognition of the α501–515 epitope was associated with RF and rheumatoid**
8 **nodules** (Table 4)
9

10 30/180 patients had and 130 had not rheumatoid nodules, data being unknown for 20
11 patients.
12
13

- 14 - Reactivity against α501–515cit tended to be associated with rheumatoid
15 nodules (OR= 2.32 [0.95 -5.80], p = 0.08).
16
- 17 - High level reactivity against α501–515cit was associated with rheumatoid
18 nodules. 79/184 patients had high level reactivity against α501–515cit, among
19 them 18 patients had rheumatoid nodules, 61/184 patients had not high level
20 reactivity against α501–515cit, of whom only 6 patients had rheumatoid
21 nodules (OR=2.71 [1.00 – 7.16], p= 0.044).
22
- 23 - Anti α501–515cit antibodies were associated with RF (OR=2.31 [1.10 – 4.78],
24 p= 0.026).
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Discussion

We studied the association between HLA-DR background, specificity of ACPAs to epitope borne by citrullinated Fibrinogen and clinical characteristics in 184 patients with ACPA-positive RA fulfilling the ACR/EULAR 2010 criteria.

The clinical and biological characteristics of the RA population studied were classical [5].

Analysis of ACPA epitope specificities in our 184 plasmas partly differed from those described in pilot studies mainly for the peptide α 36-50cit and for α 501-515cit and α 171-185cit used biotinylated in the present study :

- 58% had anti- β 60-74cit antibodies versus 70% of patients in pilot studies.
- 15% had anti- α 36-50cit antibodies versus 60% of patients in pilot studies.
- 45% had anti- α 621-635cit antibodies versus 50% of patients in pilot studies.
- 67% had anti- α 501-515cit antibodies versus 45% of patients in pilot studies.
- 76% had anti- α 171-185cit antibodies versus 45 % of patients in pilot studies.

For the 2 peptides α 501-515cit and α 171-185cit the difference results from the sensitivity of the ELISAs used. In the pilot study [7], the peptides were adsorbed on polystyrene plates whereas in this study the biotinylated peptides were linked on avidin-coated ELISA plates. Such an enhancement of the sensitivity is well known and was already demonstrated for citrullinated peptides [20].

We first analysed association between multiple peptide recognition and clinical characteristics.

Multiple peptide recognition (> 3) was not associated with erosive arthritis, although data showed association between erosions and high level of ACPA [21,22].

Multiple peptide recognition (> 3) was associated with a better response to TNF-alpha inhibitors although contradictory data was found in literature : indeed the presence of ACPA has been associated either with a reduced response [23], no effect [24] or a better response [25]. A better response to TNF-alpha inhibitors may explain the less erosive pattern observed in our patients with multiple peptide recognition. Indeed, TNF-alpha inhibitors limit radiographic progression in patients with RA [26].

Pulmonary lesions were not studied here because few patients had a chest computerized tomography-scan in this study.

We then analyzed association between Fib-cit peptides and HLA background and clinical characteristics.

We found that:

1/ HLA-DRB1*0401 was associated with anti- α 501–515cit antibodies.

2/ Rheumatoid nodules were associated with HLA-DRB1*0401.

3/"High level" anti- α 501–515cit antibodies were associated with rheumatoid nodules and rheumatoid factors.

1/ HLA-DRB1*0401 was associated with anti- α 501–515cit antibodies.

Indeed, 44/155 patients expressed HLA-DRB1*0401 of whom 76 had anti- α 501-515cit antibodies, 111/155 patients did not express HLA-DRB1*0401 of whom 65 had anti- α 501-515cit, OR = 5.52 [2.00-13.64] ; p = 0.0003 (Table 3).

In the development of IgG antibody responses, HLA-DR molecules intervene by presenting antigenic peptides to T follicular helper (Tfh) lymphocytes that provide help to B lymphocytes with surface IgM of a given specificity. Specificity of the antibody response relies on the IgM molecule on the B lymphocyte, not on the antigenic peptide presented by-HLA-DR.

