

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DE SANTE
DEPARTEMENT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2023

THESE 2023 TOU3 2033

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
par

LYDIA OUYAHIA

Nanoparticules de chitosane siRNA anti-TNF alpha dans la thérapie génique par voie orale de la polyarthrite rhumatoïde.

10 mai 2023

Directeurs de thèse : Julio César Fernandes – Isabelle Lajoie-Mazenc

JURY

Président : COUDERC, Bettina
1er assesseur : LAJOIE-MAZENC, Isabelle
2ème assesseur : FERNANDES, Julio César
3ème assesseur : BENDERDOUR, Mohamed
4ème assesseur : DELCAMP Clément

RESUME en français

La polyarthrite rhumatoïde est la maladie auto-immune qui a bénéficié des plus importants progrès au cours de ces dernières années, que ce soit dans les domaines de la physiopathologie, du diagnostic ou des thérapeutiques. Ces éléments réunis ont permis d'en améliorer considérablement la prise en charge et le pronostic, à tel point que la polyarthrite rhumatoïde est maintenant considérée, par certains, comme une pathologie plutôt bénigne. La recherche et le développement de thérapies innovantes continue de progresser. Parmi ces travaux de recherche, une étude préliminaire de thérapie génique à base de nanoparticules de chitosane-siRNA dirigés contre le TNF alpha qui représente une approche prometteuse avec des résultats encourageants quant à leur non-toxicité, leur biodisponibilité par voie orale ainsi que leur efficacité à la fois *in vitro* et sur le modèle murin.

I. Titre et résumé en Anglais : voir au recto de la dernière page de la thèse

DISCIPLINE administrative : Sciences pharmaceutiques

MOTS-CLES :

Polyarthrite rhumatoïde, facteur rhumatoïde, anticorps anti-CCP, sDMARDs, thérapie génique, nanoparticules, chitosane, siRNA-TNFalpha.

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Laboratoire d'orthopédie-Hôpital du sacré cœur de Montréal
5400 Boulevard Gouin O, Montréal, QC H4J 1V5, CANADA

Directeur de thèse : Julio César Fernandes – Isabelle Lajoie-Mazenc

PERSONNEL ENSEIGNANT
du Département des sciences pharmaceutiques de la Faculté de santé
au 1^{ER} novembre 2022

Professeurs Emérites

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B. (Directrice-adjointe)	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BERNARDES-GENISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Doyen-directeur)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. DELCOURT N.	Biochimie	Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique	Mme AUTHIER H.	Parasitologie
Mme KELLER L.	Biochimie	M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique	Mme BON C. (*)	Biophysique
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique	M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique	M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme SALABERT A.S.	Biophysique	Mme CABOU C.	Physiologie
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie	Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie	Mme CHAPUY-REGAUD S. (*)	Bactériologie - Virologie
		Mme COLACIOS C. (*)	Immunologie
		Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
		Mme DERA EVE C. (*)	Chimie Thérapeutique
		Mme ECHINARD-DOUIN V (*)	Physiologie
		Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F.	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
		Mme GADEA A.	Pharmacognosie
		Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
		Mme LEFEVRE L.	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C. (*)	Pharmacognosie
		M. LE NAOUR A.	Toxicologie
		M. LEMARIE A.	Biochimie
		M. MARTI G.	Pharmacognosie
		Mme MONFERRAN S	Biochimie
		M. PILLOUX L.	Microbiologie
		M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
		Mme TOURRETTE-DIALLO A.	Pharmacie Galénique
		(*)	Pharmacognosie
		Mme VANSTEELANDT M.	Mathématiques
		Mme WHITE-KONING M. (*)	

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires		Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)	
M. AL SAATI A	Biochimie	M. TABTI Redouane	Chimie thérapeutique
Mme BAKLOUTI S.	Pharmacologie	Mme HAMZA Eya	Biochimie
Mme CLARAZ P.	Pharmacie clinique	Mme MALLI Sophia	Pharmacie galénique
Mme CHAGNEAU C.	Microbiologie		
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie		
Mme STRUMIA M.	Pharmacie clinique		
Mme DINTILHAC A.	Droit Pharmaceutique		
Mme ROGOLOT L	Bio cellulaire,immuno		

Remerciements :

Je tiens à remercier ma directrice de thèse Isabelle Lajoie-Mazenc pour son dévouement et son soutien. Je la remercie pour ses conseils, sa bienveillance et ses encouragements qui ont permis de finaliser ce travail.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse et maître de stage Julio Fernandes de m'avoir accueilli dans son équipe de recherche et permis de mener à bien ce projet, je le remercie pour sa confiance, sa positivité et son imagination débordante et tellement utile en recherche scientifique.

Je voudrais remercier Mohamed Benderdour pour son accueil dans son laboratoire, son soutien et ses critiques constructives qui ont été un guide dans l'accomplissement de ce travail.

Je voudrais également remercier toute l'équipe de recherche particulièrement Patricia Rondon, Qin Shi, Houda Benabdoun, Francis Vallières et tous les autres stagiaires pour leur support, leurs précieux conseils et d'avoir permis que mon stage de fin d'études se déroule dans la joie et la bonne humeur.

Je tiens à offrir mes remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce projet.

Je tiens à souligner tout le support et le réconfort que mes amis et camarades m'ont donné au courant de mes études.

Enfin, je voudrais offrir toute ma gratitude à ma famille pour leur support inébranlable, leur patience et leur amour.

Tables des matières

I. Introduction :	12
II. Partie 1 : Etats des lieux	13
1. Données épidémiologiques :	13
2. Physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde :	13
2.2. Phase clinique de la PR :	15
2.2.1. Atteinte synoviale :	16
2.2.2. Atteinte cartilagineuse :	17
2.2.3. Atteinte osseuse :	17
3. Facteurs de risque pour la PR :	17
3.1. Facteurs génétiques :	18
3.2. Facteurs environnementaux :	18
3.2.1. Tabac :	18
3.2.2. Infections :	19
3.2.2.1. Les parodontopathies :	19
3.2.2.2. Le microbiote :	19
3.2.2.3. Les infections pulmonaires :	20
4. Symptomatologie de la polyarthrite rhumatoïde :	20
4.1. Manifestations articulaires :	20
4.1.1. PR débutante :	20
4.1.2. PR avérée :	21
4.1.3. PR séquellaire :	23
4.2. Manifestations extra-articulaires :	23
5. Diagnostic de la PR :	24
5.1. Diagnostic clinique :	24
5.2. Diagnostic biologique :	27
5.2.1. Syndrome biologique inflammatoire :	27
5.2.2. Le facteur rhumatoïde :	27
5.2.3. Les anticorps anti-CCP :	28
5.2.4. Les anticorps anti-nucléaires :	28
5.3. Histologie synoviale :	28
5.4. Imagerie :	29
5.4.1. Radiographie standard :	29
5.4.2. Echographie articulaire :	29
5.5. Mise en place du diagnostic final :	30
6. Pronostic de la PR :	30

7.	Prise en charge thérapeutique de la polyarthrite rhumatoïde :	31
7.1.	Traitement d'action immédiate :	35
7.2.	Traitements de fond :	36
7.2.1.	Les sDMARDs :	36
7.2.2.	Les bDMARDs (Biothérapies):	36
7.2.2.1.	Anti-TNF alpha : Adalimumab, Certolizumab, Etanercept, Infliximab, Golimumab 39	
7.2.2.2.	Anti Il-6 : Tocilizumab (34)	41
7.2.2.3.	Anti Lymphocyte T : Abatacept	41
7.2.2.4.	Autres biothérapies disponibles dans l'arsenal thérapeutique de la PR :	42
7.2.2.4.1.	Anti IL1 :Anakinra	42
7.3.	Traitements locaux :	43
7.3.1.	Ponction articulaire :	43
7.3.2.	Infiltration de corticoïdes intra-articulaire :	43
7.3.3.	Synoviorthèse :	43
7.3.4.	Lavage articulaire :	43
7.4.	Rééducation et réadaptation fonctionnelle :	43
7.5.	Appareillage :	44
	(SOCIETE FRANÇAISE DE RHUMATOLOGIE 2012)	44
7.6.	Traitement chirurgical :	44
7.7.	Autres prises en charge :	44
7.7.1.	Education thérapeutique :	44
7.7.2.	Prise en charge psychologique :	45
8.	Perspectives thérapeutiques :	45
III.	Partie 2 : Résultats de recherche :	46
2.	Matériels et méthodes :	47
3.	Résultats et discussion :	51
III.	Conclusion :	70

Tables des figures :

Figure 1: Citrullination des résidus arginine par la PAD	14
Figure 2: Physiopathologie de la Polyarthrite Rhumatoïde	15
Figure 3: Comparaison des aspects physiopathologiques du cartilage sain et arthritique (1)	16
Figure 4: Déformations articulaires, au niveau des doigts et des pieds, causées par la PR.....	22
Figure 5: Polyarthrite Rhumatoïde : atteinte de l'avant pied (hallux valgus)	22
Figure 6: Polyarthrite rhumatoïde: Flexum du genou	23
Figure 7: Polyarthrite rhumatoïde : nodules rhumatoïde	24
Figure 8: Polyarthrite rhumatoïde : syndrome de Raynaud	24
Figure 9: évolution des lésions articulaires dans la PR de la main vue à la radiographie standard ..	29
Figure 10: Objectifs du traitement et organisation de la prise en charge de la PR.....	33
Figure 11: Prise en charge de la PR (Vidal recos).....	34
Figure 13: Caractérisation par Électrophorèse sur gel d'agarose des différentes NPs préparées	52
Figure 14 Caractérisation des Nanoparticules (Taille et Potentiel zéta).....	53
Figure 15: Stabilité des Nanoparticules Chitine-siRNA dans le temps.....	55
Figure 16 : Stabilité dans le temps des NPs	56
Figure 17: Analyse de la toxicité des NPs à différents ratios	58
Figure 18: Taux de TNF- α produits par les Raw 264.7 après transfection.	59
Figure 19:images illustrant les sacs intestinaux	60
Figure 20: Absorption intestinale ex vivo des NPs	61
Figure 21: Vue dorsale des résultats de biodistribution in vivo des NPs chez la souris.....	63
Figure 22:Vue ventrale des résultats de biodistribution in vivo des chez la souris	64
Figure 23:Poids des souris en fonction du temps.....	66
Figure 24:Épaisseur de la patte postérieure gauche des souris en fonction du temps.....	67
Figure 25:score arthritique des souris en fonction du temps.	68
Figure 26:Pattes de souris au jour 10.....	69

Table des tableaux

Tableau 1: Manifestations articulaires de la PR	21
Tableau 2: Manifestation extra-articulaires de la PR	23
Tableau 4: diagnostic différentiel de la PR en fonctions des symptômes systémiques associés	26
Tableau 5: diagnostic différentiel d'une polyarthralgie/Polyarthrite en fonction de la durée des symptômes	26
Tableau 6: sensibilité/spécificité du diagnostic biologique	28
Tableau 7: Critères EULAR/ACR 2010 pour le diagnostic de la PR	30
Tableau 8: facteurs de mauvais pronostic de le PR	30
Tableau 9: score DAS 28 de la PR	31
Tableau 10 : Définition de la rémission selon l'ACR/EULAR	32
Tableau 11 : Clinical Disease Activity Index de la PR	32
Tableau 12: sDMARDs : traitement de fond de la PR	37
Tableau 13 : Anticorps anti-TNF alpha	39

Tables des abréviations:

AC: Anticorps
ACPA: Anti Citrullinated Peptides Antibodies
ACR: American College of Rheumatology
ADAMTS: A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs
ADN : acide désoxyribonucléique
AF : acide folique
AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien
AMEM : alpha Modified Eagle's Medium
APS: Anti-Paludeen de synthese
AR : arthrite rhumatoïde
bDMARD: Biological disease-modifying antirheumatic drugs
Caco-2 : cellules de carcinome colorectal
CCP: peptides cycliques citrullinés
CD4+: Cluster de Différenciation
CH : chitosane
CMH : Complexe moléculaire d'histocompatibilité
CRP: Protéine C Réactive
CTLA: Cytotoxic T Lymphocyte T Associated Antigen
Cy5.5 : cyanine 5.5
DAS: Disease Activity Score
DEAE : diethylaminoethyl
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EBV: Epstein-Barr Virus
EULAR : European Alliance of Associations for Rheumatology
FBS : fetal bovin serum
Fc : Fragment cristallisable
FGS : fluide gastrique simulé
FIS : fluide intestinal simulé
FITC : Fluorescein isothiocyanate
FoxP3 : Forkhead box P3
HAS : Haute Autorité de Santé
HERV: Human endogenous retroviruses
HHV : Herpes Humain virus
HLA : Human leukocyte antigen
Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine
IP : intra-péritonéale
IPD : Interphalangiennne Distale
IPP : Interphalangiennne Proximale
JAK: Janus kinases
LEF: Leflunomide
LPS : lipopolysaccharide
LTh: Lymphocytes T helper
MCP : Métacarpo-phalangiennne
M-CSF : Monocyte colony-stimulating factor
MMP : Matrice Métalloprotéase
MTHFR : Méthylène-tétrahydrofolate réductase
MTP : Métatarso-phalangiennne
MTX: Methotrexate
NFS: Numération formule sanguine
NPs : Nanoparticules
PBS : Phosphate-buffered saline
PDA: Peptidylarginine deiminase
PEG : polyéthylenglycol
PR: Polyarthrite rhumatoïde
PS : penniciline streptomycine
RANK: Receptor activator of nuclear factor kappa-B
RANKL: Receptor activator of nuclear factor kappa-B Ligand
SDAI: Simplified disease activity index
sDMARD: Syntethic disease-modifying antirheumatic drugs
siRNA : small interfering RiboNucleic Acid
SMR: Ratio standardisé de mortalité
SSZ: Sulfasalazine
TGF- β : Transforming growth factor β
THF: Tétrahydrofolique
TNF α : Tumor Necrosis factor alpha
VEGF : Vascular endothelial growth factor
VIH : Human immunodeficiency virus
VS: Vitesse de sédimentation

I. Introduction :

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques (1). C'est une maladie auto-immune qui se caractérise par la destruction progressive de la membrane synoviale au niveau articulaire provoquant inflammation, douleurs et raideurs articulaires. Sans prise en charge à temps, la PR évolue par poussées jusqu'à la destruction des articulations (2). C'est une pathologie handicapante multifactorielle avec des facteurs de risques génétiques, environnementaux, psychologiques, immunologiques et endocriniens, avec des comorbidités qui rendent le diagnostic compliqué,

Le diagnostic et le traitement précoce de la PR peuvent éviter ou ralentir considérablement la progression des lésions articulaires, prévenant ainsi des lésions irréversibles invalidantes. La mise au point de nouveaux outils pour mesurer l'activité de la maladie (présence ou absence de rémission) a contribué à l'élaboration de nouvelles stratégies de traitement afin de ralentir la progression de la PR avant que les articulations ne soient endommagées de manière irréversible (3).

Ces vingt dernières années une importante avancée en termes de diagnostic de la PR et des thérapeutiques a été réalisée (4), Ces innovations thérapeutiques sont en lien avec les avancées effectuées dans la compréhension de la physiopathologie de la PR. Parmi elles, les thérapies ciblées mais également les thérapies géniques font toujours l'objet de recherches innovantes, tels que les biothérapies qui visent à limiter l'action des cytokines inflammatoires.

L'objectif de ce travail de mémoire est, dans un premier temps, de faire un état des lieux des données récentes concernant l'épidémiologie, la physiopathologie, les facteurs de risques, le diagnostic ainsi que les outils thérapeutiques de prise en charge de la PR. Dans un deuxième temps, seront abordés les résultats de recherche liés à une étude préliminaire intitulée « nanoparticules de chitosane-siRNA (TNF-alpha) dans la thérapie génique par voie orale de la PR ». Résultats de recherche obtenus dans le cadre d'un stage de fin d'études au sein du laboratoire d'orthopédie de l'hôpital sacré cœur de Montréal-Canada.

II. Partie 1 : Etats des lieux

1. Données épidémiologiques :

Du fait de l'hétérogénéité de la PR, les études épidémiologiques de cette dernière sont difficiles à mettre en place (5). En effet, la symptomatologie de la PR peut être commune à d'autres rhumatismes inflammatoires transitoires (régressant spontanément avec le temps). Cela est rendu plus complexe également à cause de l'absence de test diagnostique suffisamment sensible et spécifique à la PR (5).

Une variabilité dans la prévalence de la PR est constatée selon les pays et les ethnies, ainsi la prévalence est de 0.8% en Europe du nord et en Amérique du nord, elle est de 0.3-0.8% en Asie, en Afrique elle atteint 3.3% dans certaines ethnies, voire 6% chez les indiens Yakima (taux de consanguinité élevé) (5). En France la prévalence de la PR est estimée à 0.31%. La prévalence est de 0,51 % pour les femmes et 0,09 % pour les hommes (6) ce qui met en évidence une implication du facteur hormonal dans les facteurs de risque.

C'est une maladie qui peut se manifester à tout âge avec une plus grande fréquence entre 35 et 55 ans, à cet âge elle est plus fréquente chez les femmes (sexe ratio de 4/1) (7).

2. Physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde :

La PR est une maladie inflammatoire auto-immune. Une interaction gène environnement a été identifiée comme aboutissant à la production d'auto-anticorps dirigés contre des antigènes citrullinés favorisant ainsi une réaction auto-immune. Ces auto-AC, dirigés contre des antigènes citrullinés ou ACPA (auto-anticorps anti-peptides cycliques citrullinés appelés aussi anti-CCP) entraînent une série de réactions inflammatoires avec une prédominance au niveau articulaire (synovite, arthrite) mais également avec des manifestations extra-articulaires (cutanés, pulmonaires, cardiaques, etc.) classant ainsi la PR parmi les maladies systémiques (7).

2.1. Phase préclinique de la PR :

Cette phase correspond à la période où la PR commence à se développer de manière silencieuse avant l'apparition des premiers symptômes cliniques observables (8).

Le début de la PR pourrait être une réaction inflammatoire survenant à distance de la cavité articulaire, générant des peptides citrullinés, via l'activation de peptidylarginine déiminases (PAD). Ces enzymes convertissent les résidus arginines en citrulline en présence de calcium (9) les rendant ainsi immunogène (9). **(Figure 1)**.

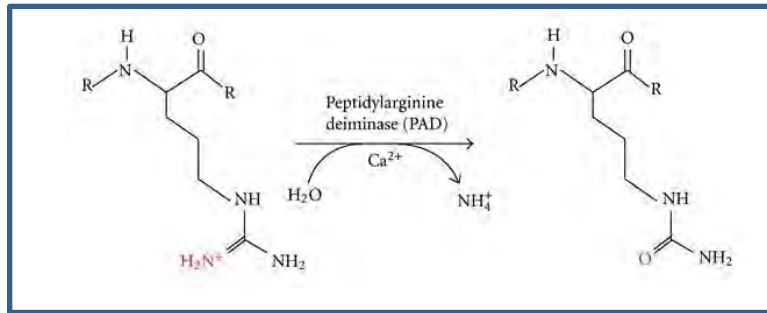


Figure 1: Citrullination des résidus arginine par la PAD
(PAD : peptidylarginine déiminase)

https://www.researchgate.net/figure/Peptidylarginine-deiminase-PAD-enzymes-catalyze-the-conversion-of-protein-arginine_fig1_231225656

Il a été montré que la citrullination et l'expression de PAD pouvaient avoir lieu dans le poumon. Une étude a démontré que la formation de iBALT (BALT pour Bronchus Associated Lymphoid Tissu) se faisait préférentiellement chez des patients présentant des troubles pulmonaires associés à une PR. Cette étude démontre également la production locale d'anticorps anti-fibrinogène citrullinés dans l'interstice pulmonaire (10), ce donc une expression locale de la PAD. Ces résultats indiquent que le désordre immun à l'origine de la PR pouvait être initié dans le poumon.

La cavité buccale peut être également le site d'initiation de la PR. En effet, des anticorps dirigés contre *Porphyromonas gingivalis* (bactéries causant des maladies parodontales) ont été retrouvés plus fréquemment dans le sang de patients atteints de PR que chez des personnes saines (11). Cela suggère un lien entre ces deux pathologies. De façon intéressante, *P. gingivalis* contient l'enzyme peptidyl-arginine déiminase (PAD), Il a été démontré que la PAD de *P. gingivalis* est capable de citrulliner des protéines du parodonte humain, ce qui pourrait induire des phénomènes immunologiques qui favorisent la survenue d'une PR ACPA+ chez des patients génétiquement prédisposés (10). *P. gingivalis* possède également une énoïase et une étude a démontré une réaction croisée avec l'énoïase bactérienne qui peut aboutir à la production d'anticorps anti- α -énoïase citrullinée, parfois observés chez les patients atteints de PR (10).