Thus, association of HLA-DRB1*0401 with anti- α 501-515cit antibodies does not indicate that this RA-associated allele is capable to choose between different B cell epitopes. Rather it suggests that HLA-DRB1*0401 can provide help to B lymphocytes specific for α 501-515cit Fib-cit peptide and that others HLA-DR alleles can't. This suggests special efficacy of HLA-DRB1*0401 as a peptide processor and presentator which in turn allows the development of a more efficient Tfh response. HLA-DR molecules encoded by HLA-DRB1*0401 have been shown to undergo a shortcut from endoplasmic reticulum to lysosomes which allows association with better processed antigenic peptide [27,28].

2/ HLA-DRB1*0401 was associated with rheumatoid nodules

Indeed, 44/155 patients expressed HLA-DRB1*0401 of whom 11 had rheumatoid nodules, 111/155 patients did not express HLA-DRB1*0401 of whom 19 had rheumatoid nodules (OR = 2.15 [0.91 – 5.25] ; p = 0.081). Association of HLA-DRB1*0401 with rheumatoid nodules is classical [22,29].

3/ “High level” anti- α 501-515cit antibodies were associated with rheumatoid nodules

Indeed, 79/184 patients had high level reactivity against α 501–515cit, among them 18 patients had rheumatoid nodules, 61/184 patients had not high level reactivity against α 501–515cit, of whom 6 patients had rheumatoid nodules (OR=2.71 [1.00 – 7.16], $p=0.044$). Anti α 501–515cit antibodies were also associated with RF (OR=2.31 [1.10 – 4.78], $p=0.026$). Rheumatoid nodules contain Fibrinogen and IgG. Their necrotic centre contains citrullinated proteins and IgM rheumatoid factor [30,31]. So, our data suggests that anti- α 501–515cit antibodies might form immune complexes with Fib-cit and rheumatoid factors and be at the origin of rheumatoid nodules.

We analyzed the epitope specificity of ACPAs using five major citrullinated Fibrinogen peptides and checked whether they were associated with particular clinical, biological, or genetic patterns. Our main finding is the association of antibodies to epitopes borne by the citrullinated peptide α 501–515 present on the alpha chain of fibrinogen, with HLA-DRB1*0401 and with rheumatoid nodules. This unexpected epitope specificity of ACPAs in HLA-DRB1*0401 patients may relate to the original intracellular route of HLA-DRB1*0401. The association of anti- α 501–515cit antibodies with rheumatoid nodules may suggest that anti- α 501–515cit particularly contributes to the immune complexes in rheumatoid nodules.

Author contributions. NB, GS, GL designed research and analysed data. MM, NB, IA collected samples. MP, GO, and CC tested and analysed fine specificities. VP performed statistical analysis. GL, NB, PL analysed patients files. GL, NB, JR wrote the manuscript. JR and GS corrected the manuscript.

Acknowledgments. This study was supported by INSERM. The authors would like to thank all physicians who participated in the diagnostics and therapy of the presented patients.

Competing interests

The authors declare no financial interests that could create a potential conflict of interest or the appearance of a conflict of interest regarding this work.

References

- 1 Alamanos Y, Drosos A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews* 2005;**4**:130–6. doi:10.1016/j.autrev.2004.09.002
- 2 Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *The Lancet* 2016;**388**:2023–38. doi:10.1016/S0140-6736(16)30173-8
- 3 Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987;**30**:1205–13. doi:10.1002/art.1780301102
- 4 de Almeida DE, Ling S, Holoshitz J. New insights into the functional role of the rheumatoid arthritis shared epitope. *FEBS Letters* 2011;**585**:3619–26. doi:10.1016/j.febslet.2011.03.035
- 5 Balandraud N, Picard C, Revirion D, et al. HLA-DRB1 Genotypes and the Risk of Developing Anti Citrullinated Protein Antibody (ACPA) Positive Rheumatoid Arthritis. *PLoS ONE* 2013;**8**:e64108. doi:10.1371/journal.pone.0064108
- 6 Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, et al. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998;**101**:273–81. doi:10.1172/JCI1316
- 7 Sebbag M, Moinard N, Auger I, et al. Epitopes of human fibrin recognized by the rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins. *Eur J Immunol* 2006;**36**:2250–63. doi:10.1002/eji.200535790
- 8 England BR, Thiele GM, Mikuls TR. Anticitrullinated protein antibodies: origin and role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. 2017. doi:info:doi/10.1097/BOR.0000000000000356
- 9 Schellekens GA, Visser H, Hazes JMW, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. ;:9.
- 10 Ji M, Hur M, Moon H-W, et al. Comparison of second- and third-generation immunoassays for detection of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 2018;**78**:477–82. doi:10.1080/00365513.2018.1499957
- 11 Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis & Rheumatism* 2010;**62**:2569–81. doi:10.1002/art.27584
- 12 Nogueira L, Sebbag M, Chapuy-Regaud S, et al. Autoantibodies to deiminated fibrinogen are the most efficient serological criterion for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research*;4:38.
- 13 Iobagiu C, Magyar A, Nogueira L, et al. The antigen specificity of the rheumatoid arthritis-associated ACPA directed to citrullinated fibrin is very closely restricted. *Journal of Autoimmunity* 2011;**37**:263–72. doi:10.1016/j.jaut.2011.07.003
- 14 Nogueira L, Cornillet M, Singwe-Ngandeu M, et al. In Black Africans with rheumatoid arthritis, ACPA recognize citrullinated fibrinogen and the derived peptides α 36-50Cit38,42 and β 60-74Cit60,72,74, like in Caucasians. *Clinical Immunology* 2014;**152**:58–64. doi:10.1016/j.clim.2014.02.011

- 15 Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, *et al.* The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 1988;**31**:315–24. doi:10.1002/art.1780310302
- 16 van Gestel AM, Haagsma CJ, van Riel PL. Validation of rheumatoid arthritis improvement criteria that include simplified joint counts. *Arthritis and Rheumatism* 1998;**41**:1845–50. doi:10.1002/1529-0131(199810)41:10<1845::AID-ART17>3.0.CO;2-K
- 17 Smolen JS, Landewé RBM, Bijlsma JWJ, *et al.* EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann Rheum Dis* 2020;:annrheumdis-2019-216655. doi:10.1136/annrheumdis-2019-216655
- 18 van der Heijde D, van der Helm-van Mil AHM, Aletaha D, *et al.* EULAR definition of erosive disease in light of the 2010 ACR/EULAR rheumatoid arthritis classification criteria. *Ann Rheum Dis* 2013;**72**:479–81. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202779
- 19 Chapuy-Regaud S, Nogueira L, Clavel C, *et al.* IgG subclass distribution of the rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated fibrin. *Clinical & Experimental Immunology* 2005;**139**:542–50. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02708.x
- 20 Cornillet M, Babos F, Magyar A, *et al.* Seropositivity and Antibody Profiling of Patients Are Dramatically Impacted by the Features of Peptides Used as Immunosorbents: A Lesson from Anti-Citrullinated Protein/Peptide Antibody. *Jl* 2018;**201**:3211–7. doi:10.4049/jimmunol.1800330
- 21 Joo YB, Park Y-J, Park K-S, *et al.* Association of cumulative anti-cyclic citrullinated protein antibodies with radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2019;**38**:2423–32. doi:10.1007/s10067-019-04554-w
- 22 Scherer HU, van der Woude D, Willemze A, *et al.* Distinct ACPA fine specificities, formed under the influence of HLA shared epitope alleles, have no effect on radiographic joint damage in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2011;**70**:1461–4. doi:10.1136/ard.2010.146506
- 23 Potter C, Hyrich KL, Tracey A, *et al.* Association of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide positivity, but not carriage of shared epitope or *PTPN22* susceptibility variants, with anti-tumour necrosis factor response in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;**68**:69–74. doi:10.1136/ard.2007.084715
- 24 Lv Q, Yin Y, Li X, *et al.* The Status of Rheumatoid Factor and Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody Are Not Associated with the Effect of Anti-TNF α Agent Treatment in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2014;**9**:e89442. doi:10.1371/journal.pone.0089442
- 25 Sokolove J, Schiff M, Fleischmann R, *et al.* Impact of baseline anti-cyclic citrullinated peptide-2 antibody concentration on efficacy outcomes following treatment with subcutaneous abatacept or adalimumab: 2-year results from the AMPLE trial. *Ann Rheum Dis* 2016;**75**:709–14. doi:10.1136/annrheumdis-2015-207942
- 26 Murray E, Ellis A, Butylkova Y, *et al.* Systematic review and network meta-analysis: effect of biologics on radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Journal of Comparative Effectiveness Research* 2018;**7**:959–74. doi:10.2217/cer-2017-0106
- 27 Auger I, Escola JM, Gorvel JP, *et al.* HLA-DR4 and HLA-DR10 motifs that carry susceptibility to rheumatoid arthritis bind 70-kD heat shock proteins. *Nat Med* 1996;**2**:306–10. doi:10.1038/nm0396-306