Au niveau cellulaire, les protéines citrullinées sont présentées par les cellules dendritiques et les macrophages aux lymphocytes T CD4+ naïfs qui s'activent et se différencient en LTh1 et LTh17 sécréteurs d'interféron gamma/IL2 et IL17 respectivement. Ces lymphocytes T activent à leur tour les lymphocytes B auto-réactifs qui se différencient en plasmocytes sécréteurs de facteur rhumatoïde et des auto-anticorps anti-peptides cycliques citrullinés (ACPA ou CCP) très en amont de la phase clinique de la PR (12) (cf figure 2)

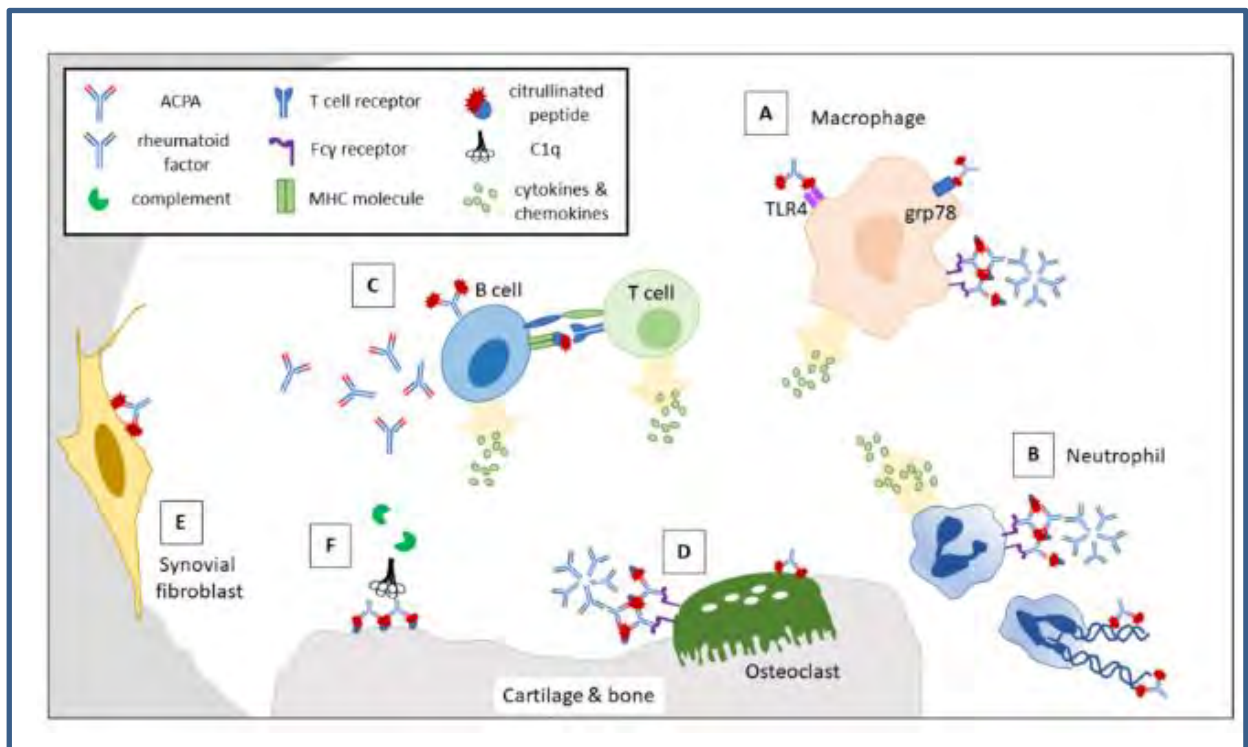


Figure 2: Physiopathologie de la Polyarthrite Rhumatoïde

Wu, C.-Y., Yang, H.-Y., & Lai, J.-H. (2020). Anti-Citrullinated Protein Antibodies in Patients with Rheumatoid Arthritis : Biological Effects and Mechanisms of Immunopathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 4015. <https://doi.org/10.3390/ijms21114015>

Certaines études ont démontré la présence des anti-CCP jusqu'à 14 ans avant les manifestations cliniques de la PR (13). Cela représenterait une éventuelle piste pour le diagnostic précoce de la PR voir même prévenir la progression de la maladie par l'initiation de la prise en charge thérapeutique. La présence d'anti-CCP permet de prédire avec une spécificité supérieure à 90 % le diagnostic de PR (5).

Un autre auto-anticorps peut être également détecté, il s'agit du facteur rhumatoïde. C'est une famille hétérogène d'auto-anticorps, classiquement IgM mais aussi IgG, IgA, IgE ou IgD, réagissant avec le fragment Fc des IgG humaines et animales (14). Il est présent dans 50 à 60 % des cas de PR débutante (5) comme il peut être retrouvé chez des sujets sains ou après un épisode infectieux (14). Il est nécessaire de noter que le facteur rhumatoïde n'est pas spécifique à la PR car il est également retrouvé dans d'autres pathologies rhumatologiques et infectieuses (9).

Le facteur Rhumatoïde et les anti-CCP sont les seuls marqueurs biologiques retenus par l'American Rheumatism Association pour la classification de la PR (15).

2.2. Phase clinique de la PR :

Le début de cette phase correspond au recrutement cellulaire (cellules immunitaires et articulaires) associée à une inflammation au niveau des articulations (8) tel qu'illustrée dans la **figure 3**.

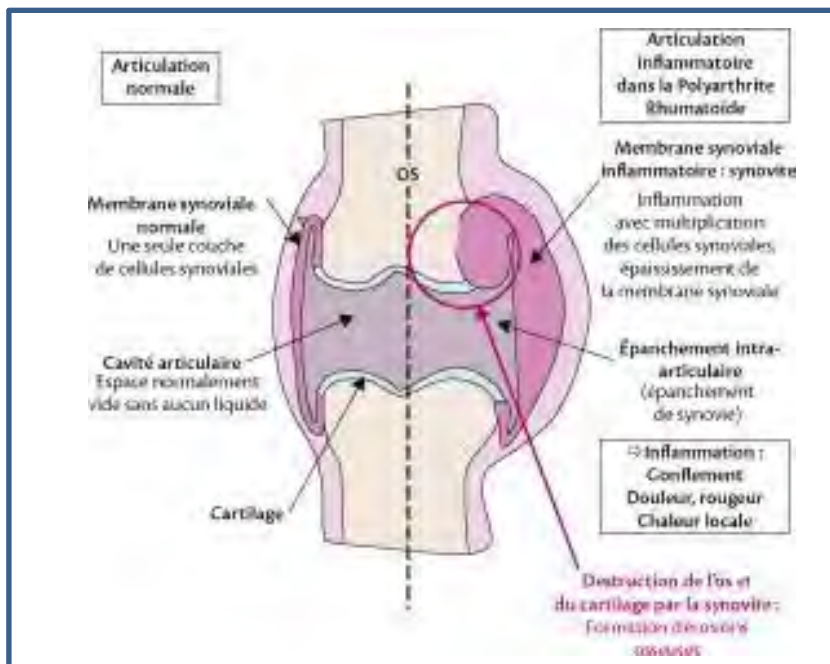


Figure 3: Comparaison des aspects physiopathologiques du cartilage sain et arthritique (1)

2.2.1. Atteinte synoviale :

Le siège inflammatoire de la PR est la membrane synoviale. La synovite est la conséquence d'acteurs cellulaires (synoviocytes, CPA, Lymphocytes T, Lymphocytes B), extracellulaire (cytokines) et intracellulaire (voies de signalisation) (16).

La présence de citrulline est prépondérante au niveau de différentes protéines de la membrane synoviale : fibrinogène, collagène de type II, l' α -énolase... Ainsi, les antigènes majeurs reconnus par les anti-CCP sont des isoformes citrullinées des chaînes α et β de la fibrine. Ces anti-CCP sont produits localement par les plasmocytes résidents de la membrane synoviale (10). Ces anti-CCP pourraient être à l'origine d'une réponse immunitaire non spécifique avec recrutement de monocytes/macrophages sécrétant de cytokines pro-inflammatoire (1).

Les synoviocytes de type fibroblaste-like acquièrent un phénotype particulier caractérisé par, une forte prolifération indépendante de l'ancrage et une perte de l'inhibition de contact (14). Ils sont activés par le $TNF\alpha$, l'IL1 et l'IL17 et synthétisent à leur tour le $TNF\alpha$, l'IL1 et l'IL6 créant ainsi une boucle d'amplification positive. Ces synoviocytes sécrètent aussi des facteurs angiogéniques tel que du $TGF-\beta$ et du VEGF, qui stimulent une néo-angiogenèse afin de faciliter le recrutement et le passage des lymphocytes T non spécifiques et des polynucléaires au niveau articulaire. Les cytokines sécrétées stimulent également l'expression de molécules d'adhésion au niveau de l'épithélium endothélial qui participent au recrutement de ces cellules immunitaires (12). Le tissu synovial inflammatoire et prolifératif forme ainsi le "pannus synovial"

correspondant à un épaissement de la membrane synoviale responsable de la destruction progressive du cartilage et des ligaments (1).

2.2.2. Atteinte cartilagineuse :

L'hyperplasie des cellules synoviales due à l'inflammation et à la prolifération du tissu synovial aboutissent à la surproduction d'enzymes de type matrice métalloprotéase (MMP), aggrecanase et cathepsine. Ces enzymes sont responsables de la dégradation de la matrice cartilagineuse. Les chondrocytes y participent en basculant vers un phénotype catabolique sous l'effet de l'IL1, cet état est entretenu par la synthèse d'ADAMTS (MMP à motif thrombospondine). Ces chondrocytes vont à leur tour synthétiser de l'IL1, IL17, IL18 et du TNF- α et promouvoir ainsi une boucle de rétrocontrôle positif (1).

La PR est caractérisée par une destruction du cartilage et cela s'explique par l'action pro-apoptogène sur les chondrocytes de l'IL17A, l'IL1 et les espèces réactives de l'oxygène et de nitrogène. La destruction des surfaces protéiques cartilagineuses va se traduire par une détérioration rapide des structures minérales sous-jacentes (1).

2.2.3. Atteinte osseuse :

Les ostéoblastes de l'os sous-chondral se différencient en ostéoclaste au contact du pannus synovial après liaison de leur récepteur RANK sur RANKL (surexprimés) à la surface des synoviocytes, des ostéoblastes et des lymphocytes T (infiltrant l'os et l'articulation atteinte). Le TNF- α induit cette synthèse de RANKL par les ostéoblastes. L'IL1, quant à lui, augmente la formation d'ostéoclastes par une action stimulant la synthèse de M-CSF par les cellules stromales osseuses. Tout cela aboutit à l'érosion osseuse observée dans la PR (1).

3. Facteurs de risque pour la PR :

La PR est une maladie multifactorielle et certains facteurs, génétiques ou environnementaux, ont été identifiés avec un risque important de développer la maladie. Le plus flagrant est évidemment le facteur hormonal, car une nette prédominance féminine est retrouvée avec une absence de crises liées à la PR durant la grossesse et réduction du risque de PR de 50% chez les femmes ayant allaité pendant plus de 24 mois (11). D'autres facteurs sont également cités tel que d'Epstein-Barr (EBV), les herpesvirus humains (HHV-6), les endovirus (HERV) ou le parvovirus B19 (11) la silice, les poussières ou la pollution automobile (10) sans être complètement confirmés.

La PR est par conséquent une pathologie dont l'étiologie exacte n'a pas encore été clairement identifiée (9), mais plusieurs facteurs de risques génétiques et environnementaux ont été identifiés. Parmi ces facteurs de risques, certains allèles du complexe d'histocompatibilité ou encore des facteurs environnementaux tels que le tabac ou certaines affections de la cavité buccale sont clairement impliqués.

3.1. Facteurs génétiques :

La PR n'est pas une maladie génétique mais il semble que des facteurs de prédisposition génétique soient impliqués dans le développement de la PR. En effet 15 à 30 % des PR sont retrouvées chez les jumeaux monozygotes contre 5 % parmi les jumeaux dizygotes (14). Ces études confirment bien la présence de facteurs génétiques prédisposant à la survenue de la PR. De plus, les membres de la famille d'une personne atteinte présentent 3 fois plus de risque de développer la PR. Ainsi, le risque de développer la maladie est estimé à environ 2% pour le fils d'une personne atteinte, 6% pour la fille et 12% pour la sœur vraie jumelle (11).

Au niveau génétique, des études ont démontré que des gènes codant pour le système HLA jouait un rôle dans le développement de la PR. Le système HLA (Human Leucocyte Antigen) est un ensemble de gènes présent sur le bras court du chromosome 6 et qui codent pour les protéines HLA, protéines qui composent les antigènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) et qui jouent un rôle dans la reconnaissance du soi et du non-soi (17). La présence du locus HLA-DRB1 prédispose fortement au risque de développer cette maladie. Précisément les molécules HLA-DRB1*01, HLA-DRB1*0401 ; *0404 ; *0405 ; *0408 porteurs de la séquence en acide aminés de la quatrième poche de présentation du peptide, dit épitope partagé : QKRAA, QRRAA ou RRAAA (4). En France, un de ces allèles à risque est présent chez 70% des patients atteints de PR mais il est également présent chez 40% de témoins (18). La présence de ces variantes génétiques pourrait induire la sélection de clones auto réactifs ou promouvoir un effet de mimétisme moléculaire avec une protéine d'origine microbienne (14). Les gènes *HLADR1* et *DR4* étant présents respectivement dans 30 et 60 % des cas de PR (1). Le risque maximal d'avoir une PR sévère est observé chez les homozygotes DR4 et pour les hétérozygotes DR4 et DR4-DR1 (19). Toutefois, la présence de l'allèle HLA-DRB1 n'explique pas toutes les PR, car 2/3 des patients atteints de PR positives pour les anti-CCP ou le FR n'ont pas cet allèle (14).

3.2. Facteurs environnementaux :

Un certain nombre d'études ont identifiés l'existence d'un lien entre des facteurs environnementaux et le développement de la PR, parmi eux, le tabac, certaines infections, et le microbiote ont été impliqués.

3.2.1. Tabac :

Depuis une vingtaine d'années, des études démontrent que la cigarette est associée à une susceptibilité accrue de développer une PR. Le risque est d'autant plus prononcé que la personne fume beaucoup et depuis longtemps avec un risque significatif pour une dose cumulée de 10 paquets-année (10). Cependant, le risque de développer une PR en réaction au tabac existe surtout chez des personnes génétiquement prédisposées (11). L'association entre la présence d'un épitope partagé et le tabagisme augmenterait le risque de développer des anticorps anti-CCP d'un facteur 6,5 ou 21 (pour respectivement la présence d'une ou deux

copies) (14). La consommation de tabac ne favorise pas toutes les formes de PR, mais seulement les PR classiques dites « séropositives », aux anticorps anti-CCP ou aux facteurs rhumatoïdes (11).

Une interaction entre l'épitope partagé et le tabagisme a été démontrée pour les PR avec ACPA+(10). L'hypothèse physiopathologique proposée est donc la suivante :

- Dans des cellules bronchio-alvéolaires, le tabac peut activer l'expression des PADs qui vont induire la citrullination d'auto-antigènes au niveau de l'épithélium respiratoire (10) ;
- La réponse auto-immune à ces protéines citrullinées induit la production d'ACPA préférentiellement chez les sujets porteurs de l'épitope partagé ou ayant déficit héréditaire des enzymes impliquées dans la détoxification des agents cancérogènes et la protection contre le stress oxydatif (11)
- Quelques années plus tard, ce conflit dysimmunitaire entraîne le développement d'une PR (10).

3.2.2. Infections :

3.2.2.1. Les parodontopathies :

« Les parodontopathies résultent de la destruction du tissu de soutien de la dent (gencive et os alvéolaire de la mandibule) par une infection due dans la majorité des cas à une bactérie « *Porphyromonas gingivalis* ». Leur prévalence a été récemment estimée en France à 50 % de la population adulte » (10). L'implication potentielle de la cavité buccale dans la physiopathologie de la PR a émergé ces dernières années du fait de la présence d'un lien épidémiologique entre les parodontopathies et la PR. Effectivement, Il a été démontré que les parodontites chez les patients atteints de PR sont deux fois plus fréquentes et deux fois plus sévères que dans la population générale. Ces parodontopathies induisent également deux fois plus d'édentation (10). Plusieurs études ont établi une association entre parodontite et PR, et entre la sévérité de la parodontite et celle de la PR. La perte de dents sur parodontite a pour effet de doubler le risque de PR à dix ans (11). Enfin, quelques travaux suggèrent que le traitement de la parodontopathie, chez des patients présentant à la fois une PR et une parodontite active, réduirait l'activité de la PR. (10)

3.2.2.2. Le microbiote :

Un lien entre la flore intestinale et certaines maladies inflammatoires a été démontré grâce à l'utilisation de souris à flore digestive contrôlée dans lesquelles la sensibilité à l'arthrite expérimentale a été étudiée. Pour cela, des souris axéniques ou « germ free » chez qui l'on réintroduit de façon sélective certains germes dans l'alimentation ont été utilisées. La colonisation intestinale par *Bacteroides fragilis* promeut l'expression du facteur de transcription FoxP3 et les fonctions suppressives des T régulateurs, entraînant une susceptibilité accrue

aux enteropathogènes, mais également une résistance à l'arthrite expérimentale. A l'inverse, la colonisation digestive par des bactéries filamenteuses aboutit à une surexpression de lymphocyte Th17, rendant les animaux naturellement résistants aux enteropathogènes, mais beaucoup plus sensibles aux arthrites expérimentales. Ainsi, un déséquilibre de la flore intestinale pourrait avoir un impact sur le risque de survenue et sur l'activité de la PR par un mécanisme physiopathologique qu'il reste à élucider (10)

3.2.2.3. Les infections pulmonaires :

Il a été observé que les bronchiectasies (élargissement anormale d'une ou de plusieurs voies respiratoires dû à des pathologies pulmonaires qui entraîne une hypersécrétion de mucus qui s'accumule dans ces voies dilatées, augmentant ainsi le risque de développer des infections pulmonaires- (20)) étaient fréquentes chez des patients atteints de PR en comparaison avec la population générale (19). Elles précèdent le plus souvent le développement de la maladie. Au moins 30 % des patients atteints de PR présentent des bronchiectasies ou des pneumopathies interstitielles, et majoritairement chez les patients atteints de PR avec anti-CCP ou FR positif (10).

4. Symptomatologie de la polyarthrite rhumatoïde :

4.1. Manifestations articulaires :

4.1.1. PR débutante :

Dans sa forme typique, c'est une polyarthrite symétrique, distale, dite acromélique, touchant les mains et les pieds. Les douleurs siègent aux poignets, aux articulations métacarpo-phalangiennes (MCP) et aux interphalangiennes proximales (IPP) épargnant les interphalangiennes distales (IPD). A l'avant-pieds, elles prédominent surtout au niveau des métatarso-phalangiennes (MTP) (9). Les douleurs sont de nature inflammatoire, avec recrudescence dans la deuxième moitié de la nuit pour atteindre son maximum le matin avec une raideur matinale plus ou moins prolongée. Le gonflement est généralement « mou » à cause de la synovite (épanchement du pannus synovial plus précisément) contrairement aux gonflements « durs » (osseux) de l'arthrose (21).

L'arthrite des IPP cause un gonflement des doigts en fuseau, qui se manifeste habituellement chez les patients avec la difficulté de mettre ou d'enlever une bague ou une alliance (12). Aux mains, l'atteinte est souvent aux 2° et 3° MCP, 4° et 5° MTP pour les pieds. Aux arthrites sont souvent associées des ténosynovites des tendons extenseurs (cubital post fléchisseurs des doigts, des tendons des péroniers, du jambier antérieur ou postérieur) ou fléchisseurs des doigts. Ces ténosynovites inaugurales sont responsables de syndromes canaux (syndrome du canal carpien ou du tunnel tarsien) (9) (7).