1
2 28 Roth S, Willcox N, Rzepka R, *et al.* Major Differences in Antigen-Processing Correlate with a Single
3 Arg⁷¹ ↔ Lys Substitution in HLA-DR Molecules Predisposing to Rheumatoid Arthritis and with Their
4 Selective Interactions with 70-kDa Heat Shock Protein Chaperones. *J Immunol* 2002;**169**:3015–20.
5 doi:10.4049/jimmunol.169.6.3015
6
7 29 Weyand CM, Xie C, Goronzy JJ. Homozygosity for the HLA-DRB1 allele selects for extraarticular
8 manifestations in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1992;**89**:2033–9. doi:10.1172/JCI115814
9
10 30 Turunen S, Huhtakangas J, Nousiainen T, *et al.* Rheumatoid arthritis antigens homocitrulline and
11 citrulline are generated by local myeloperoxidase and peptidyl arginine deiminases 2, 3 and 4 in
12 rheumatoid nodule and synovial tissue. *Arthritis Res Ther* 2016;**18**:239. doi:10.1186/s13075-016-
13 1140-9
14
15 31 Athanasou NA, Quinn J, Woods CG, *et al.* Immunohistology of rheumatoid nodules and rheumatoid
16 synovium. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1988;**47**:398–403. doi:10.1136/ard.47.5.398
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 1 : Different profile of epitopic reactivity in a sample of 20 patients

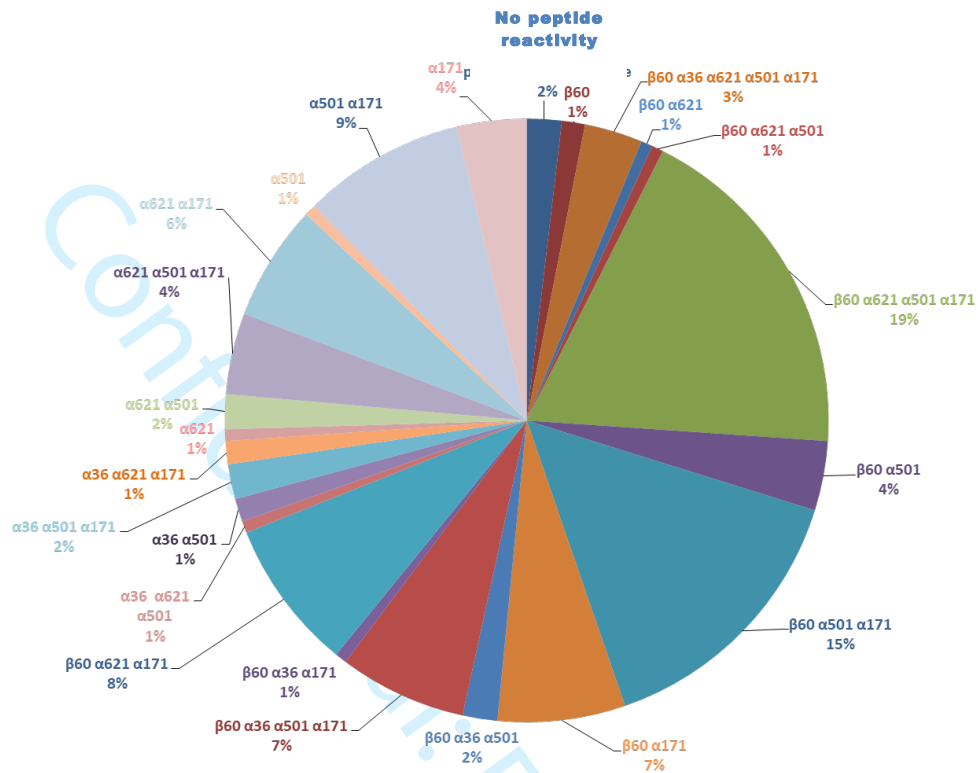
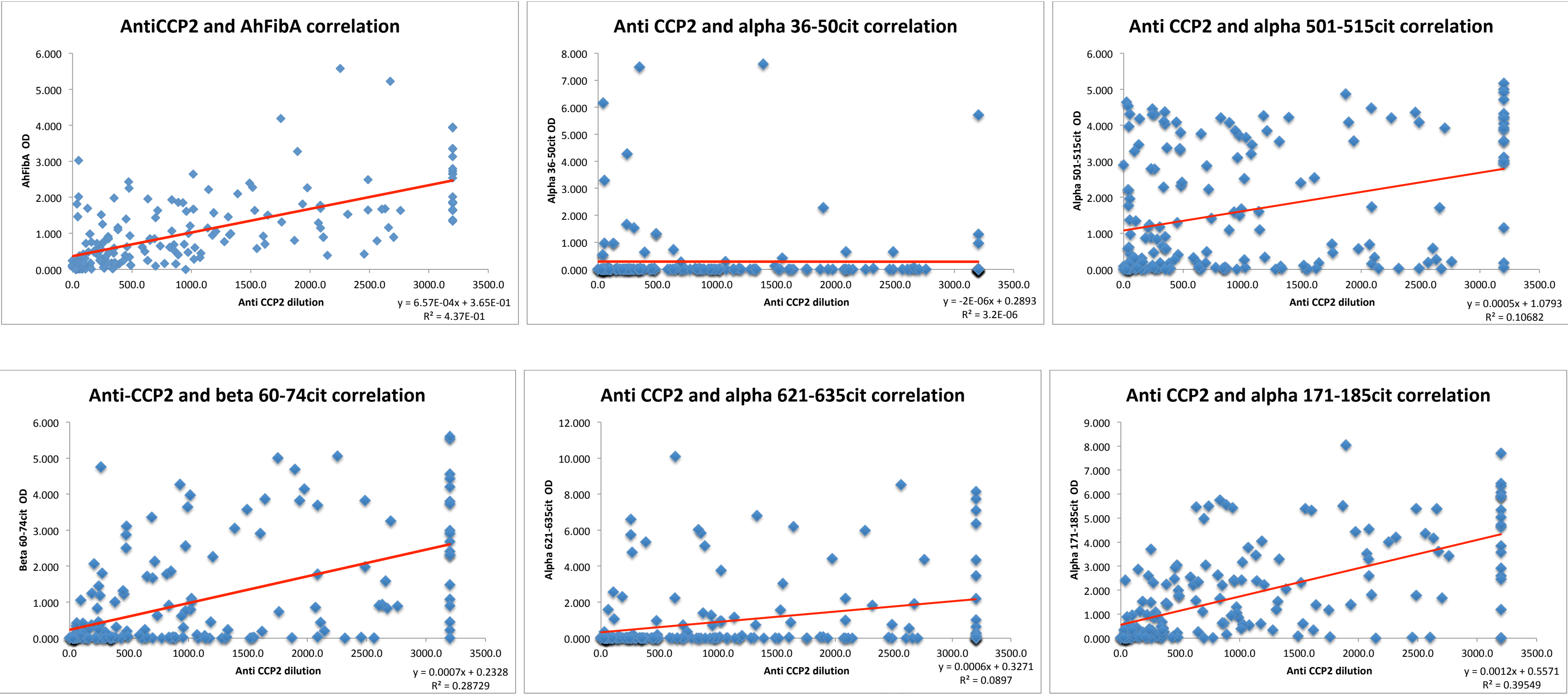