Des formes plus atypiques peuvent se manifester, tel que les polyarthralgies pures, tenaces, acroméliques avec enraidissement matinal mais sans gonflement articulaire, mais aussi des formes oligoarthritiques ou monoarthritiques (en particulier du genou). Des formes à début rhizomélique peuvent aussi être observées. Ces dernières sont plus fréquentes chez le sujet âgé, elles s'accompagnent de douleurs de type inflammatoire aux épaules, posant le problème du diagnostic différentiel avec une PPR (pseudo polyarthrite rhizomélique) éliminant ainsi en premier lieu une arthrite infectieuse (7).

4.1.2. PR avérée :

C'est le stade de la maladie où s'ajoutent, aux signes inflammatoires (arthrites et ténosynovites) observés lors de la PR débutante, des déformations articulaires qui peuvent toucher toutes les articulations mis à part le rachis dorsal, lombaire et sacro-iliaque (7).

Tableau 1: Manifestations articulaires de la PR

<p>Atteinte des doigts (22) (Figure 4)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Coup de vent cubital - Tuméfaction des 2° et 3° MCP - Déformation en <ul style="list-style-type: none"> o Col de cygne (hyper-extension de l'IPP et flexion de l'IPD) o Boutonnière (flexion de l'IPP et hyper-extension de l'IPD) o Maillet (chute en flexion de la dernière phalange) - Pouce en Z. Il est important d'évaluer la qualité de la pince pollicidigitale (opposition du pouce aux autres doigts). - Atrophie des muscles interosseux.
<p>Atteinte du poignet</p>	<p>Lésions articulaires de l'articulation radiocubitale inférieure : Luxation de la styloïde cubitale à l'origine du signe de la touche de piano (23). Les ténosynovites sont fréquentes (9) : L'atteinte des tendons fléchisseurs réalise une tuméfaction de la paume, qui peut évoluer vers un syndrome du canal carpien (9).</p>
<p>Atteinte des avant-pieds (Figure 5)</p>	<p>Elle est tout aussi fréquente que celle de la main (90% des cas). Elle est souvent plus précoce (24) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Déformation du gros orteil en hallux valgus (figure 7), - 5° orteil en Quintus Varus (25) (figure 8) entraînant une gêne à la marche et au chaussage (7). - Orteils un coup de vent fibulaire ou des en griffe (26).
<p>Atteinte de l'arrière-pied</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Atteinte de la voute plantaire responsable d'un pied plat valgus "inflammatoire » (13). - L'arthrite peut toucher l'ensemble des articulations du tarse. - Ténosynovites fréquentes
<p>Atteinte du genou (21-29)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Atteinte souvent précoce, de type hydarthrodiale (avec épanchement) - L'hydarthrose peut se compliquer d'un kyste poplité (27) - Possible déformation en flexum (figure 6) avec conséquences fonctionnelles invalidantes (27).
<p>Atteinte de la hanche</p>	<p>Elle est habituellement tardive et peu fréquente au cours de l'évolution de la maladie (27). Néanmoins, quand elle se manifeste (par une coxite reminéralisante) elle est handicapante du point de vue fonctionnel conduisant souvent à une arthroplastie (opération visant à remplacer la tête fémorale par une prothèse) (7).</p>

Atteinte de l'épaule	<ul style="list-style-type: none"> - Fréquente et parfois inaugurale. - Limitation précoce et douloureuse des amplitudes articulaires (7) - Synovite rhumatoïde scapulohumérale - Déminéralisation épiphysaire et ulcération du sulcus (jonction tête-col) (5) (27).
Autres atteintes articulaires	<ul style="list-style-type: none"> - Coude - Rachis cervical - Arthrite temporo-mandibulaire : limitatrice de la mobilité articulaire. - Atteinte de l'articulation temporo-maxillaire. - Atteinte de l'articulation sterno-claviculaire. - Polyarthrite Cricoarytenoid. - Sous-luxation Atlanto-axiale.



Figure 4: Déformations articulaires, au niveau des doigts et des pieds, causées par la PR.

2012 03 20 - UE LOCOMOTEUR - SEMIOLOGIE - Pr. Albert - Arthrites.pdf

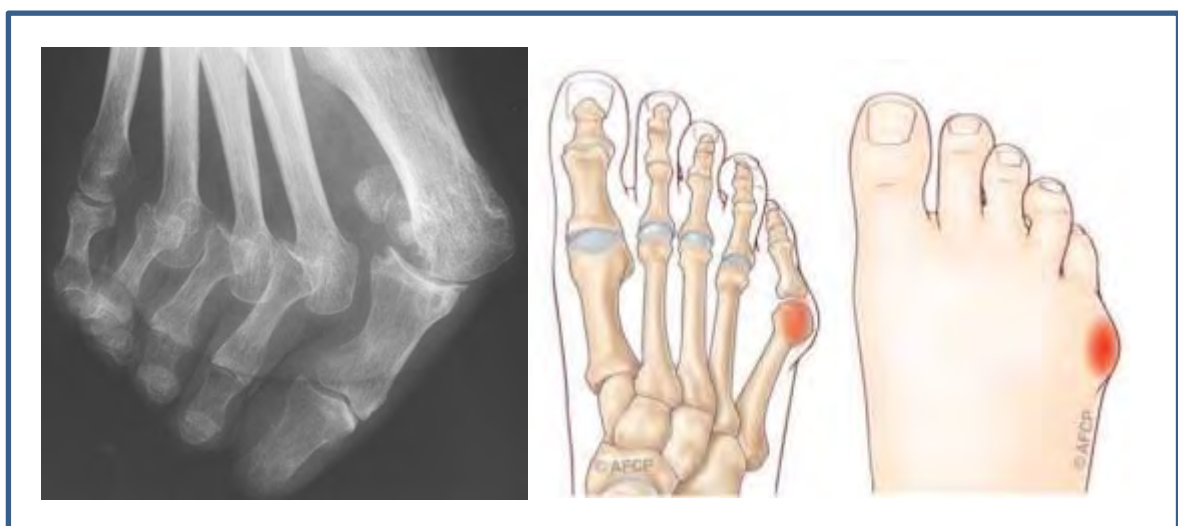


Figure 5: Polyarthrite Rhumatoïde : atteinte de l'avant pied (hallux valgus)

Chirurgie sur Dunkerque, bunionette. (s. d.). Flandre Orthopedie, chirurgie de hanche, genou, pied, épaule, coude, main sur Dunkerque. <https://www.flandre-orthopedie.com/bunionette-quintus-varus-dunkerque.html>

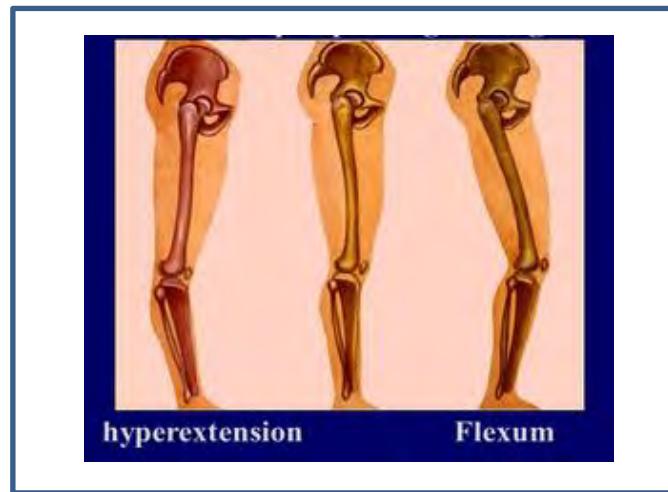


Figure 6: Polyarthrite rhumatoïde: Flexum du genou

Genu recurvatum, - ppt télécharger. (s. d.). SlidePlayer - Chargez et faites partager vos présentations PowerPoint. <https://slideplayer.fr/slide/1156873/>

4.1.3. PR séquellaire :

C'est le devenir de la maladie après plusieurs années de poussées évolutives. A ce stade de la maladie, le syndrome biologique inflammatoire est quasi inexistant voir absent, la synoviale devient fibreuse et l'histologie n'évoque plus la maladie rhumatoïde. D'un point de vue clinique, ne persistent plus que les douleurs mécaniques due à la destruction articulaire (28). A ce stade la PR n'est plus un problème diagnostique mais un vrai challenge thérapeutique.

4.2. Manifestations extra-articulaires :

Les manifestations extra-articulaires de la Polyarthrite rhumatoïde (**tableau 2**) traduisent le caractère systémique de la maladie. Elles peuvent parfois survenir avant les manifestations articulaires et menacer le pronostic vital des patients.

Tableau 2: Manifestation extra-articulaires de la PR (7)

Nodules rhumatoïdes	Situés aux zones de pression (coudes, doigts, tendon d'Achille) (figure7)
Syndrome de Gougerot-Sjögren	Retrouvé dans 20% des PR PR : 1ere cause de syndrome de Gougerot-Sjögren secondaire
Vascularites	Vascularite rhumatoïde Multinévrite
Ophtalmologiques	Syndrome sec, sclérite, épisclérite
Musculaires	Amyotrophie, Myosite
Rénales	Amylose, Glomérulopathie iatrogène (AINS)
Hématologiques	Anémie inflammatoire, Adénopathies, Syndrome de Felty, risque augmenté de lymphome
Pulmonaires	Infections pleuropulmonaires, Pleurésie rhumatoïde, pneumopathie interstitielle diffuse, dilatation des bronches, nodules rhumatoïdes, bronchiolite, syndrome de Caplan-Colinet, pneumopathie au Méthotrexate
Autres	-Syndrome de Raynaud (5 à 10% des cas) (figure 8) -Amylose secondaire : complication tardive des PR très inflammatoires. -Oculaires : sclérite et scléromalacie perforante (exceptionnelles).



Figure 7: Polyarthrite rhumatoïde : nodules rhumatoïde

Yaseen, K. (2022, 1 novembre). Polyarthrite rhumatoïde (PR) - Troubles musculosquelettiques et du tissu conjonctif - Édition professionnelle du Manuel MSD. Édition professionnelle du Manuel MSD. <https://www.msmanuals.com/fr/professional/troubles-musculosquelettiques-et-du-tissu-conjonctif/troubles-articulaires/polyarthrite-rhumatoïde-pr/> Item 121 : Polyarthrite rhumatoïde (cerimes.fr)



Figure 8: Polyarthrite rhumatoïde : syndrome de Raynaud

5. Diagnostic de la PR :

Il est important de souligner qu'il n'y a pas de test de dépistage permettant à lui seul de confirmer la présence d'une PR, le diagnostic est basé essentiellement sur l'examen clinique. Les analyses biologiques ne permettent que de confirmer et soutenir le diagnostic clinique.

5.1. Diagnostic clinique :

Le diagnostic de la PR débutante est primordial car c'est à ce stade que la prise en charge thérapeutique a ses meilleures chances d'être efficace (5). C'est ce qui définit la « fenêtre d'opportunité thérapeutique » (25). Cependant, à ce stade, le diagnostic se heurte à certaines difficultés telles que l'absence de signes radiologiques marqués et des signes cliniques et biologiques pouvant évoquer d'autres pathologies ce qui fait du diagnostic différentiel un point crucial dans le diagnostic de la PR débutante d'où l'importance de bien identifier le caractère

inflammatoire des douleurs articulaires et à le différencier des douleurs articulaires d'origine mécanique (arthrose) ou d'origine neuropathique (fibromyalgie) (**tableau 3**).

Tableau 3: distinctions des douleurs inflammatoires, mécaniques et fibromyalgiques (29)

Distinction des douleurs inflammatoires, mécaniques et fibromyalgiques			
	Inflammatoire	Mécanique	Fibromyalgique
La douleur est dominante	La nuit et le matin	En après-midi ou en soirée	Persiste toute la journée, autant de jour que de nuit
Raideur matinale	Plus d'une heure	Brève ("Gelling")	Variable
Érythème	Occasionnel	Absent	Absent
Effets de la mobilisation sur la douleur	Généralement, l'activité atténue la douleur ou diminue la sensation de raideur	Généralement, l'activité accentue la douleur	La douleur est relativement constante, globalement peu modifiée par l'exercice ou le repos
Effet du repos	La raideur s'accroît	La raideur s'atténue	Douleur inchangée
Détresse psychologique	Variable, surtout associée au niveau de la douleur et la sévérité de l'état inflammatoire	Rare, surtout associée au niveau d'invalidité	Fréquente, peut sembler disproportionnée par rapport à l'absence de trouvailles cliniques
Fatigue, asthénie	Fréquente, surtout si activité inflammatoire importante	Rare	Fréquente

Pour contourner ce problème de subjectivité dans le diagnostic précoce de la PR, la haute autorité de santé (HAS) recommande d'effectuer la démarche diagnostic en 3 étapes (5) :

- **1ère étape : reconnaître un rhumatisme inflammatoire débutant pouvant correspondre à une PR.** Les douleurs inflammatoires telles qu'observées dans la PR se caractérisent par une raideur matinale (> 30 minutes) atténuées avec l'exercice, érythème possible mais généralement absents, un gonflement articulaire dû aux synovites (29) et qui concerne préférentiellement les poignets, les articulations métacarpophalangiennes, les interphalangiennes et les métatarsophalangiennes (9). L'atteinte est souvent bilatérale et symétrique évoluant de manière chronique (> 6 semaines) Ces articulations sont le plus souvent douloureuses à la compression latérale « squeeze test » (9).
- **2ème étape : éliminer les autres rhumatismes inflammatoires (diagnostic différentiel) :** Le diagnostic différentiel de la PR est guidé par certains éléments cliniques afin de diagnostiquer de manière spécifique et le plus précocement possible la PR. Après avoir identifié le caractère inflammatoire et la chronicité (>6 semaines) (**tableau 3 et 4**) des douleurs articulaires, qui réduit considérablement les probabilités diagnostics, le médecin pourra identifier ainsi une PR. A titre d'exemple dans la PR les articulations touchées ne présentent pas de rougeur cutanée marquée telle qu'observée au cours du rhumatisme psoriasique, des arthrites septiques ou encore des arthrites microcristallines. Aussi les

inter-phalangiennes proximales sont généralement épargnées lors de la PR contrairement à l'arthrose, l'arthrite psoriasique et la goutte (9)

- **3ème étape : rechercher des facteurs pronostic de la PR :** Tels que définis dans le paragraphe VI qui permettront l'identification des formes les plus à risque d'évolution vers une PR sévère et une adaptation précoce de la prise en charge thérapeutique.

Tableau 3: diagnostic différentiel de la PR en fonctions des symptômes systémiques associés (29)

Diagnostic	Clinique
Arthrose	Asymétrique, IPP et IPD, MCP non atteints, douleur mécanique
Fibromyalgie	Myalgie ou douleurs neuropathiques diffuses (type brûlure), fatigue, trouble du sommeil
Spondylarthropathie séronégatives : - Spondylite ankylosante - Arthrite réactive (Syndrome de Reiter) - Arthrite psoriasique - Arthrite entéropathique	Atteinte axiale ou des sacro-iliaques, oligoarthritis asymétrique des grosses articulations, Psoriasis, Dactylites, enthésites, uvéite, symptômes digestifs (diarrhées, crampes, rectorragies)
Arthrite microcristalline - Goutte - Pseudogoutte	Tableau aigu, mono/oligoarthrite, peut mimer une PAR
Polymyalgia rheumatica	Début subit, Myalgies des ceintures scapulaires et pelviennes, réponse dramatique à la prednisone
Lupus érythémateux disséminé	Rash malaire, alopecie, photosensibilité, Raynaud, atteinte du SNC, pleuroépécicardite atteinte rénale, thrombophlébite/avortements spontanés
Sarcoïdose	Érythème noueux, atteinte prépondérante des chevilles avec périarthrite, atteinte pulmonaire
Arthrite paranéoplasique	Perte de poids, fièvre, atteinte de l'état général, néoplasie connue, souvent réfractaire aux traitements habituels

Tableau 4: diagnostic différentiel d'une polyarthralgie/Polyarthrite en fonction de la durée des symptômes (29)

Symptômes aigus (<6 semaines)	Symptômes chroniques (>6 semaines)
Arthrite virale (ex : parvovirus B19) Arthrite septique (ex : gonococcique) Goutte, pseudogoutte Rhumatisme articulaire aigu Maladie sérique Sarcoïdose	Polyarthrite rhumatoïde Arthrite psoriasique Collagénose Vascularite systémique Arthrose Fibromyalgie

5.2. Diagnostic biologique :

Comme dit précédemment, il n'existe pas de test diagnostic biologique capable de confirmer de manière suffisamment sensible et spécifique la présence d'une PR. Effectivement le diagnostic de la PR se base plutôt sur un ensemble de caractéristiques cliniques et biologiques qui une fois réunis permettent de poser le diagnostic (**classification EULAR**). Cependant, de manière générale les signes biologiques pouvant être recherchés lors de la PR sont un syndrome biologique inflammatoire, le facteur rhumatoïde et des anticorps anti-peptides citrullinés.

5.2.1. Syndrome biologique inflammatoire :

Comme dans la plupart des pathologies inflammatoires, il existe au cours de la PR un syndrome inflammatoire non-spécifique avec une vitesse de sédimentation et/ou une C protéine réactive élevées, l'hémogramme peut montrer une hyperleucocytose avec polynucléose, thrombocytose et parfois une hyperéosinophilie. Une anémie inflammatoire légère à modérée peut aussi s'intégrer dans le cadre de l'inflammation chronique. Elle est assez bien corrélée avec l'évolutivité de la PR (5) (30). Leur sensibilité et spécificité est cependant limitée cf **tableau 6**.

5.2.2. Le facteur rhumatoïde :

Le facteur rhumatoïde (FR) est un anticorps anti-gamma globulines, qui appartient le plus souvent aux IgM. Il peut être aussi de type IgA, IgG, IgD ou IgE. Leur point commun est d'être dirigés contre des IgG (5) (30). La détection du facteur rhumatoïde se fait par néphélobimétrie ou test ELISA (5). La sensibilité du facteur rhumatoïde est de l'ordre de 60 à 80% (9). Le FR peut précéder l'apparition des signes cliniques de plusieurs mois voire de plusieurs années. Cependant, il peut se positiver lors des premières années d'évolution de la PR que chez <10% des patients qui étaient FR- (31).

Le FR n'est pas spécifique à la PR. Sa spécificité est de 65 à 85%. Elle est plus élevée chez les patients présentant un tableau clinique typique (PR acromélique, bilatérale, symétrique) que chez ceux présentant des symptômes plus rares. Le FR n'étant pas propre à la PR, est présent au cours de la maladie de Gougerot-sjogren (50-80%), le lupus systémique (20-30%), la sclérodermie systémique (10-20%), la cryoglobulinémie mixte (>90%) mais aussi lors de maladies infectieuses telles que la tuberculose, la lèpre, la syphilis, l'endocardite infectieuse, infections à EBV, VHC, la leishmaniose, la leucémie lymphoïde chronique, la sarcoïdose ou encore certaines hépatites (31). Le FR peut aussi être détecté chez des individus à priori sains (5). Bien qu'un taux élevé de FR en début de maladie soit un facteur de mauvais pronostic, il n'est pas suffisant pour poser le diagnostic. La survenue de PR très érosives chez des Patients FR négatifs démontre que le FR n'a pas de lien direct avec la synovite rhumatoïde (14).

5.2.3. Les anticorps anti-CCP :

Les anticorps anti-peptides citrullinés sont des auto-anticorps de type IgG dirigés contre des protéines citrullinées qui, pour la plupart d'entre elles sont présentes dans la matrice extracellulaire, le fibrinogène, la fibronectine, la filaggrine, le collagène, l'énolase, la kératine ou encore la vimentine (16). Ils sont détectés par un test ELISA (5). La sensibilité des anti-CCP est de 60-75% au cours de la PR. Ils sont habituellement présents dès le début de la maladie. Leur présence peut précéder l'apparition des premiers symptômes de quelques mois à quelques années, tous comme le FR. ils peuvent se positiver lors des premières années d'évolution de la PR que chez <10% des patients qui étaient ACPA- au départ. La spécificité des anti-CCP est de l'ordre de 90-95% lors de la PR. Ils peuvent être détectés au cours d'autres pathologies (rhumatisme psoriasique, lupus systémique, sclérodémie systémiques, syndrome de Gougerot Sjogren ou encore la tuberculose) mais à des taux très faible (<10%) (31)

5.2.4. Les anticorps anti-nucléaires :

Ils peuvent être recherchés dans le cadre du diagnostic différentiel de la PR. Cet examen est particulièrement indiqué en présence de symptômes extra-articulaires (ex. : Raynaud, photosensibilité, alopecie ou sérosité). Ils sont plutôt caractéristiques de la maladie lupique (donc présence d'une arthrite associée à une collagénose). Ils sont présents que très rarement au cours de la PR, notamment en cas de syndrome de chevauchement ou en réponse à certains traitements de fond (16).