Figure 2 : Correlation between the ODs of anti peptide ELISA and AhFibA and the titers of anti CCP2 tests



OD : optical density ; AhFibA : anti human fibrinogen antibodies ; anti CCP : anti cyclic citrullinated peptides

Positive correlation between anti CCP2 and AhFibA (r_s : 0,7037 ; p = 5,69x10⁻²⁹). Positive correlation between anti CCP2 and β 60–74 (r_s : 0,5162 ; p = 5,43x10⁻¹⁴), α 621-635 (r_s : 0,2703 ; p = 0,0002), α 501–515 (r_s : 0,2979 ; p = 3,82x10⁻⁵), α 171-185 (r_s : 0,6473 ; p = 2,41x10⁻²³).

No correlation between anti CCP2 and anti α 36–50 (r_s : 0,0078 ; p = 0,916).

Table 1: Clinical characteristics of patients

Number of patients	184
Age (years, mean)	62
Women (%)	75.5
Diagnostic delay (mean, years)	0.9
Age at diagnosis (mean, years)	46.4
Rheumatoid nodules	30/180 (16.6 %)
Smoker (active or previous)	90/180 (50 %)
DAS28 at inclusion	2.44
Major cardiovascular event	15/180 (8.3 %)
Erosive rheumatoid arthritis	64/180 (35.5 %)
Dry eye syndrome	11/167 (6.6 %)
Rheumatoid Factor	121/161 (75%)
Treatment	Good responders/ number treated
TNF-alpha inhibitors	90/137 (65.6 %)
Tocilizumab	37/53 (69.8 %)
Abatacept	24/46 (52.1 %)

Table 2: AhFibA and five major citrullinated Fibrin peptides

	Negative	Positive
AhFibA	27/184 (14.67 %)	157/184 (85.33%)
β60–74cit	76/184 (41.30 %)	108/184 (58.70%)
α36–50cit	157/184 (85.33 %)	27/184 (14.67%)
α621–635cit	103/184 (55.98%)	81/184 (44.02%)
α501–515cit	62/184 (33.70 %)	122/184 (66.3%)
α171–185cit	45/184 (24.46 %)	139/184 (75.54%)