Tableau 5: sensibilité/spécificité du diagnostic biologique (7)

	Sensibilité	Spécificité	Intérêt
Facteur rhumatoïde	70-80 %	75-85 %	Intérêt diagnostique Intérêt pronostique (érosions osseuses)
Anticorps anti-protéines citrullinées	60-70 %	95 %	Intérêt diagnostique Intérêt pronostique (atteinte extra articulaires)
Anticorps antinucléaires	15-30 %		Diagnostic différentiel (syndrome de Gougerot-Sjögren, lupus érymateux systémique)

5.3. Histologie synoviale :

Une ponction articulaire avec analyse du liquide synovial peut s'avérer utile au diagnostic. Le décompte leucocytaire peut démontrer un phénomène inflammatoire. La recherche de cristaux sera utile pour exclure une arthropathie microcristalline. Une culture du liquide est aussi recommandée afin d'éliminer une condition infectieuse, surtout en présence d'une monoarthrite (29).

5.4. Imagerie :

5.4.1. Radiographie standard :

Les signes caractéristiques de la polyarthrite rhumatoïde apparaissent souvent après 6 mois à 1 an d'évolution. La radiographie normale ne permet donc pas d'écarter le diagnostic, surtout au stade précoce. Il faut donc systématiquement et régulièrement pratiquer des radiographies, tous les 6 mois pendant la première année et une fois par an durant les 3 premières années (31). Le médecin doit systématiquement demander la radiographie standard des mains et poignets, des radiographies des pieds, complétées si nécessaire de la radiographie des articulations douloureuses (31). La radiographie est le plus souvent normale au début (31), ce qui en fait un examen de référence pour suivre l'évolution de la maladie.

Les signes élémentaires caractéristiques (**figure 9**) sont : l'apparition d'érosions périarticulaires, d'un pincement articulaire traduisant la destruction cartilagineuse, une déformation articulaire et une augmentation de la transparence radiologique épiphysaire (ostéoporose) (28)

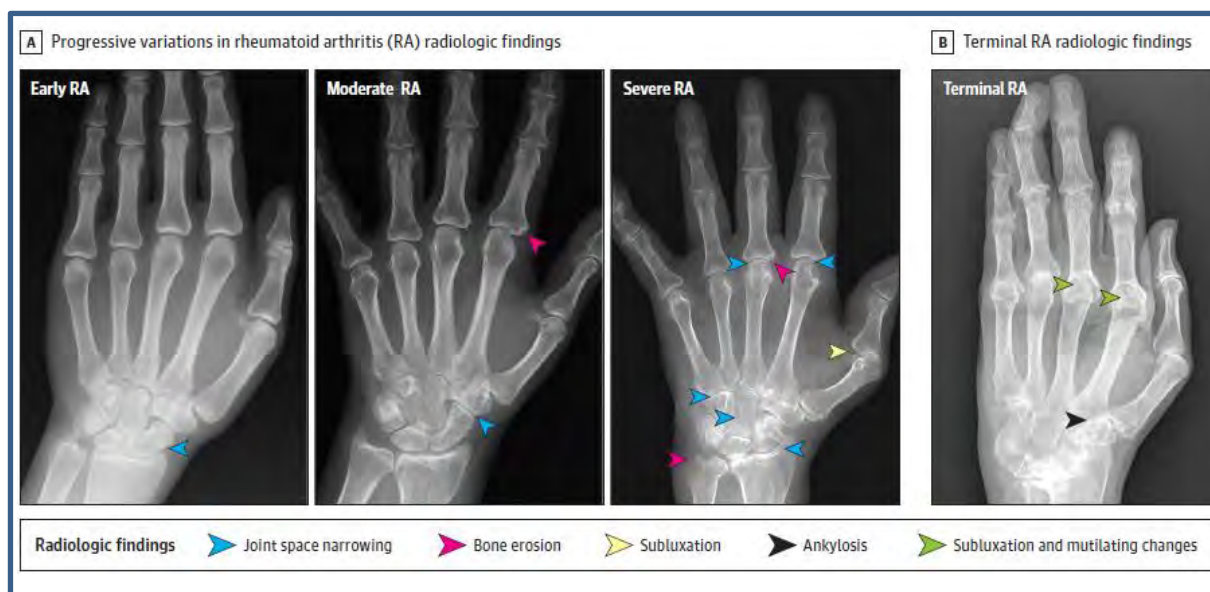


Figure 9: évolution des lésions articulaires dans la PR de la main vue à la radiographie standard

Aletaha, D., & Smolen, J. S. (2018). Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis. *JAMA*, 320(13), 1360. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.13103>

5.4.2. Echographie articulaire :

C'est un examen complémentaire non invasif, non irradiant et peu coûteux. Elle permet avec l'IRM (imagerie par résonance magnétique) de visualiser l'épaississement synovial et le pannus synovial, ce qui en fait des techniques plus sensibles que le diagnostic clinique pour détecter la synovite articulaire et même plus sensible que la radiologie standard pour déceler les premiers signes d'érosions osseuses. (9, 16)

5.5. Mise en place du diagnostic final :

Pour résumer, le diagnostic de la PR se base sur la coexistence de différents signes cliniques, biologiques et radiologiques. Le rhumatologue peut se faire guider par les critères EULAR/ACR 2010 (American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism) qui est une démarche collaborative entre les rhumatologues européens et américains afin de diagnostiquer la PR débutante (**Tableau 7**).

Tableau 6: Critères EULAR/ACR 2010 pour le diagnostic de la PR (3)

Type d'atteinte articulaire (0-5)	
1 articulation grosse ou moyenne	0
2-10 articulations grosses ou moyennes	1
1-3 petites articulations	2
4-10 petites articulations	3
>10 articulations (au moins une petite)	5
Sérologie (0-3)	
Ni RF, ni anti-CCP positif	0
Au moins un test faiblement positif (<3 fois la normale)	2
Au moins un test fortement positif (>3 fois la normale)	3
Durée de la synovite (0-1)	
<6 semaines	0
>6 semaines	1
Réactions de la phase aiguë (0-1)	
Ni VS, ni CPR élevée	0
Vs ou CRP élevée	1

Valeur seuil de 6/10 pour le diagnostic de PR

6. Pronostic de la PR :

Le pronostic de la PR s'est nettement amélioré ces dernières années et ce grâce, entre autres, au diagnostic précoce et à l'identification des formes les plus à risque d'évolution vers une PR sévère et une adaptation de la prise en charge thérapeutique (30). Principalement, les facteurs de mauvais pronostic se résument à la présence des manifestations extra-articulaires, l'érosion cartilagineuse et osseuse précoce, la présence d'anti-CCP et de FR à titre élevé, le degré d'handicap fonctionnel et le recours à la chirurgie. Se rajoute à cela la présence de l'allèle HLA-DR4, les marqueurs biologiques de l'inflammation initiale ainsi que le statut socio-économique défavorable (29) (**tableau 8**).

Tableau 7: facteurs de mauvais pronostic de la PR (26)

Facteurs de mauvais pronostic dans la Polyarthrite rhumatoïde
Atteinte polyarticulaire
Handicap fonctionnel initial
Atteintes extra-articulaires
Présence du FR (surtout à titre élevé) at/ou anti-CCP
VS et CRP élevées
Apparition précoce d'érosions (moins de 2 ans)
Facteur socio-démographiques (faible niveau d'éducation, faibles revenus)
Présence du marqueur génétique HLA-DR4

Quand on s'intéresse à la mortalité liée à la PR, on retrouve dans la littérature que les patients atteints de PR présentent un sur-risque de décès lié à la gravité de la maladie. Selon une étude, le ratio standardisé de mortalité (SMR) est de 1,3. Cet excès de mortalité surviendrait à partir de la 10^e année d'évolution de la PR, avec un SMR plus élevé chez les patients ACPA positifs (6). La mortalité de la PR a diminué au cours des 50 dernières années chez les patients atteints de PR y compris celle due aux accidents cardiovasculaires, mais cette mortalité est restée plus élevée que dans la population générale (6).

Une étude a montré une diminution du Disease Activity Score 28 (DAS 28) (**tableau 9**) au diagnostic au fil du temps suggérant des tableaux cliniques initiaux moins graves : la raison invoquée est celle d'un diagnostic plus précoce (6).

Concernant les manifestations extra-articulaires liées à la PR, différentes études démontrent une tendance à la diminution au fil des années (6)

Tableau 8:score DAS 28 de la PR

Disease Activity Score 28 (DAS 28)	
Nombre d'articulations douloureuses (28TJC)	0 à 28
Nombre d'articulations tuméfiées (28SJC)	0 à 28
Paramètres inflammatoires	VS en mm/h ou CRP en mg/dl
Évaluation globale par le patient de l'activité de sa maladie (PtGA)	0 à 10
Articulations à évaluer : épaules, coudes, poignets, MCP, IPP, genoux. Activité de la polyarthrite rhumatoïde selon le score DAS 28 : <ul style="list-style-type: none"> – Selon VS: $0,56\sqrt{(28TJC)} + 0,28\sqrt{(28SJC)} + 0,70 \ln(VS) + 0,014 \text{ PtGA}$ – Selon CRP: $0,56\sqrt{(28TJC)} + 0,28\sqrt{(28SJC)} + 0,36 \ln(CRP+1) + 0,014 \text{ PtGA} + 0,96$ Calculeur en ligne : www.das-score.nl/	
<2,6 : rémission	≥3,2 - ≤ 5,1 : activité modérée
≥2,6 - <3,2 : faible activité	>5,1 : activité haute/sévère

N. (2014). Traitement de fond de la polyarthrite rhumatoïde. Revue Médicale Suisse. <https://www.revmed.ch/RMS/2014/RMS-N-421/Traitement-de-fond-de-la-polyarthrite-rhumatoïde>

7. Prise en charge thérapeutique de la polyarthrite rhumatoïde :

Le traitement de la polyarthrite rhumatoïde a trois objectifs principaux : soulager les douleurs, stopper l'évolution de la maladie, prévenir le handicap (22). Le but étant d'atteindre une activité faible de la maladie, voir la rémission telle que définie selon les critères des **tableaux 10 et 11**.

Tableau 9 : Définition de la rémission selon l'ACR/EULAR

Définition selon l'analyse booléenne
<p>A chaque évaluation, le patient doit satisfaire tous les points suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nombre d'articulations douloureuses ≤ 1 • Nombre d'articulations tuméfiées ≤ 1 • CRP ≤ 1 mg/dl <p>Évaluation globale du patient sur une échelle de 1 à 10 ≤ 1</p>
Ou définition selon les index
<p>A chaque évaluation, le patient doit avoir un score SDAI (Simplified Disease Activity Index score) $\leq 3,3$</p>

N. (2014). Traitement de fond de la polyarthrite rhumatoïde. Revue Médicale Suisse. <https://www.revmed.ch/RMS/2014/RMS-N-421/Traitement-de-fond-de-la-polyarthrite-rhumatoïde>

Tableau 10 : Clinical Disease Activity Index de la PR

Clinical Disease Activity index (CDAI)	
Nombre d'articulations douloureuses	0 à 28
Nombre d'articulations tuméfiées	0 à 28
Évaluation globale par le patient de l'activité de sa maladie	0 à 10
Évaluation globale par le médecin de l'activité de sa maladie	0 à 10
<p>Articulations à évaluer : épaules, coudes, poignets, MCP, IPP, genoux. Activité de la polyarthrite rhumatoïde selon score CDAI : addition de tous les items</p>	
$\leq 2,8$: rémission	$> 10 - \leq 22$: activité modérée
$> 2,8 - \leq 10$: faible activité	> 22 : activité haute/ sévère

N. (2014). Traitement de fond de la polyarthrite rhumatoïde. Revue Médicale Suisse. <https://www.revmed.ch/RMS/2014/RMS-N-421/Traitement-de-fond-de-la-polyarthrite-rhumatoïde>

Les objectifs de la prise en charge thérapeutique sont : (9)

- d'atteindre l'objectif de rémission (DAS28 $< 2,6$) ou, à défaut, de faible niveau d'activité (DAS28 $\leq 3,2$) de la maladie ;
- de prévenir les lésions structurales ;
- de prévenir le handicap fonctionnel ;
- de prendre en charge les manifestations extra-articulaires ou systémiques ;
- de prévenir les comorbidités ;
- de préserver la qualité de vie du patient ;
- de préserver les capacités socioprofessionnelles du patient ;
- de préserver l'espérance de vie du patient

L'EULAR recommande une évaluation clinique fréquente, surtout si la maladie est active, tous les uns à trois mois afin d'ajuster le traitement si cela s'avère nécessaire, notamment en cas d'absence d'amélioration (**figure 10**). Ce contrôle serré permet de mieux prévenir les dégâts structurels ainsi que le handicap fonctionnel.

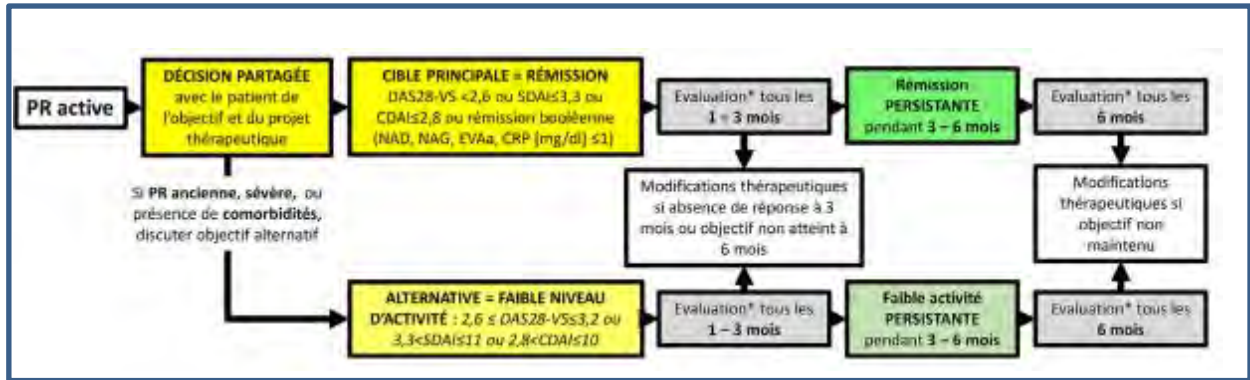


Figure 10: Objectifs du traitement et organisation de la prise en charge de la PR.

CRP : protéine C-réactive ; CDAI : Clinical Disease Activity Index ; DAS28 : Disease Activity Score ; HAQ : Health Assessment Questionnaire ; NAG : nombre d'articulations gonflées ; NAD : nombre d'articulations douloureuses ; PR : polyarthrite rhumatoïde ; SDAI : Simplified Disease Activity Index
 Daien, C., Hua, C., Gaujoux-Viala, C., Cantagrel, A., Dubremetz, M., Dougados, M., Fautrel, B., Mariette, X., Nayral, N., Richez, C., Sarau, A., Thibaud, G., Wendling, D., Gossec, L., & Combe, B. (2019). Actualisation des Recommandations de la Société française de rhumatologie pour la prise en charge de la polyarthrite rhumatoïde. *Revue du Rhumatisme*, 86(1), 8-24. <https://doi.org/10.1016/j.rhum.2018.09.008>

La PR nécessite une prise en charge pluridisciplinaire, alliant médecin traitant et rhumatologue principalement, mais aussi cardiologue, pneumologue, dermatologue, ophtalmologue, pour la prise en charge des symptômes extra-articulaires. Le traitement de la PR associe un traitement à action immédiate, qui vise à soulager la douleur et un traitement de fond qui vise à freiner l'évolution de la maladie. En absence de rémission ou en cas de contre-indication, d'autres approches peuvent être choisies : un traitement local peut ainsi être administré (injections intra-articulaires) avec une association de plusieurs traitements de fond, ou en additionnant une thérapie ciblée à un traitement de fond. **(Figure 11)**

Prise en charge

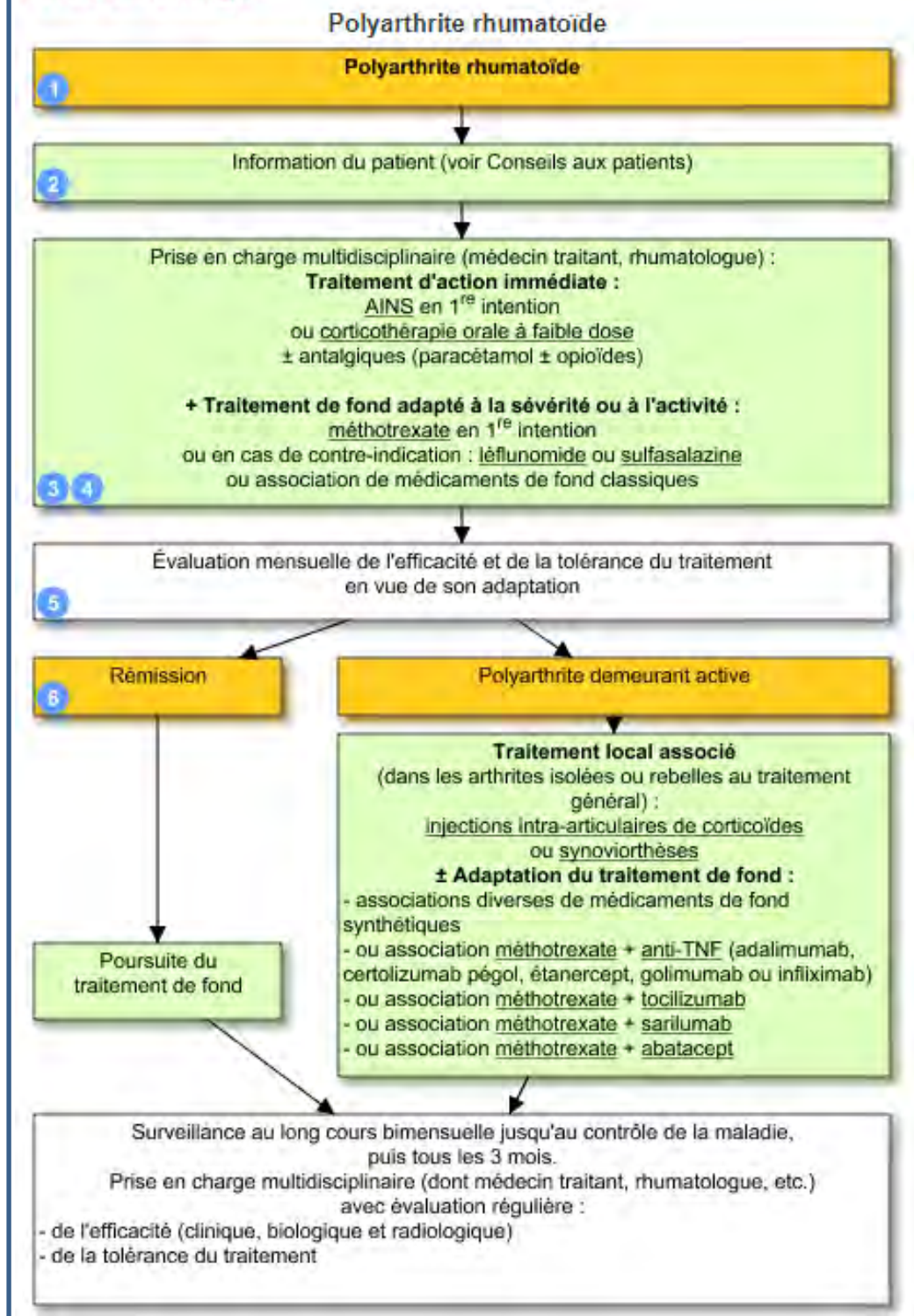


Figure 11: Prise en charge de la PR (Vidal recos)

7.1. Traitement d'action immédiate :

Ces thérapeutiques sont mises en place rapidement pour un effet immédiat en association avec un traitement de fond. Ce traitement à action immédiate, de première intention, est habituellement interrompu quand le traitement de fond commence à faire effet (au bout de deux à trois mois généralement). Parmi ces traitements :

- Les Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) : La toxicité digestive, rénale et cardiovasculaire de tous les AINS justifie une surveillance étroite sur le plan clinique et biologique (mesure de la tension artérielle, contrôle de la fonction rénale). Leur prescription doit être limitée après soixante-cinq ans en raison de la fréquence des effets indésirables (22).