Table 3: Association between epitopic specificity of ACPAs and HLA-DRB1 alleles

		Shared Epitope N=104/155				HLA-DRB1*04:01 N=44/155				HLADRB1*04:04,*04:05, *04:08,*01 N=69/155				HLADRB1*10:01 N=14/155			
		NO (n)	YES (n)	Odds Ratio [CI 95%]	p	NO (n)	YES (n)	Odds Ratio [CI 95%]	p	NO (n)	YES (n)	Odds Ratio [CI 95%]	p	NO (n)	YES (n)	Odds Ratio [CI 95%]	p
β60-74cit	NO (n)	25	40	1.54 [0.80 – 2.98]	0.21	49	16	1.38 [0.68 – 2.84]	0.37	37	28	1.11 [0.58 – 2.13]	0.76	61	4	1.91 [0.60 – 5.72]	0.29
	YES (n)	26	64			62	28			49	41			80	10		
α36-50cit	NO (n)	45	88	1.36 [0.54 – 3.68]	0.54	95	38	0.93 [0.34 – 2.41]	0.90	77	56	1.99 [0.804 – 4.69]	0.14	120	13	0.44 [0.04 – 2.68]	0.42
	YES (n)	6	16			16	6			9	13			21	1		
α621-635cit	NO (n)	23	62	0.55 [0.28 – 1.06]	0.08	55	30	0.46 [0.23 – 0.95]	0.04	45	40	0.80 [0.42 – 1.50]	0.48	79	6	1.70 [0.53 – 5.27]	0.34
	YES (n)	28	42			56	14			41	29			62	8		
α501–515cit	NO (n)	23	28	2.23 [1.10 – 4.55]	0.02	46	5	5.52 [2.00 – 13.64]	0.0003	31	20	1.38 [0.71 – 2.77]	0.35	45	6	0.63 [0.19 – 1.97]	0.40
	YES (n)	28	76			65	39			55	49			96	8		
α171–185cit	NO (n)	15	22	1.55 [0.74 – 3.28]	0.26	30	7	1.96 [0.78 – 5.00]	0.14	22	15	1.24 [0.60 – 2.71]	0.58	35	2	1.65 [0.41 – 7.81]	0.52
	YES (n)	36	82			81	37			64	54			106	10		
Number of specificities	≤3	42	77	1.63 [0.71 – 4.01]	0.25	85	34	0.96 [0.42 – 2.20]	0.92	69	50	1.54 [0.74 – 3.28]	0.25	111	8	2.78 [0.85 – 8.31]	0.07
	>3	9	27			26	10			17	19			30	6		

N = number

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 4 : Rheumatoid nodules and Rheumatoid Factor association with peptide reactivity

		Rheumatoid Nodules (n = 30/180)				Rheumatoid Factor (n = 122/161)			
		NO (n)	YES (n)	Odds Ratio [CI 95%]	p	NO (n)	YES (n)	Odds Ratio [CI 95%]	p
Rheumatoid Factor (n=122/161)	NO (n)	35	3	2.89 [0.88 – 9.52]	0.08				
	YES (n)	97	24						
β60-74cit	NO (n)	63	11	1.25 [0.55 – 2.69]	0.59	15	54	0.79 [0.37 – 1.68]	0.52
	YES (n)	87	19			24	68		
α36-50cit	NO (n)	130	26	0.23 [0.33 – 2.89]	0.99	36	102	2.35 [0.70 – 7.83]	0.17
	YES (n)	20	4			3	20		
α621-635cit	NO (n)	81	19	0.68 [0.32 – 1.53]	0.35	25	68	1.42 [0.66 – 2.88]	0.36
	YES (n)	69	11			14	54		
α501–515cit**	NO (n)	55	6	2.32 [0.95 – 5.80]	0.08**	18	33	2.31 [1.10 – 4.78]	0.026
	YES (n)	95	24			21	89		
α171–185cit	NO (n)	37	7	1.08 [0.45 – 2.75]	0.88	11	30	1.21 [0.56 – 2.68]	0.65
	YES (n)	113	23			28	92		
Number of specificity	≤ 3	119	21	1.65 [0.69 – 3.78]	0.26	35	93	2.73 [0.91 – 7.61]	0.07
	> 3	31	9			4	29		

N= number of patients
NS: not significant.
** High level anti-α501–515cit was significantly associated with rheumatoid nodules
79/184 patients had high level anti- α501–515cit, among them 18 patients had rheumatoid nodules,
61/184 patients did not have high level anti- α501–515cit, of whom 6 patients had rheumatoid nodules.
OR =2.71 [1.00 – 7.16], p= 0.044

Supplementary table 1 : Clinical characteristics of the HLA-DRB1 genotyped population