- La corticothérapie à faible dose :

Cette classe thérapeutique est réservée principalement aux PR débutantes pour son effet anti-inflammatoire prononcé. Cependant, certaines études indiquent un effet sur le ralentissement de la progression de la PR. Effectivement, il s'avère qu'à faible dose les corticoïdes seraient en mesure de limiter l'apparition de l'évolution radiographique et pourraient donc être considérés comme traitement de fond en fonction des cas de PR (32). La prednisone est utilisée en première intention avec une faible dose, de l'ordre de 0,1 mg/kg/j (33) soit entre 5 et 10 mg par jour en une prise matinale (29). En absence d'efficacité, une dose de 15 mg/jour peut être utilisée de manière ponctuelle. Si la durée de la corticothérapie dépasse trois mois et/ou si la dose dépasse 7,5 mg par jour ou si le patient présente dès cette première évaluation une ostéoporose densitométrique ou fracturaire, une évaluation du risque d'ostéoporose doit être initiée (22). Le sevrage doit être planifié dès le départ ; le plus souvent en diminuant la posologie de 1 mg tous les 14 jours ou tous les mois (34). Des ponctions évacuatrices-infiltrations de dérivés cortisoniques peuvent être rajoutées pour un effet local important en complément du traitement général.

- Les antalgiques :

Les antalgiques sont utilisés pour atténuer la douleur. Les antalgiques sont classés en 3 paliers par l'OMS selon l'intensité de la douleur :

- Les analgésiques du palier I : pour les douleurs légères à modérées (Paracétamol, AINS)
- Les analgésiques du palier II : morphiniques faibles seuls (Tramadol) ou en association avec les analgésiques de palier I (Codéine-Paracétamol).
- Les analgésiques du palier III : agonistes morphiniques forts et des agonistes antagonistes.

Le paracétamol s'avère utile à la dose de 3 à 4 g par jour, parfois associé, à de la Codéine ou du Tramadol. Le recours aux antalgiques morphiniques est exceptionnel au cours de la polyarthrite rhumatoïde (22).

7.2. Traitements de fond :

Pour traiter la PR, les rhumatologues ont surtout recours à des thérapeutiques ayant un rôle immunomodulateur ou immunosuppresseur. Les anglo-saxons les regroupent globalement sous les termes de **sDMARDs** (synthetic Disease-Modifying Anti Rheumatic Drugs), appelés également thérapeutiques « conventionnelles » et de **bDMARDs** (biological Disease-modifying anti Rheumatic drugs) ou « biothérapies ».

7.2.1. Les sDMARDs :

Parmi les sDMARDs figurent notamment des médicaments utilisés depuis de nombreuses années tels que l'hydroxychloroquine, la sulfasalazine, les corticoïdes, le léflunomide et surtout le Methotrexate (MTX). Le mécanisme d'action, la pharmacocinétique et les effets indésirables sont présentées dans le tableau ci-dessous (**tableau 12**).

7.2.2. Les bDMARDs (Biothérapies):

Selon la Société française de rhumatologie pour la prise en charge de la PR : « Chez les patients insuffisamment répondeurs ou intolérants au MTX, le traitement doit être optimisé. En présence de facteurs de mauvais pronostic, l'addition d'une thérapeutique ciblée (biologique ou synthétique **bDMARDs ou sDMARD**) peut être proposée : anti-TNF, Abatacept, inhibiteurs de la voie de l'IL6, inhibiteurs de JAK et dans certaines circonstances rituximab. En l'absence de facteurs de mauvais pronostic, une rotation pour un autre traitement de fond synthétique conventionnel (LEF, SSZ) ou bien une association de traitements de fond synthétiques conventionnels peuvent être proposées ; en cas d'échec (ou de contre-indication), une thérapeutique ciblée (biologique ou synthétique) doit être envisagée ».

Tableau 11: sDMARDs : traitement de fond de la PR

DCI- Posologi e	Mécanisme d'action	Pharmacocinétique	Effets indésirables (EI)/ précautions d'emplois
<p>Méthotrexate ou acide 4-amino-10 méthylfolique 7,5 à 25mg par semaine</p>	<p>- agent anti-cancéreux anti-folate ayant des propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives à faible dose. <u>2 mécanismes d'action :</u></p> <p>- l'inhibition de la dihydrofolate-réductase (DHFR), enzyme qui réduit l'acide folique en acide tétrahydrofolique (FH4) (35) Le tétrahydrofolate est essentiel pour la biosynthèse nucléotidique de bases puriques et pyrimidiques. L'inhibition de la DHR par le méthotrexate conduit ainsi à une inhibition de la réplication cellulaire (37).</p> <p>- inhibe la 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide transformylase ce qui libère de l'adénosine. L'adénosine inhibe l'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales, Cela a pour conséquence d'inhiber le processus d'extravasation leucocytaire qui est une étape importante du processus inflammatoire. (35)</p>	<p>- rapidement absorbé : le pic sérique en 30 minutes.</p> <p>-La demi-vie plasmatique chez l'adulte est de l'ordre de 2 heures</p> <p>- fixation protéique de 50 %</p> <p>- à hautes et moyennes doses : traverse la barrière hémato-méningée</p> <p>- Le méthotrexate est transformé en dérivés polyglutaminés par les cellules néoplasiques et les hépatocytes</p> <p>- élimination rénale</p>	<p>- toxicité dose dépendante</p> <p>-EI les plus fréquents : douleurs abdominales, nausées, alopecie et augmentation des enzymes hépatiques (35)</p> <p>- EI rares possibles : atteintes cutanées sévères, atteintes hématologiques (leucopénie, thrombocytopenies possibles dès la première prise du médicament), atteintes pulmonaires comme la pneumopathie interstitielle hypoxémiant, cytolysé hépatique (35)</p> <p>- Ces effets secondaires justifient une surveillance régulière clinique, hématologique et hépatique (transaminases) (36).</p> <p>- recommandation d'associer une prise d'acide folique de 10 mg 48 heures après l'administration du méthotrexate.</p> <p>- Risque iatrogène avec les médicaments ayant pour effet la survenue d'insuffisance médullaire (35)</p> <p>-Associations induisant une toxicité du Méthotrexate : anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), aspirine à dose antalgique, antipaludiques de synthèse, certains antibiotiques telles que pénicillines, sulfamides antibactériens, et la ciprofloxacine (35).</p> <p>- L'association avec le Vaccin anti-marielle peut induire une maladie vaccinale généralisée mortelle (38).</p>
<p>Sulfasalazine</p>	<p>Conjugaison d'un salicylate l'acide 5-aminosalicylique et d'un sulfamide. la sulfapyridine, reliés entre eux par un pont azoïque. Elle a comme effet (42):</p> <p>-C'est anti-inflammatoire intestinal utilisé à la base pour les entérocopathies inflammatoires (39)</p> <p>-Une diminution des immunoglobulines A (IBA) sécrétées (secondaire à l'action antibactérienne de la sulfapyridine)</p> <p>Une inhibition de l'activité natural-killer démontré in vitro)</p> <p>Une action sur la synthèse des immunoglobulines et des radicaux libres.</p> <p>Une diminution du chimiotactisme des polynucléaires</p>	<p>-La sulfasalazine est scindée par les bactéries coliques en sulfapyridine et en acide 5-aminosalicylique.</p> <ul style="list-style-type: none"> • La sulfapyridine est presque entièrement absorbée et est éliminée dans les urines après une acétylation hépatique. • L'acide 5-aminosalicylique est éliminé dans les selles (40). 	<p>EI fréquents mais le plus souvent mineurs et réversibles à l'arrêt du traitement. Apparaissant le plus souvent pendant la première année</p> <p>-Les plus fréquents sont des EI digestifs à type de nausées, vomissements, douleurs abdominales, oligospermie (70 % des cas), parfois de vertiges ou de céphalées. Ils régressent après une diminution de la posologie (40).</p> <p>N.B : la Sulfasalazine peut être maintenue pendant une grossesse (39)</p>

<p>Immunosuppresseurs non issus de la biothérapie : Léflunomide /Azathioprine</p>	<p>Le léflunomide est un dérivé isoxazoligues, il est le plus récent des traitements de fond chimiques de la polyarthrite rhumatoïde.</p> <p>Le Leflunomide inhibe de façon compétitive la dihydrorotate-déshydrogénase, une enzyme clé de la voie de la synthèse de novo des bases pyrimidiques.</p> <p>Le léflunomide ralentit la prolifération des cellules à multiplication rapide et, en particulier, des lymphocytes T activés impliqués dans les réactions auto-immunes dans la PR. Les voies de recyclage des bases pyrimidiques sont conservées, ce qui limite la cytotoxicité et l'immunodépression induite par la molécule (40).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La demi-vie du métabolite actif est longue, de l'ordre de 15 à 18 jours, T • Elimination hépatique et rénale. Avec une réabsorption dans un cycle entérohépatique. • Si la dose quotidienne est de 10 à 25 mg, une dose de charge (100 mg j-1 pendant 3 jours) peut s'avérer nécessaire pour atteindre la dose efficace (40). 	<p>Les effets indésirables surviennent le plus souvent dans les 6 premiers mois et semblent favorisés par l'utilisation de la dose de charge. Les effets indésirables les plus fréquents sont digestifs (diarrhées chez 17% des patients) associés ou pas à une perte de poids (40).</p>
<p>Antipaludiques de synthèse : Chloroquine /Hydroxychloroquine</p>	<p>. Deux molécules sont principalement utilisées : Le sulfate d'hydroxychloroquine et le sulfate de chloroquine (32). Le mode d'action des APS reste obscur. Cependant des études ont démontré les effets suivants (41) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Les APS s'accumulent dans les lysosomes et inhibent les enzymes lysosomiales et captent des radicaux libres. - Ils inhibent le chimiotactisme et la phagocytose des polynucléaires et des monocytes et ont aussi un effet immunosupresseur. - La chloroquine inhibe in vitro les réponses lymphocytaires aux mitogènes. - La chloroquine, a très faible concentration, est capable d'inhiber sélectivement la libération d'interleukine 1 (IL1) par les monocytes. - La chloroquine limite la synthèse des prostaglandines E2 par la synoviale. 		<p>Dans l'ensemble, les APS sont bien tolérés. Dans 10 à 20% des cas, des effets indésirables mineurs sont observés nécessitant rarement une interruption : anorexie, nausées, vomissements, diarrhée, douleurs abdominales, troubles cutanés (rash divers), nerveux (insomnies, céphalées, vertiges, bourdonnement d'oreilles) (34).</p> <p>Quand le traitement est prolongé, des troubles cutanés peuvent être observés : coloration brunâtre au niveau des bras, des jambes, du cou, du visage et du lit des ongles. Une alopecie discrète est possible. Les effets indésirables neurologiques (neuromyopathies) sont exceptionnels (34).</p>

7.2.2.1. Anti-TNF alpha : Adalimumab, Certolizumab, Etanercept, Infliximab, Golimumab

Le TNF α (tumor necrosis factor α) est une cytokine pro-inflammatoire, au même titre que l'interleukine 1 (IL1), l'IL6, ou l'IL18. Les cellules sécrétrices du TNF α sont surtout les macrophages, mais également les fibroblastes, les cellules endothéliales, les polynucléaires, voire les lymphocytes B ou T (34). De nombreuses molécules sont capables de moduler de manière non spécifique le TNF α , telles que la thalidomide, la pentoxifylline, voire les corticoïdes ou le MTX (42). Les thérapeutiques actuels utilisent cependant des molécules spécifiques qui sont soit des anticorps monoclonaux anti-TNF α , soit des récepteurs solubles de la cytokine. Le mécanisme d'action des anticorps anti-TNF résident principalement dans leur capacité à se fixer et bloquer la cytokine libre (TNF- α) mais également par fixation à ses molécules transmembranaires (pouvant entraîner dans ce cas une lyse cellulaire-potentiel effet cytotoxique). Les anti-TNF ont aussi pour effet l'inhibition de l'IL1, IL6 et métalloprotéases avec des propriétés de blocage du VEGF (propriété anti-néoangiogénique) (32).

Tableau 12 : -Anticorps anti-TNF alpha (34)

Infliximab (34)	<ul style="list-style-type: none"> - anticorps entier, chimérique (régions variables d'origine murine et fragment FC humain) anti-TNFα. - immunoglobuline G (demi-vie de 8-9,5 jours) ayant une forte affinité pour le TNFα trimérique. - indiqué chez les patients ayant une PR active, sévère ou évolutive après une réponse jugée insuffisante avec les autres traitements de fond dont le MTX. - utilisé pour son effet sur la réduction des symptômes et signes inflammatoires lié à la PR. - Des études ont même démontré l'absence d'aggravation significative des lésions radiographiques sous infliximab.
Adalimumab (34)	<ul style="list-style-type: none"> - anticorps monoclonal totalement humanisé. - utilisé en injection sous-cutanée en association au MTX ou en monothérapie. - demi-vie de 14 jours - principalement indiqué chez les patients ayant une PR modérément à sévèrement active de l'adulte lorsque la réponse aux traitements de fond, y compris le MTX, est inadéquate. - Des études ont démontré que l'association de l'adalimumab-MTX avait pour effet un ralentissement significatif de la progression de la maladie tandis qu'il y avait une progression linéaire chez les patients recevant l'association Placebo-MTX. L'inhibition de la progression radiographique a été plus importante dans les groupes Adalimumab par rapport au MTX et significativement plus nette dans le groupe association Adalimumab-MTX.
Etanercept (34)	<p>« L'éтанercept est une protéine de fusion comportant, d'une part, un fragment FC d'une IgG humaine et, d'autre part, deux molécules du récepteur soluble p75 du TNFα ; sa demi-vie est de 70 heures. Il est utilisé en injection sous-cutanée 2 fois par semaine, en monothérapie ou en association au MTX.</p> <p>Il est indiqué chez les patients ayant une PR active de l'adulte en cas de réponse inadéquate aux traitements de fond y compris le MTX et chez ceux ayant une PR sévère active et évolutive de l'adulte non précédemment traitée par le MTX » (30). Plusieurs études contrôlées ont démontré l'efficacité clinique de l'éтанercept dans la PR, globalement comparable aux autres anti-TNF.</p>

Certolizumab (32)	<p>- Le certolizumab-pegol (CP) est une conjugaison entre un fragment d'immunoglobuline humanisé recombinant ciblant le TNF-α et une molécule de polyéthylène glycol (PEG). Sa posologie débute par une dose initiale à 400mg soit 2 injections sous-cutanées le même jour. Ces injections seront répétées à la semaine 2 et à la semaine 4. Les doses d'entretien de 200mg se feront tous les 15 jours soit l'équivalent de la demi-vie du produit.</p> <p>-Cet anticorps est prescrit en combinaison avec le MTX dans les cas de PR dont l'activité est modérée à sévère, et la réponse aux traitements conventionnels est inadaptée</p> <p>-Il peut également être prescrit en monothérapie chez les patients intolérants au MTX uniquement en seconde intention.</p>
Golimumab (32)	<p>-C'est un anticorps monoclonal de type Immunoglobuline G totalement humanisé</p> <p>-Son administration sera faite, entre autres, en association au méthotrexate, quand la réponse aux traitements de fond, notamment le MTX, a été inadéquate</p> <p>-Il est administré par voie sous-cutanée ou par auto-injection à raison de 50 mg une fois par mois.</p>

Il existe cependant des **contre-indications à l'utilisation des traitements anti-TNF** :

- Infections évolutives ou chroniques ;
- Antécédents d'infection grave, d'infection récurrente, de tuberculose non ou mal traitée
- Pathologies prédisposant aux infections (diabète non équilibré etc.) ;
- Néoplasie ou hémopathie malignes récentes (< 5 ans) ;
- Insuffisance cardiaque congestive ;
- Maladies démyélinisantes – névrite optique ;
- Hypersensibilité à la substance active ou à l'un des excipients ;
- Grossesse, allaitement.

Ainsi que des **effets secondaires liés aux anti-TNF (43)**:

- Infections bactériennes, en particulier infections respiratoires hautes (tuberculose) ; infections opportunistes
- Hépatites
- Syndromes démyélinisants ;
- Tumeurs solides et lymphomes ;
- Réactions au site d'injection, dépendant du taux d'anti-anticorps ;
- Anémie, leucopénie, thrombocytopénie

Au vu des effets secondaires, un examen clinique, biologique et radiographique est nécessaire avant d'entamer un traitement anti-TNF α (34) :

- Hémogramme,
- Electrophorèse des protéines sériques,
- Dosage des enzymes hépatiques,
- Dépistage Hépatite B, C et VIH
- Recherche d'anticorps anti-nucléaires et anti ADN,
- Radiographie du thorax
- Recherche de tuberculose,
- Recherche de foyer infectieux.

Des examens de suivi peuvent être fait durant la prise du traitement : examen clinique, biologique (VS, protéine C réactive, hémogramme, enzymes hépatique) et radiographique (34).

7.2.2.2. Anti IL-6 : Tocilizumab (34)

Le Tocilizumab est un anticorps monoclonal humanisé ciblant les récepteurs de l'interleukine 6. L'IL6 est à l'origine de l'activation des lymphocytes, de la synthèse de protéines inflammatoires et de la résorption osseuse. Le Tocilizumab est administré en perfusion intraveineuse. Elle est indiquée dans le traitement des PR d'activité modérée à sévère, chez des patients polyarthritiques préalablement traités à l'aide d'un ou plusieurs traitements de fond sans réponse satisfaisante. Il est principalement utilisé en association au MTX. Toutefois une monothérapie par Tocilizumab est envisageable lorsque le MTX n'est pas toléré par les patients. L'association Tocilizumab-MTX a prouvé son efficacité dans la réduction des atteintes structurales articulaires ainsi que dans l'amélioration des aptitudes fonctionnelles.

Le Tocilizumab est contre indiqué chez les patients présentant des infections sévères ou une hypersensibilité à l'un des composants. Faute d'information, le Tocilizumab sera vivement déconseillé en cas de grossesse ou d'allaitement. Le tocilizumab est à l'origine de divers effets indésirables qui ont pu être identifiés lors des dernières études cliniques :

- Potentialisation du risque infectieux,
- Aggravation des diverticulites,
- Réaction aux sites d'injection,
- Trouble lipidique avec notamment une élévation du taux de cholestérol,
- Augmentation des enzymes hépatiques.

Un suivi pré-thérapeutique et une surveillance durant le traitement sont nécessaires : hémogramme, bilan hépatique et du bilan lipidique. Il conviendra également de rechercher des signes d'infection, hépatites, tuberculose, VIH, et de réaliser un bilan cardiaque.

Il existe également le **Sarilumab** qui est un anticorps monoclonal humain dirigé contre le récepteur de l'interleukine-6 (IL-6). Il est le 2^{ème} représentant de cette classe thérapeutique après le Tocilizumab (44). La Commission de transparence place le Sarilumab dans la stratégie thérapeutique comme un traitement de 2^e intention après échec des traitements de fond classiques tel que le méthotrexate (MTX) ou en 3^e intention (échec d'un médicament biologique) ou plus (échec de plusieurs traitements de fond classiques et/ou biologiques) (44).

7.2.2.3. Anti Lymphocyte T : Abatacept

L'Abatacept est une protéine de fusion entre le domaine extracellulaire de l'antigène cytotoxique lié aux lymphocytes T (CTLA-4) et une partie du fragment FC d'anticorps IgG. Son

mécanisme d'action réside en l'inhibition des voies de costimulation entre les cellules présentatrices d'antigène et les lymphocytes T. Il a pour effet de freiner la prolifération des lymphocytes T et de réduire ainsi la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (32).

Il est prescrit en association avec le MTX chez les patients ayant une PR modérément active ou sévère après une réponse jugée insatisfaisante ou une intolérance au traitement de fond basé au moins sur un anti TNF (32). L'Abatacept a prouvé une efficacité clinique similaire à celle des anti-TNF, avec une efficacité radiographique et une bonne tolérance. En dehors du risque infectieux des biomédicaments de la PR, l'Abatacept présente un bon profil de tolérance (34).

7.2.2.4. Autres biothérapies disponibles dans l'arsenal thérapeutique de la PR :

7.2.2.4.1. Anti IL1 :Anakinra

L'Anakinra est un antagoniste du récepteur de l'IL1 (IL1 Ra). Il rentre en compétition avec l'IL1 et empêche ainsi le blocage de la transduction de signal et l'inhibition de l'activité de l'IL1. Il est actuellement indiqué dans la PR active et réfractaire de l'adulte chez les patients non ou peu répondeurs au MTX (32). Il s'emploie sous forme d'injections sous-cutanées. Il a montré une efficacité satisfaisante mais moindre à la fois sur les signes cliniques et sur l'évolution radiographique que les anti-TNF (30). Cela explique le fait de réserver l'association Anakinra-MTX aux cas de contre-indications aux anti-TNF (32). La tolérance de l'Anakinra, notamment sur le plan infectieux, est bonne. Il peut exister des réactions importantes aux points d'injection ou des réactions allergiques transitoires (34).

7.2.2.4.2. Anti Lymphocyte B : Rituximab

Le Rituximab est un anticorps monoclonal chimérique inhibant spécifiquement le récepteur CD20 des lymphocytes B matures engendrant ainsi la lyse cellulaire des lymphocytes B (32). Il est administré par perfusion intraveineuse chez les patients ayant une PR active et sévère avec des intolérances qui sont non ou peu répondeurs aux traitements de fond avec au moins un anti-TNF (32). Son efficacité a été démontrée notamment sur la progression radiographique, et ce, chez les patients ayant une réponse insatisfaisante au MTX et/ou qui sont réfractaires aux anti-TNF (34). Concernant la tolérance au Rituximab, les effets indésirables suivants sont les plus observés :

- Réactions générales dues à l'injection : ces réactions justifient la prise de méthylprednisolone, paracétamol et antihistaminique (34).
- Augmentation du risque infectieux : risque exceptionnel d'infections à virus JC (Leucoencéphalopathie multifocale progressive), le rituximab ne semble pas exposer aux infections opportunistes y compris la tuberculose (34)
- Douleurs abdominales (32)

- Spasmes (32)
- Troubles cardiaques (32)

7.3. Traitements locaux :

7.3.1. Ponction articulaire :

Des ponctions articulaires évacuatrices peuvent être effectuées sur les grosses articulations notamment, elles ont pour effet de diminuer l'épanchement et de procurer un soulagement casi-immédiat aux patients (32) (45).

7.3.2. Infiltration de corticoïdes intra-articulaire :

Une infiltration intra-articulaire de corticoïdes est proposée en cas de synovite persistante (41). L'objectif étant de réduire et calmer l'inflammation qui est à l'origine de la douleur, du gonflement et de la gêne fonctionnelle (34). Le produit recommandé est un produit retard « l'hexacétonide de triamcinolone » (45), un repos de 3 jours de l'articulation traité est conseillé (34). Si la synovite récidive après des infiltrations répétées, une synoviorthèse est proposée (45).

7.3.3. Synoviorthèse :

La synoviorthèse consiste à injecter en intra articulaire une substance ayant pour but de détruire, et d'abraser les cellules présentes qui se sont multipliées dans la synovie. L'intérêt premier de cette intervention est de lutter contre le pannus synovial (32). Les synoviorthèses sont principalement isotopiques (isotope radioactif) et parfois chimiques (acide osmique) (45). En pratique, cette technique est réservée aux articulations disposants d'un cartilage sain, une injection de corticoïde est effectuée et un repos de 3 jours de l'articulation est recommandée (32).

7.3.4. Lavage articulaire :

Du sérum physiologique est utilisé afin d'assainir la cavité articulaire et de réduire le taux de cytokines pro-inflammatoires (32)

7.4. Rééducation et réadaptation fonctionnelle :

La réadaptation fonctionnelle peut être indiquée à tous les stades de la maladie. Elle a pour objectif de prévenir les déformations, d'entretenir la trophicité musculaire et la mobilité articulaire et de lutter contre l'enraidissement. Elle est réalisée par des kinésithérapeutes et des ergothérapeutes spécialisés (34). La rééducation doit être proposée le plus tôt possible afin de prévenir les déformations et les raideurs. Elle a pour objectif d'améliorer les amplitudes fonctionnelles et de permettre au patient de s'adapter à son handicap (32)

7.5. Appareillage :

Il s'agit principalement d'appareillages amovibles (**figure 12**) confectionnés sur mesure par un kinésithérapeute ou un ergothérapeute qui aide à corriger les déformations causées par la PR : attelles pour réduire les déformations des doigts en boutonnière, du col de cygne, C-barre pour le pouce adductus. Il peut aussi s'agir d'orthèses plantaire, de semelles moulées ou de chaussures spécialisées (34).



Figure 12: Exemple d'orthèse pour la main et le poignet rhumatoïdes

(SOCIETE FRANÇAISE DE RHUMATOLOGIE 2012)

7.6. Traitement chirurgical :

La chirurgie sera particulièrement indiquée en cas de symptômes articulaires locaux persistants. La décision d'un acte chirurgical devra faire l'objet d'une concertation multidisciplinaire comprenant le patient, le chirurgien orthopédique, le rhumatologue et une équipe de rééducation fonctionnelle (32). Les interventions chirurgicales sont nombreuses et différentes dépendamment de l'articulation et du degré des lésions articulaires :

- Ténosynovectomie : exérèse de la gaine des tendons qui sont à l'origine de l'inflammation des tendons, permet de limiter la rupture tendineuse (34)
- Synovectomie intra-articulaire : ablation totale ou partielle de la membrane synoviale
- Chirurgie prothétique : ou arthroplastie, elle consiste à la pose d'une prothèse, elle concerne principalement les articulations de l'épaule et du coude (34).
- Arthrodèses : consiste au blocage incomplet ou total de l'articulation (32), concerne principalement les vertèbres cervicales (34).

7.7. Autres prises en charge :

7.7.1. Education thérapeutique :

L'éducation thérapeutique est pluridisciplinaire et vise à faire participer le patient pour une bonne réponse thérapeutique et une amélioration de sa qualité de vie. Effectivement, il a été démontré qu'un patient informé sur les risques évolutifs et les bénéfiques/risques des traitements, ont une évolution plus favorable. L'éducation thérapeutique permet au patient d'avoir des connaissances sur sa maladie, des

compétences sur la gestion de sa pathologie (gestion du stress, confiance en soi, soulager les symptômes, changer son mode de vie...) (32)

7.7.2. Prise en charge psychologique :

Les psychiatres et psychologues peuvent faire partie de l'équipe multidisciplinaire afin d'assurer une prise en charge psychologique adaptée à la singularité de chaque patient (34).

8. Perspectives thérapeutiques :

De nombreuses recherches sont en cours et exploitent les pistes suivantes afin d'enrichir l'arsenal thérapeutique de la PR (32) :

- La voie des cytokines :
 - o La régulation de l'IL-18 ou l'IL-15 qui sont pro-inflammatoires,
 - o L'utilisation de l'IL-4 ou l'IL-10 qui sont anti-inflammatoires,
- La régulation des molécules d'adhésion et des chemokines impliquées dans la migration cellulaire,
- La régulation du système Rank ligand,
- L'utilisation d'ostéoprotégérine,
- La voie des inhibiteurs de métalloprotéases,
- La voie des kinases : inhibiteur des JAK (Janus kinase). Cette nouvelle classe thérapeutique appelé targeted synthétic DMARD est déjà approuvée dans certains pays (États-Unis, Suisse, Japon) (34).

Par ailleurs, un vaccin dit « thérapeutique », qui permettrait au patient de produire ses propres inhibiteurs de l'inflammation, est en cours d'étude (28-34). En effet, une équipe de l'Université de Toledo (USA) ont observé une réduction de l'inflammation des articulations avec une préservation des os et du poids corporel chez des souris immunisées avec de l'adjuvant de Freund incomplet mélangé à la protéine 14-3-3ζ purifiée (la protéine 14-3-3ζ joue un rôle dans la régulation de la signalisation cellulaire en se liant à un large éventail de protéines et ce dans différentes pathologies dont les maladies auto-immunes) (46).

III. Partie 2 : Résultats de recherche :

La biothérapie à base d'anticorps monoclonaux anti-TNF- α qui est administrée en intraveineuse ou en injection sous-cutanée est un des traitements majeurs de la PR. Mais, en plus de poser un certain inconfort aux patients, cette thérapie est très couteuse ce qui diminue grandement son accessibilité à tous les patients. Le traitement de l'arthrite rhumatoïde et les coûts qui y sont associés représentent donc un enjeu majeur de santé publique (47). Ainsi le développement de thérapies alternatives moins onéreuses et offrant plus de confort aux patients suscite actuellement un effort de recherche considérable.

Ainsi une stratégie de thérapie génique de la PR à base de nanoparticules de chitosane siRNA-TNF α pourrait être une alternative aux anticorps anti-TNF α . Les résultats d'une étude préliminaire réalisée dans le laboratoire de recherche en orthopédie de l'hôpital sacré cœur de Montréal qui s'intéresse à la thérapie génique de la PR par des nanoparticules de chitosane siRNA- TNF α sont présentés ci-dessous

1. Objectifs de l'étude :

Dans cette étude, il est question de présenter une alternative aux anticorps monoclonaux anti-TNF-alpha, une alternative moins chère avec une voie d'administration plus pratique pour les patients. Il s'agit de nanoparticules de chitosane-siRNA anti-TNF- α administrées par voie orale.

Les thérapies utilisant la technologie des ARN interférents (siRNA) représentent une de ces thérapies innovantes une approche innovante pour agir sur le TNF α . Les ARN interférents sont employés pour moduler l'expression des gènes par une répression traductionnelle : Les SiRNA ciblent de façon spécifique un ARNm donné, qui code pour une protéine ayant un rôle dans la physiopathologie de la maladie offrant la possibilité de cibler l'expression d'une molécule incriminée dans un des axes physiopathologiques de la maladie. Dans le cas de la PR, cibler les ARNm codant le TNF- α empêcherait ainsi sa transcription. L'utilisation d'ARN interférent spécifique du TNF- α représente donc un puissant outil dans le développement thérapeutique pour la PR.

Toutefois plusieurs défis techniques doivent être surmontés afin d'en faire un outil thérapeutique efficace. En effet, les siRNA sont très sensibles aux différentes nucléases retrouvées dans les milieux biologiques, en plus de posséder une charge négative rendant difficile le passage à travers les membranes biologiques chargées négativement également. L'utilisation de différents vecteurs de transport des siRNA permet d'améliorer les propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques de ces derniers.

Dans cette étude, un vecteur naturel non viral, le chitosane, a été utilisé. Le chitosane est un polymère d'origine naturelle issue de la chitine, correspondant à un polymère d'aminoglucosamine extrait de l'exosquelette des crustacés (48). Il est apprécié pour ces propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité (48). Il est également peu immunogène ce qui en fait un vecteur de choix pour la thérapie génique par voie orale. Des modifications chimiques sont souvent apportées sur le chitosane afin de renforcer et d'améliorer ses propriétés pharmacocinétiques (49). Dans cette étude ont été utilisés, le chitosane diéthylamine (DEAE 15%) pour augmenter la solubilité des nanoparticules et du DEAE15-chitosane-PEG dans lequel le polyéthylène glycol rend le chitosane plus mucolytique afin de faciliter par la suite son passage à travers la paroi intestinale (50).

L'efficacité des nanoparticules de chitosane-siRNA anti- TNF- α , a déjà été démontrée par voie intrapéritonéale (IP) sur le modèle murin (51), **le but de cette étude est d'évaluer la biodisponibilité et l'efficacité de ces nanoparticules (NPs) lorsqu'elles sont administrées par voie orale.** Pour cela, l'efficacité des nanoparticules *in vitro* a été testée en transfectant des cellules humaines de carcinome du colon ainsi que des macrophages murins. Puis, des tests *ex vivo* ont été réalisés afin d'évaluer l'absorption intestinale sur des intestins de rats. Enfin, la biodistribution et l'efficacité des nanoparticules a été évaluées sur un modèle murin *in vivo* de souris arthritiques.

2. Matériels et méthodes :

2.1. Matériels :

Préparation des Nanoparticules :

- Chitosane modifié avec diéthylaminoéthyle DEAE15, Chitosane modifié avec diéthylaminoéthyle DEAE15-PEG (Sigma Aldrich Chemical Co),
- Fluide Intestinal Simulé sans enzyme (Sigma Aldrich Chemical Co), fluide gastrique simulé préparé selon la pharmacopée européenne
- siRNA TNF α (250 nmol, GenBank accession number: NM_000594.3, Catalog No 4457308, siRNA ID No s202295) Ambion Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA):

sense 5'-CGU CGU AGC AAA CCA CCA ATT-3'
antisense 3'-UUG GUG GUU UGC UAC GAC GTG TG-5',

Culture cellulaire/ viabilité cellulaire :

Caco2 (lignée cellulaire tumorale humaine d'origine intestinale isolée d'un adénocarcinome colique) et des Raw 264.7 (lignée cellulaire de macrophages murins) cultivées respectivement dans du milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), et dans du milieu AMEM (Alpha Modification of Eagle's Medium), ajustés avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS),

et un mélange de pénicilline-streptomycine (PS) 1%, à 37°C, dans une atmosphère humide contenant 5% CO₂.

Biodistribution et efficacité *in vivo*: Souris DBA/1 femelles de 8 semaines (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA), anticorps et LPS pour induire l'arthrite (Chondrex, inc., Redmond, WA, USA),

2.2. Méthodes :

2.2.1. Préparation des NPs :

Pour préparer le stock de Chitosane, 2 mg du CH-DEAE15 ont été dissous dans une solution d'HCL à 0.1 M selon une réaction équimolaire. Une fois le Chitosane dissous, 10mM de tampon phosphate pH 6.3 sont ajoutés pour obtenir une concentration finale de 2 mg/ml de chitosane. Pour une utilisation *in vitro*, cette solution a été filtrée sous la hotte, par un filtre 0,45 µm pour réduire le risque de contamination.

Les NPs sont ensuite préparées en définissant pour chaque expérience, une concentration fixe du groupement phosphate (siRNA) contre des concentrations variables des groupements amine (Chitosane). Les NPs sont ensuite suspendues dans un tampon (tampon PBS ; FIS ou FGS). Les différentes NPs utilisées sont définies par le ratio N/P qui représente la quantité de Chitosane (groupement amine « N ») par rapport au siRNA (groupement phosphate « P »).

2.2.2. Caractérisation des NPs :

2.2.2.1. Intégrité des NPs: électrophorèse :

Afin de vérifier l'intégrité et la stabilité des nanoparticules de CH-siRNA, une électrophorèse sur gel d'agarose 2% a été réalisée. 20ul de NPs aux ratios 5,10,15,20 et 25 ont été déposés dans chaque puit (1ug de siRNA par puit). Après migration à 150 volts pendant 30 minutes, le gel a été coloré avec du bromure d'éthidium (0.5 µg / mL), rincé avec de l'eau et photographié avec le système multimage Cabinet Light™ (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA).

2.2.2.2. Taille et potentiel zéta :

La taille et le potentiel zéta des NPs de Chitosane-siRNA ont été mesurés par l'appareil Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK). La technique de diffusion dynamique de la lumière DLS (Dynamic Light Scattering) a été utilisée pour déterminer la taille des NPs. Pour cette expérience les NPs ont été préparées à une concentration finale de siRNA égale à 0.02 mM dans un volume final de 1000 µL.

2.2.3. Viabilité cellulaire par test MTS

Le test MTS (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -5- (3-carboxyméthoxyphényl) -2- (4-sulfophényl) -2H-tétrazolium) permet d'évaluer la viabilité des cellules. Les cellules ont été réparties dans une plaque de 96 puits à une densité de 20 000 cellules par puits pour les cellules Caco2 et une densité cellulaire de 75 000 cellules par puits pour les cellules Raw 264.7 dans du milieu de culture 10% FBS et 1% PS. Les cellules sont incubées pendant 24 heures. Au 2^{ème} jour, après avoir changé le milieu de culture (100 µl/puits), les NPs sont ajoutées à différents ratios (5 µg de siRNA par puits, 100µl de NPs préparées dans PBS par puits). Au 3^{ème} jour, les milieux de culture ont été remplacés par des milieux contenant du MTS (20µl de MTS+100µl de milieu de culture / puit). L'absorbance à 490 nm a été mesurée avec un lecteur de microplaques EL800 après 1 heure d'incubation (Molecular Devices Corporation, Menlo Park, CA, USA). Le pourcentage de viabilité des cellules a été calculé en fixant les cellules non traitées du contrôle négatif à 100%.

2.2.4. Transfection *in vitro* :

Des macrophages ont été cultivés dans une plaque de 24 puits avec une densité cellulaire de 250.000 cellules par puits pendant 24h. Le 2^{ème} jour, le milieu est changé pour 100 µL de milieu AMEM seul contre 100 µL de milieu de culture pour le contrôle négatif (cellules non stimulées au LPS/ non traitées par si-RNA) et le contrôle positif (cellules stimulées au LPS/ non traitées par le si-RNA ou par les NPs).

La plaque est ensuite incubée pendant 4h à 37°C avant de changer encore le milieu. Le 3^{ème} jour, les cellules sont stimulées avec du LPS (50 ng/ml) sans changer de milieu, sauf pour le groupe contrôle négatif où un volume équivalent de milieu de culture a été introduit à cette étape (dans le but de préserver un même volume total dans tous les puits et avoir des concentrations comparables). Après une incubation de 24h ; le milieu est collecté et les cellules lysées avec un tampon de lyse. Le tout est centrifugé ; les surnageants sont récupérés et conservés à -20°C. Les taux de TNF alpha dans les milieux sont analysés avec la technique ELISA ((Kit ELISA Murine TNF-α Mini ABTS ELISA Development Kit- catalogue# 900-M54 (de Peprotech) et la concentration en protéine déterminée dans les lysats des cellules avec la technique de BCA (BiCinchoninic acid Assay).

2.2.5. Absorption intestinale des NPs *ex vivo*

Afin d'évaluer la capacité des nanoparticules à traverser la barrière intestinale, des intestins de rats ont été récupérés (environ 30 centimètres). Ces intestins ont été lavés au PBS à plusieurs reprises jusqu'à l'élimination du bol alimentaire. Ensuite, ils ont été coupés en morceaux, chaque morceau a été ligaturé par un fil chirurgical des deux côtés afin de former un sac intestinal, d'environ 2cm de long, contenant une solution de 200µL de nanoparticules ayant un ratio N/P=20. Pour chaque solution de NPS, une dose équivalente à 2 µL de siRNA-

FITC a été utilisée, le tout suspendu dans du FIS (fluide intestinal simulé) afin de reproduire l'environnement intestinal et le pH intestinal notamment. Les intestins ont été ensuite incubés dans du milieu DMEM dans une plaque de 12 puits (volume total de 2 ml) à température ambiante. Un volume de 100 µL de milieu a été prélevé de chaque puits après 1h, 2h et 4h d'incubation afin de mesurer par fluorimétrie l'intensité de la fluorescence. A chaque prélèvement, un volume de 100 µL de milieu DMEM est réintroduit au puit afin de restituer le volume total de milieu. Les résultats obtenus ont été par la suite comparés à une courbe standard (intensité de fluorescence en fonction de la concentration de siRNA-FITC) pour estimer la quantité de siRNA présente dans le milieu.

2.2.6. Bidistribution des NPs *in vivo*

La biodistribution des nanoparticules au sein d'un organisme vivant (souris : Souris femelles DBA/1, âgés de 8 semaines) a été observée avec le système en temps réel Pearl de Licor à 0h, 2h, 4h, 8h et 24h post-administration par gavage (voir orale). La comparaison de la biodistribution de trois solutions a été réalisée : une solution de siRNA-CY5.5 (groupe 1), une solution de nanoparticules de chitosan-siRNA-Cy5.5 (groupe 2) et une solution de NPs de chitosane-PEG-siRNA (groupe 3). Chaque groupe sera composé de 2 souris et chaque souris recevra une dose équivalente à 75 ug de siRNA-Cy5. Les animaux ont été anesthésiés avec de l'isoflurane (2-3%) pendant toute la durée des observations.

Remarque : Pour cette expérience, les souris ont été épilées avec une crème dépilatoire (Veet) car les poils peuvent interférer avec la fluorescence et causer ainsi un bruit de fond.