Number of patients	155
Age (years, mean)	61.781
Women (%)	75.817
Diagnostic delay (mean, years)	1.013
Age at diagnosis (mean, years)	46.68
Rheumatoid nodules	26/152 (17.11 %)
Ever smoker	78/153 (50.98 %)
DAS28 at inclusion	2.49
Major cardiovascular event	15/152 (9.87 %)
Erosive rheumatoid arthritis	52/152 (34.21 %)
Mean number of erosions	5.357
Osteoporosis	28/146 (19.18 %)
Dry eye syndrom	11/150 (7.33 %)
treatment	good responders/ number treated
TNF alpha inhibitors	80/117 (68.4%)
Tocilizumab	27/41 (65.8%)
Abatacept good	23/39 (58.9%)

Supplementary Table 2 : Biological characteristics and serological profile of the genotyped population

	Negative	Positive
AhFibA	26/155 (16.77 %)	129/155 (83.23 %)
β60–74cit	65/155 (41.94 %)	90/155 (58.06 %)
α36–50cit	132/155 (85.16 %)	23/155 (14.84 %)
α621–635cit	85/155 (54.84 %)	70/155 (45.16 %)
α501–515cit	51/155 (32.90 %)	104/155 (67.10 %)
α171–185cit	37/155 (23.87 %)	118/155 (76.13 %)

Supplementary Table 3: Associations between clinical characteristics and ACPA epitopic specificities

	TNF-alpha inhibitors: good responders (n = 90/137)		Tocilizumab: good responders (n =37/ 53)		Abatacept: good responders (n = 24/46)		Erosive rheumatoid arthritis (n = 64/180)		Smoker (active or previous) (n = 90/180)	
	Odds Ratio [CI 95%]	p	Odds Ratio [CI 95%]	p	Odds Ratio [CI 95%]	p	Odds Ratio [CI 95%]	p	Odds Ratio [CI 95%]	p
Rheumatoid factors (n= 121/161)	1.13 [0.49 – 2.70]	ns	1.28 [0.35 – 4.81]	ns	0.66 [0.20 – 2.33]	ns	0.91 [0.44 – 1.87]	ns	2.37 [1.10 – 4.78]	<u>0.022</u>
Positivity β60-74cit	1.22 [0.61 – 2.55]	ns	0.79 [0.23 – 2.53]	ns	0.68 [0.22 – 2.39]	ns	1.03 [0.57 – 1.91]	ns	1.45 [0.80 – 2.67]	ns
Positivity α36-50cit	1.96 [0.72 – 5.10]	ns	0.53 [0.13 – 2.34]	ns	4.20 [0.58 – 53.48]	ns	0.67 [0.26 – 1.66]	ns	0.58 [0.25 – 1.31]	ns
Positivity α621-635cit	1.54 [0.74 – 3.18]	ns	0.98 [0.33 – 3.15]	ns	2.92 [0.84 – 9.82]	0.077	0.71 [0.38 – 1.35]	ns	1.26 [0.70 – 2.27]	ns
Positivity α501–515cit	1.03 [0.48 – 2.13]	ns	0.23 [0.05 – 1.07]	0.065	1.43 [0.41 – 5.38]	ns	0.97 [0.51 – 1.79]	ns	1.16 [0.63 – 2.15]	ns
Positivity α171–185cit	0.89 [0.38 – 2.09]	ns	1.21 [0.35 – 4.86]	ns	0.59 [0.17 – 2.15]	ns	1.37 [0.66 – 2.77]	ns	1.44 [0.74 – 2.91]	ns
Number of positivities	2.93 [1.16 – 7.48]	<u>0.025</u>	0.61 [0.16 – 2.16]	ns	4.12 [0.90 – 21.06]	0.086	0.45 [0.19 – 1.04]	0.051	1.56 [0.78 – 3.08]	ns

“ Au moment d’être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d’être fidèle aux lois de l’honneur et de la probité.

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

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

J’informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n’exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

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

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

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

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

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

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