2.2.7. Efficacité des NPs *in vivo* :

30 souris femelles DBA1 âgées de 8 semaines et pesant entre 16 et 22g (poids moyen de 18,9 g) ont été utilisées afin d'évaluer l'effet anti-inflammatoire des NPs de chitosane-siRNA. Les groupes de souris inclus dans cette expérience sont comme suit :

- Groupe 1 : 6 souris saines recevant une solution saline
- Groupe 2 : 6 souris arthritiques recevant une solution saline
- Groupe 3 : 6 souris arthritiques recevant une solution de siRNA-TNF α (75 ug/souris)
- Groupe 4 : 6 souris arthritiques recevant des NPs de DEAE15-chitosane équivalente à 75 ug de siRNA-TNF α /souris
- Groupe 5 : 6 souris arthritiques recevant des NPs de PEG-DEAE15-chitosane équivalente à 75 ug de siRNA-TNF α /souris

Induction de l'arthrite (chez les souris arthritiques) : Au 1^{er} jour, 0.15 mL (7.5mL/kg) d'un cocktail de 5 anticorps monoclonaux (1.5 mg) (Chondrex, inc., Redmond, WA, USA) ont été administrés avec une injection intra-péritonéale (IP). Au 4^{ème} jour, une injection IP de 0.1 mL (5 mL/kg) d'une solution de lipopolysaccharide (LPS, 50 ug) sera réalisée afin d'induire

l'inflammation. L'arthrite sera observée à partir du 4^{ème} jour, et atteindra son pic vers le 7^{ème} jour. Un suivi des animaux a été effectué par des prises de poids régulières afin d'estimer la douleur et leur état général. La mesure de l'épaisseur de la patte postérieure gauche est réalisée afin d'évaluer le degré d'inflammation et l'effet anti-inflammatoire des NPs par rapport aux autres groupes. Enfin, le score arthritique des souris des différents groupes a été estimé au 7^{ème} jour de l'expérience, par 2 personnes en suivant la méthode de l'indice clinique de 4 points pour chaque patte, basé sur les signes macroscopiques (0 = aucune preuve d'inflammation, 1 = inflammation (enflure et/ou rougeur) dans une articulation, 2 = inflammation dans deux articulations, 3 = inflammation dans plus de deux articulations, et 4 = arthrite grave de l'ensemble de la patte et des articulations) (52) pour un score total de 0 à 16 pour les quatre pattes.

Afin de soulager la douleur, (évaluée aux critères suivants : poil très ébouriffé, ou posture anormale, ou comportement très agité ou immobile, ou perte de motricité ou prosternation, ou perte de poids se rapprochant de 20% au cours de l'expérience) une injection sous-cutanée au Buprénorphine (0.1 mg/kg) est administrée au besoin. Également, une litière spéciale (#7089 Teklad diamond soft bedding d'Envigo) est utilisée afin de prévenir la douleur causée par l'enflure/boiterie suite à l'induction de la maladie.

Le 9^{ème} jour, les souris seront anesthésiées à l'isoflurane (3-5%) et une ponction intracardiaque sera réalisée afin de recueillir le sang. Les animaux seront finalement euthanasiés par dislocation cervicale.

Ce protocole *in vivo* a été validé par le Comité d'éthique pour les animaux de l'hôpital sacré cœur de Montréal (Annexe 1)

3. Résultats et discussion :

3.1. Caractérisation des NPs :

Différentes NPs ont été préparées dans différents tampons : tampon phosphate ; FIS ou FGS avec différents ratios N/P qui représente la quantité de Chitosane (groupement amine « N ») par rapport au siRNA (groupement phosphate « P »). Elles ont été caractérisées par migration par électrophorèse sur gel d'agarose et également par la mesure de leur taille et de leur potentiel zéta.

Les NPs ont été préparées dans différents tampons afin d'évaluer l'effet du pH sur leur taille et leur charge et avoir ainsi une idée sur l'influence des différents pH physiologiques (gastrique et intestinal) sur les NPs.

3.1.1. Électrophorèse sur gel d'agarose :

La capacité du chitosane à se lier au siRNA en l'encapsulant (évitant ainsi l'échappement du siRNA) a été évaluée par une électrophorèse sur gel d'agarose. Pour cela, différents ratios N/P ont été testés. Les résultats sont illustrés dans la **figure 13** ci-dessous :

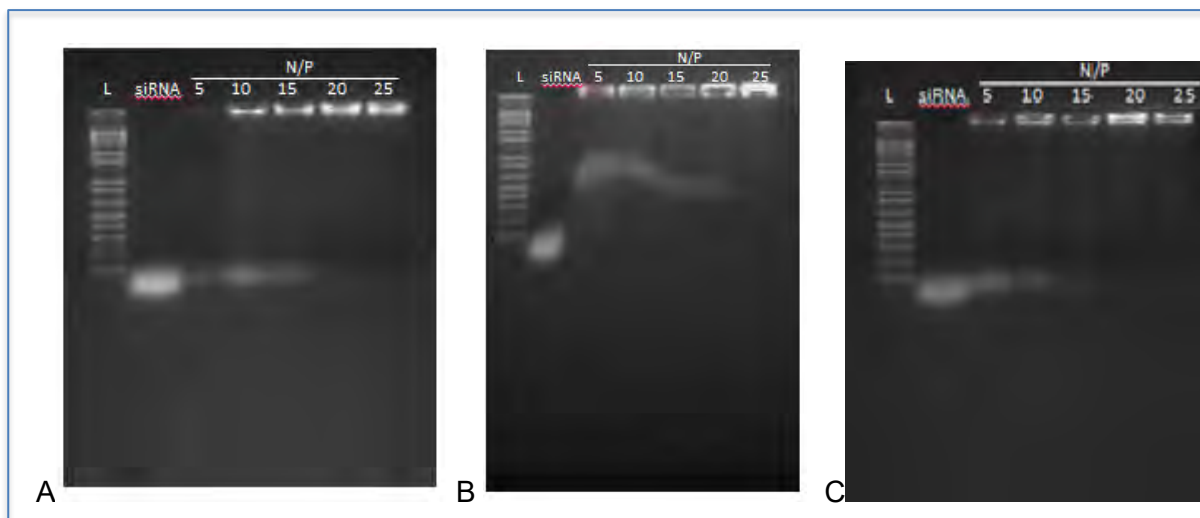


Figure 12: Caractérisation par Électrophorèse sur gel d'agarose des différentes NPs préparées

Les Nps ont été préparées avec 5 ratios groupement Amines/Phosphates (**N/P**) différents 5, 10, 15, 20 et 25 dans 3 tampons différents correspondant à **(A)** un tampon PBS pH 6.3 **(B)** un tampon FIS ou fluide intestinal simulé pH 6.5 et **(C)** un tampon FGS ou Fluide gastrique simulé pH 1.3. La piste (**siRNA**) correspond à une solution contrôle de siRNA (Volume de 20 μ L avec 1 μ L de siRNA à 1 μ g), la piste (**L**): Ladder (marqueur de taille).

Une libération partielle de siRNA est observée aux ratios 5 et 10 pour tous les tampons. À partir du ratio 15 les nanoparticules sont plus stables et cela est illustré par moins d'échappement de siRNA pour ces ratios-là, avec un signal plus intense au niveau des puits correspondant aux siRNA associés avec les molécules de chitosane. Cette expérience montre aussi, que plus le ratio augmente, plus la nanoparticule est stable, et ce quel que soit le tampon utilisé. Effectivement, moins d'échappements de siRNA sont observés avec les ratios élevés suggérant plus d'interaction entre les charges positives du chitosane et les charges négatives du siRNA aux ratios les plus élevés. Ces résultats sont en accord avec ceux observés par Shi et al., 2012 (53) qui montre que les molécules de chitosane à fort poids moléculaires avaient plus d'interaction avec le siRNA : en effet les molécules de chitosane de haut poids moléculaire sont plus longues et plus flexibles et ont un degré de déacétylation plus élevé ; donc une charge positive accrue qui améliore l'interaction électrostatique avec le siRNA procurant ainsi plus de stabilité à la NP.

3.1.2. Taille et potentiel zéta :

La taille et le potentiel Zéta des NPs préparées à différents ratios, dans les différents tampons (Phosphate, fluide gastrique simulé et liquide intestinal simulé), ont été mesurés. En effet ces

paramètres influent sur les propriétés des NPs quant à leur capacité de traverser les membranes cellulaires. Les résultats sont représentés dans la figure 14 ci-dessous.

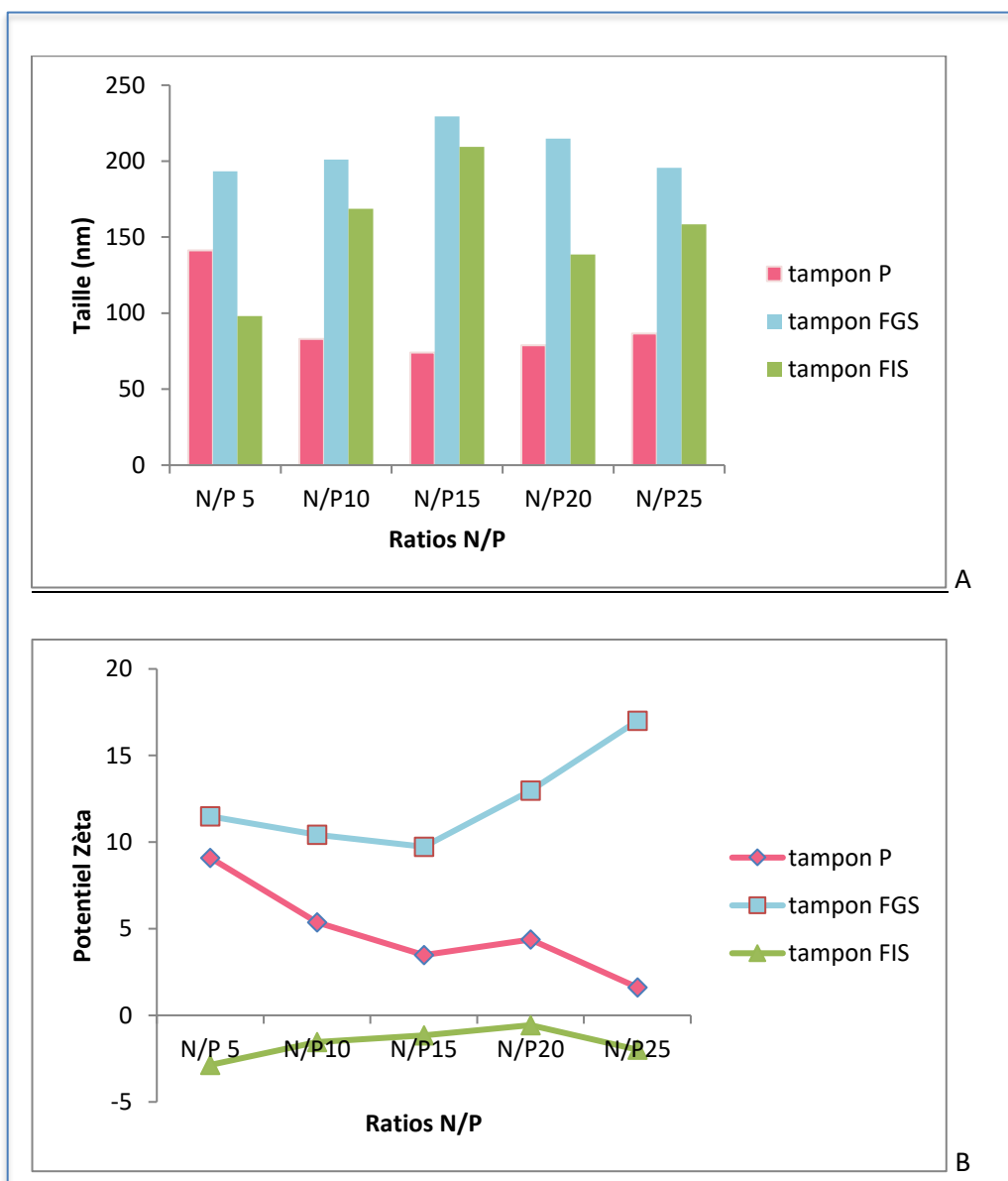


Figure 13 Caractérisation des Nanoparticules (Taille et Potentiel zéta)

(A) : Taille des NPs en fonction des ratios et du tampon utilisé. **(B)**: Potentiel zéta des NPs en fonction des ratios N/P et du tampon utilisé. (P :PBS. FIS : fluide intestinal simulé. FGS : Fluide gastrique simulé). n=1. La taille a été mesurée à trois reprises sur le même échantillon. Le potentiel zéta a été lui aussi mesuré avec le même appareil. Trois séries de 15 mesures ont été effectuées sur un volume de NPs de 1000 μ L.

Cette expérience montre que la taille des NPs varie entre 60 et 250 nm dans les différents tampons avec une tendance à des tailles plus petites dans le tampon phosphate et des tailles plus élevées dans le tampon à pH acide. Selon ces résultats, une première observation peut être confirmée, à savoir que les NPs utilisées répondent bien à la définition de « nanoparticules » vue que leurs tailles sont inférieures à 1 μ m (54), cela les place dans une position favorable pour bénéficier de l'effet EPR (Enhanced Permeation and Retention) et faire

l'objet d'une diffusion facilitée au niveau de l'épithélium intestinal, précisément au niveau des plaques de payer. Effectivement, c'est une diffusion qui concerne les particules ayant une taille inférieure à 500 nm (55).

Une observation similaire a été décrite par une autre étude (56), où il a été démontré qu'il existe une tendance générale à la diminution de la taille des nanoparticules avec l'augmentation du rapport N/P. Les résultats de cette étude indiquent que la taille des NPs a diminué avec l'augmentation du ratio N:P de 5 à 50 et a augmenté par la suite de N :P 50 à 100, probablement en raison d'une plus grande agrégation des NPs avec une capacité de condensation la plus élevée au rapport N:P de 50. Ces résultats sont cohérents avec ceux observés dans notre étude, à savoir l'absence d'une relation linéaire entre l'augmentation du rapport N/P et la taille des NPs.

Concernant le potentiel Zêta, celui-ci atteint des valeurs comprises entre 10 mV et 15 mV pour le tampon FGS, des valeurs plus faibles pour le tampon phosphate (2 - 9 mV), voire négatives (-2,8 et - 0,6 mV) en ce qui concerne le tampon FIS (figure 2B). Ce qu'il faut retenir dans un premier lieu, c'est que le pH influence les caractéristiques physicochimiques de NPs. Il est important de connaître la corrélation entre le potentiel Zeta et le pH afin de pouvoir prédire comment les variations de pH à l'intérieur du corps humain affecteront la charge superficielle des NPs. Il faut également noter que le potentiel Zêta est un indicateur de la stabilité des suspensions colloïdales. En effet, si le potentiel Zêta de particules négatives ou bien positives est élevé, les répulsions entre particules sont suffisamment importantes pour éviter le rapprochement des particules, donc leur agrégation. Lorsque le potentiel Zêta est faible, les forces attractives dépassent les forces répulsives et les particules peuvent donc s'agréger et flocculer, la suspension est alors déstabilisée (57). Au point isoélectrique, pour lequel le potentiel Zêta est nul (les particules colloïdales ne portent aucune charge nette), le système colloïdal est le moins stable, les particules précipitent car il n'y a pas de forces de répulsion inter-particules en raison de l'absence de charges à leurs surfaces (58). Cependant, selon Muzzarelli, 1997 (59), une « stabilité » trop importante des NPs seraient défavorables à la transfection cellulaire : en effet, une forte charge attractive entre le chitosane et le siRNA pourrait être un frein à la libération de ce dernier dans le cytoplasme cellulaire.

D'après le brevet CA2487564A1 déposé par Fernandes et al pour des NPs acide folique-Chitosane-DNA (60), le potentiel zêta qui conduit à une meilleure interaction sur la surface de la membrane cellulaire (chargées négativement) et qui permet une absorption plus efficace des nanoparticules par les cellules, est un potentiel zêta positif compris entre 3 mV et 20 mV (valeur optimale comprise entre 10 mV et 16 mV.) Cet objectif dans notre étude est atteint par les NPs en suspension dans les milieux FGS et PBS. La charge négative observée dans le milieu FIS s'expliquerait par le fait que le pH de ce milieu est légèrement supérieur au pI des NPs.

Ding et al., 2019 (61) ont étudié les comportements de NPs de chitosane-Caseine (une phosphoprotéine) dans différentes pH: cette étude confirme qu'à pH acide, les molécules de chitosane sont chargées positivement en raison de la protonation des groupements amines primaires. Quand le pH correspondait au pKa du chitosane, ce dernier est devenu insoluble.

Les NPs avec potentiel zéta positif ont une longue demi-vie en circulation en raison de l'absorption des composants protéiques dans le sang, tandis que les NPS avec ZP négatif peuvent être effacés par le système réticuloendothélial. (62)

Notre étude est donc en corrélation avec la littérature, à savoir que le PI des NPs doit probablement se situer entre le pH du FIS et le pH du PBS car c'est entre ces PHs que le potentiel zéta passe de négatif à positif. Cela montre que le pH joue un rôle clé dans le processus de complexation, car il contrôle le degré d'ionisation des groupes ioniques et la force de l'interaction électrostatique entre les particules chargées. C'est un paramètre clé qui conditionne la biodisponibilité des NPs, (qui traversent différents pH physiologiques après administration orale: estomac, intestin, sang, endosome, cytoplasme cellulaire, ...).

3.2. Intégrité Stabilité des NPs dans le temps :

En se basant sur les résultats précédents, le ratio 20 a été retenu pour faire l'objet d'un test de stabilité des nanoparticules dans le temps Ce test a été réalisé par électrophorèse et par la mesure du potentiel zéta.

3.2.1. Analyse de la stabilité par électrophorèse sur gel d'agarose :

Une électrophorèse sur gel d'agarose a été réalisée avec des nanoparticules de chitosane siRNA préparées au ratio 20, après 2h, 1h et 30 min d'incubation dans les différents tampons. Les résultats obtenus sont illustrés dans la **figure 15** ci-dessous :

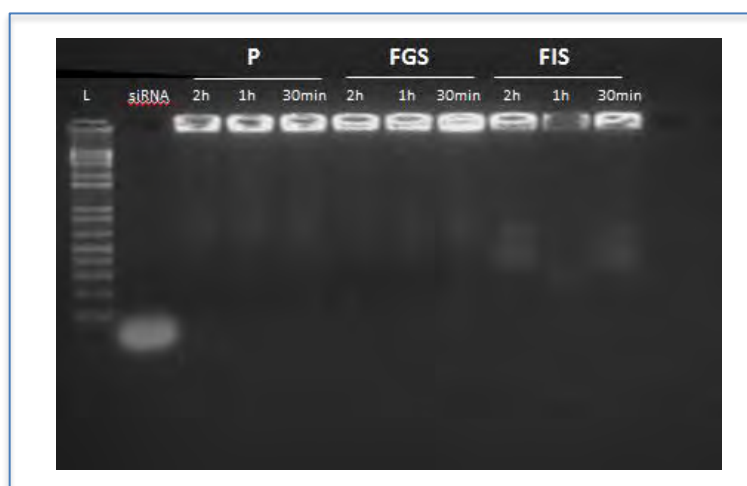


Figure 14: Stabilité des Nanoparticules Chitine-siRNA dans le temps

Electrophorèse sur gel d'agarose des NPs de ratio 20 dans les tampons phosphate, FIS et FGS après 30min, 1h et 2h d'incubation (P : PBS. FIS : fluide intestinal simulé. FGS : Fluide gastrique simulé. L : Ladder ou marqueur de taille)

Les résultats obtenus démontrent bien la stabilité des NPs au ratio 20, donc l'aptitude du chitosane à encapsuler et maintenir le siRNA à l'intérieur de la NP après 2 h d'incubation à température ambiante. Cependant, il est important de noter que pour la totalité des expériences effectuées durant ce travail de recherche, le stock de chitosane ainsi que les nanoparticules sont préparés immédiatement avant leur utilisation.

3.2.2. Taille et potentiel zéta : analyse au fil du temps

Concernant la stabilité de la taille et du potentiel Zêta dans le temps, ces paramètres ont été mesurés afin d'évaluer leurs variations après 2h, 4h et 6h d'incubation dans les différents tampons. Les résultats obtenus sont illustrés dans la **figure 16** ci-dessous :

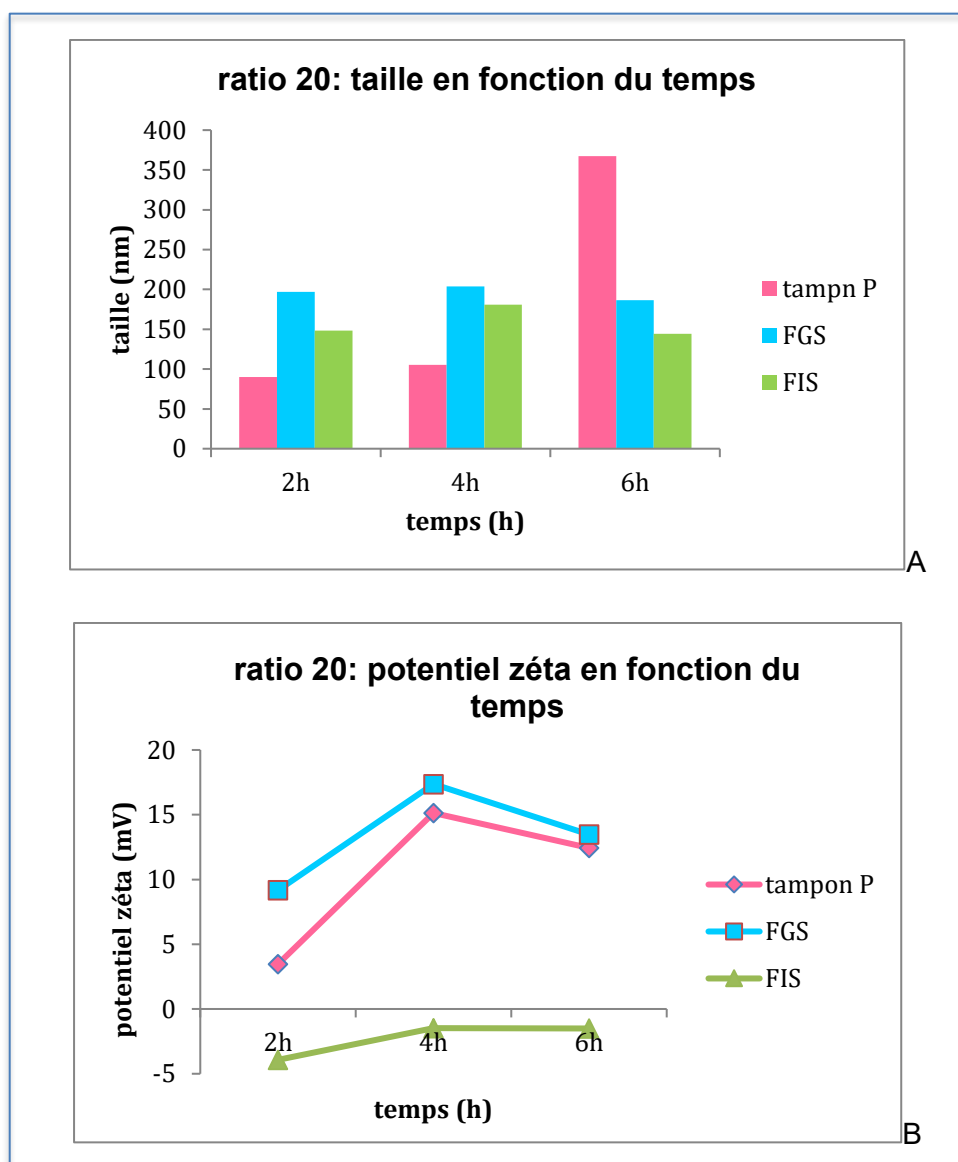


Figure 15 : Stabilité dans le temps des NPs

La taille (A) et le potentiel zéta (B) des NPs de ratio 20 sont analysés dans les tampons P (PBS), FIS et FGS. (FIS : fluide intestinal simulé. FGS : Fluide gastrique simulé)

D'après les résultats obtenus, la taille des NPs dans les tampons FIS et FGS est stable dans le temps après 6 h d'incubation, elle se situe entre 150 et 200 nm. Concernant le tampon phosphate, les NPs mesurent environ 100 nm après 2 h et 4 h d'incubation, par contre après 6 h elles augmentent de taille pour atteindre le seuil de 367 nm. Cela pourrait être la conséquence de l'agrégation des NPs entre 4 h et 6 h d'incubation. Néanmoins, une nanoparticule mesurant 367 nm reste au-dessous du seuil de 500 nm nécessaire pour bénéficier de l'effet EPR et d'une diffusion facilitée au travers des membranes biologiques.

Pour le potentiel Zêta, il faut noter l'absence de relation proportionnelle entre la charge et la taille des NPs. Dans les tampons phosphate et FGS, les nanoparticules sont chargées positivement (entre 5 et 15 mV) contrairement aux NPs dans le FIS qui sont quant à elles chargées négativement (-5-0mV).

Des études ont démontré que la charge optimale pour traverser les membranes biologiques chargées négativement, est une forte charge positive (63). Il est donc envisageable de s'attendre à un mauvais passage des NPs au niveau de la barrière intestinale, ce qui représenterait un réel obstacle pour la biodisponibilité systémique des nanoparticules. Cependant, les conditions de cette expérience ne sont pas parfaitement représentatives de l'environnement biologique intestinale qui est un environnement complexe et dans lequel différentes interactions peuvent être établies et modifier ainsi le comportement des NPs. C'est une question qui sera élucidée en évaluant l'absorption des nanoparticules, préparées dans le tampon FIS *ex vivo*, à travers de la membrane de l'intestin de rat (plus loin).

3.3. Analyse de la toxicité des NPs:

Le chitosane est un polymère issu d'un composé naturel « la chitine », il est connu et apprécié notamment pour ses propriétés de biocompatibilité (54). Afin de confirmer cette propriété fondamentale du chitosane, un test de viabilité cellulaire au MTS a été réalisé sur 2 types cellulaires : les Raw 264.7 et les cellules Caco2, en présence des Nanoparticules préparées dans du tampon phosphate avec différents ratios N/P correspondant à une dose équivalente de 1,25 µg de siRNA. Les résultats du test MTS, sont illustrés dans la **figure 17** ci-après :

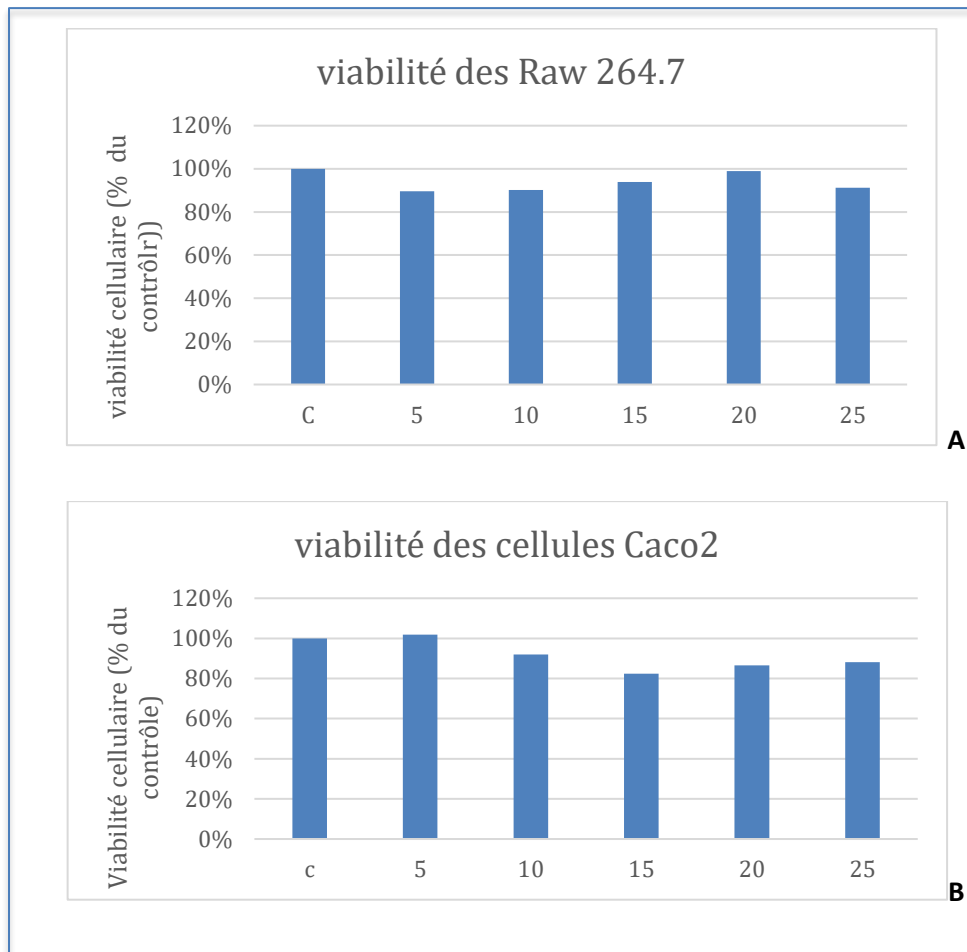


Figure 16: Analyse de la toxicité des NPs à différents ratios

A : Viabilité cellulaire des Raw 264.7 après traitement avec des NPs . **B** : Viabilité cellulaire des Caco2 après traitement avec des NPs à différents ratios. Les NPs ont été préparées dans un tampon PBS. Les résultats correspondent à une expérience (n=1).

Les résultats démontrent plus de 80 % de viabilité cellulaire avec les cellules Caco2 avec les différents ratios utilisés. Des résultats similaires sont aussi observés pour les Raw 264.7. Ces résultats indiquent une faible voire une absence de toxicité liée aux différents ratios de NPs sur les deux types cellulaires. Cependant ces résultats restent à être complétés avec un test d'efficacité des nanoparticules sur ce type cellulaire car effectivement cela pourrait être seulement dû au fait que les cellules n'internalisent pas ou peu les NPs de chitosane siRNA ou bien que les NPs sont internalisées mais n'ont aucun effet thérapeutique. Afin d'interpréter de manière objective ces résultats, il est donc important de compléter cette étude par un test de transfection de ce type cellulaire qui permettra d'évaluer l'efficacité des NPs et de confirmer leur internalisation cellulaire.

3.4. Efficacité des NPs (Transfection *in vitro*) :

Le but de la présente expérience est d'évaluer l'effet des nanoparticules chitosane- siRNA anti-TNF- α à inhiber sélectivement la traduction de l'ARNm codant pour le TNF- α , cytokine proinflammatoire impliquée dans la pathophysiologie de la PR. Afin d'y parvenir, une

transfection des cellules Raw 264.7 a été réalisée. Le taux de TNF- α a été par la suite dosé par ELISA dans le milieu de culture. Dans cette expérience, le ratio 20 des NPs a été sélectionné avec une dose de siRNA équivalente à 5 μ g et plusieurs conditions ont été comparées comme-rapporté dans la **figure 18** ci-dessous.

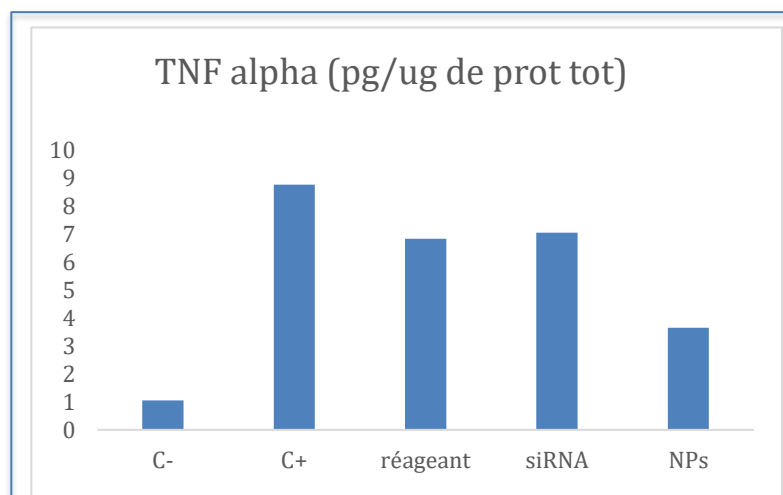


Figure 17: Taux de TNF- α produits par les Raw 264.7 après transfection.

Les cellules Raw 264.7 sont soit non traitées (C-) soit traitées par du LPS utilisé seul comme contrôle positif (C+) ou utilisé avec soit par 100 μ l d'une solution siRNA-TNF alpha-réageant commercial de transfection (réageant) ou par 100 μ l d'une solution de siRNA-TNF alpha correspondant à 5 μ g de siRNA (siRNA), ou 100 μ l de NPs de chitosane-siRNA au ratio 20 avec une dose équivalente à 5 μ g de siRNA(NPs).

Les cellules contrôles (C-), qui n'ont pas été traitées avec les NPs ni stimulées au LPS, produisent un taux basal de TNF- α qui est estimé à 1 pg/ μ g de protéines totales. Il est observé que le réagent de transfection, qui est le vecteur de référence, est aussi efficace que le siRNA seul (sans vecteur) et pour ces 2 conditions le taux de TNF-alpha dosé dans le milieu est de 7 pg/ml, ce qui représente une diminution en moyenne de 20.5% de la production de TNF- α en comparaison avec le contrôle positif (C+ : cellules stimulées au LPS) qui en produit en moyenne 8.87pg/ml. Quand l'intérêt se porte sur le pouvoir d'ARN interférence des NPs, il est observé que les cellules traitées avec les nanoparticules de chitosane-siRNA secrètent 3.8 pg/ml (en moyenne) de TNF- α , c'est-à-dire une diminution en moyenne de 60.1% de la production de TNF- α grâce au NPs en comparaison avec le C+. Ces résultats démontrent clairement le pouvoir anti-inflammatoire des NPs chitosane-siRNA qui est nettement supérieur à celui du siRNA seul voir à celui du Reagent-siRNA.

3.5. Analyse de la biodisponibilité par absorption intestinale :

Une des propriétés conditionnelles afin d'envisager la voie orale comme voie d'administration des NPs est la biodisponibilité des NPs de chitosane-siRNA, c'est à dire leur capacité à atteindre la circulation sanguine et avoir ainsi un effet systémique. Certains travaux de recherche ont démontré l'efficacité des NPs sur des métastases colorectales du foie par voie orale, mais les modifications chimiques effectuées sur le chitosane étaient différentes (64).

Afin d'évaluer la biodisponibilité des NPs, une expérience d'absorption intestinale *ex vivo* des NPs a été réalisée. Effectivement, afin d'atteindre la circulation sanguine, les NPs doivent être capables de traverser la barrière intestinale, cela permettrait au NPs d'atteindre les organes cibles, et dans le cas présent ce sont les articulations qui sont visées afin de traiter l'inflammation due à l'arthrite rhumatoïde. Toutefois si les NPs ne traversent pas la paroi intestinale, un effet local au niveau du tube digestif peut être envisagé pour traiter des maladies inflammatoires digestives.

Après le sacrifice du rats (rat contrôle négatif impliqué dans une autre étude), l'intestin a été récupéré et les sacs intestinaux ont été préparés (**figure 19**), un volume de 200 μ L de NPs en suspension dans du FIS ou du FIS seul a été injecté. 2 types de chitosane ont été utilisés : le chitosane DAEA 15 et le chitosane DAEA 15 péggylé (PEG) pour former les NPs au ratio 20. Du siRNA marqué au FITC avec une dose équivalente à 2 μ g de siRNA a été utilisé. La fluorescence liée au FITC a été mesurée afin de déterminer la concentration du siRNA moyennant une courbe standard. Les résultats obtenus sont illustrés dans la **figure 20**.



Figure 18:images illustrant les sacs intestinaux

Les sacs intestinaux sont incubés dans du milieu de culture DMEM

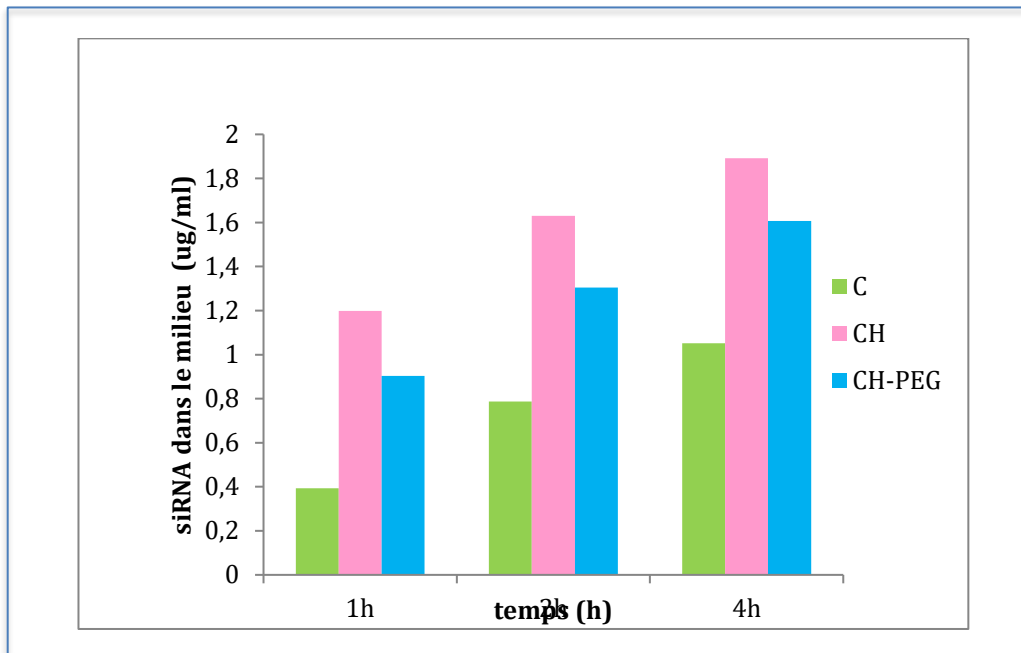


Figure 19: Absorption intestinale ex vivo des NPs

C : contrôle négatif (FIS seul). **CH** : nanoparticule de chitosane-siRNA-FITC. **CH-PEG** : NPs de chitosane-PEG-siRNA-FITC (n=1).

La première observation remarquée est l'augmentation de la fluorescence dans le milieu avec le temps quel que soit la condition de culture, ce qui prouve que le milieu FIS seul contient une fluorescence propre qui répond aux mêmes longueurs d'onde d'excitation et d'émission ~~du~~ que le FITC. L'intensité de fluorescence mesurée est plus importante pour les conditions incubées avec les nanoparticules de chitosane-siRNA en comparaison avec le chitosane-PEG-siRNA. La fluorescence dans ces deux groupes d'incubation avec les NPs restent plus élevé que dans le groupe contrôle. Après soustraction de la valeur correspondant a la fluorescence du contrôle négatif, les valeurs précédentes retombent à 0,8 $\mu\text{g/ml}$ de siRNA dans le milieu après 4 h d'incubation pour les NPs de chitosane siRNA et 0,6 $\mu\text{g/ml}$ pour le chitosane PEG.

Ces résultats sont encourageants pour prévoir une bonne biodisponibilité des NPs par voie orale *in vivo*. Cela dit, ces résultats sont en contradiction par rapport aux travaux de recherche relatées dans la littérature qui prouvent que le PEG associé au chitosane aide à améliorer la stabilité des NPs dans les liquides biologiques et facilite leur passage à travers les muqueuses et l'épithélium intestinal (65).

Les résultats obtenus jusque-là permettent d'avoir une idée sur l'efficacité des NPs sur les cellules immunitaires médiatrices de l'inflammation tel que les macrophages ainsi que sur leur capacité à traverser l'épithélium intestinal. Il reste désormais à évaluer ces propriétés sur un modèle *in vivo* qui rappelons-le, est un modèle plus complexe et où l'influence de l'environnement physiologique au sens large pourrait avoir un impact non négligeable sur ces

résultats en les accentuant ou en les diminuant. Par exemple, le chitosane-PEG pourrait être plus efficace pour traverser l'épithélium intestinal *in vivo* et protéger davantage le siRNA dans la circulation sanguine et leur procurer moins d'immunogénicité. En effet, il a été démontré que le PEG sur les nanoparticules de chitosane ou de liposomes rendait ces nanoparticules plus stable et moins immunogène au sein de la circulation sanguine (65).

3.6. Analyse de la Biodistribution *in vivo* des NPs:

Afin d'évaluer la biodistribution des NPs *in vivo*, des expériences de biodisponibilité et d'efficacité *in vivo* ont été réalisées.

La distribution des nanoparticules *in vivo* a été évaluée sur des souris par suivi en temps réel grâce au système « temps réel Pearl de Licor ». Le but du test est de suivre en temps réel la biodistribution des NPs administrées par voie orale chez la souris grâce à l'utilisation d'une sonde fluorescente Cyanine 5.5 (Cy5. 5).

Une série d'observations dans le temps a été ainsi réalisée à 0h, 2h, 4h, 6h, 18h, 25h,45h et 68h post-gavage, pour 3 groupes de souris, ayant reçu soit une solution siRNA-CY5.5, soit une solution de chitosan-siRNA-Cy5.5 soit une solution de chitosane-PEG-siRNA- Cy5.5. Les animaux ont été anesthésiés avec de l'isoflurane (2-3%) pendant les observations.

Les résultats obtenus sont illustrés ci-dessous (**figures 21 et 22**):

Vue Dorsale :

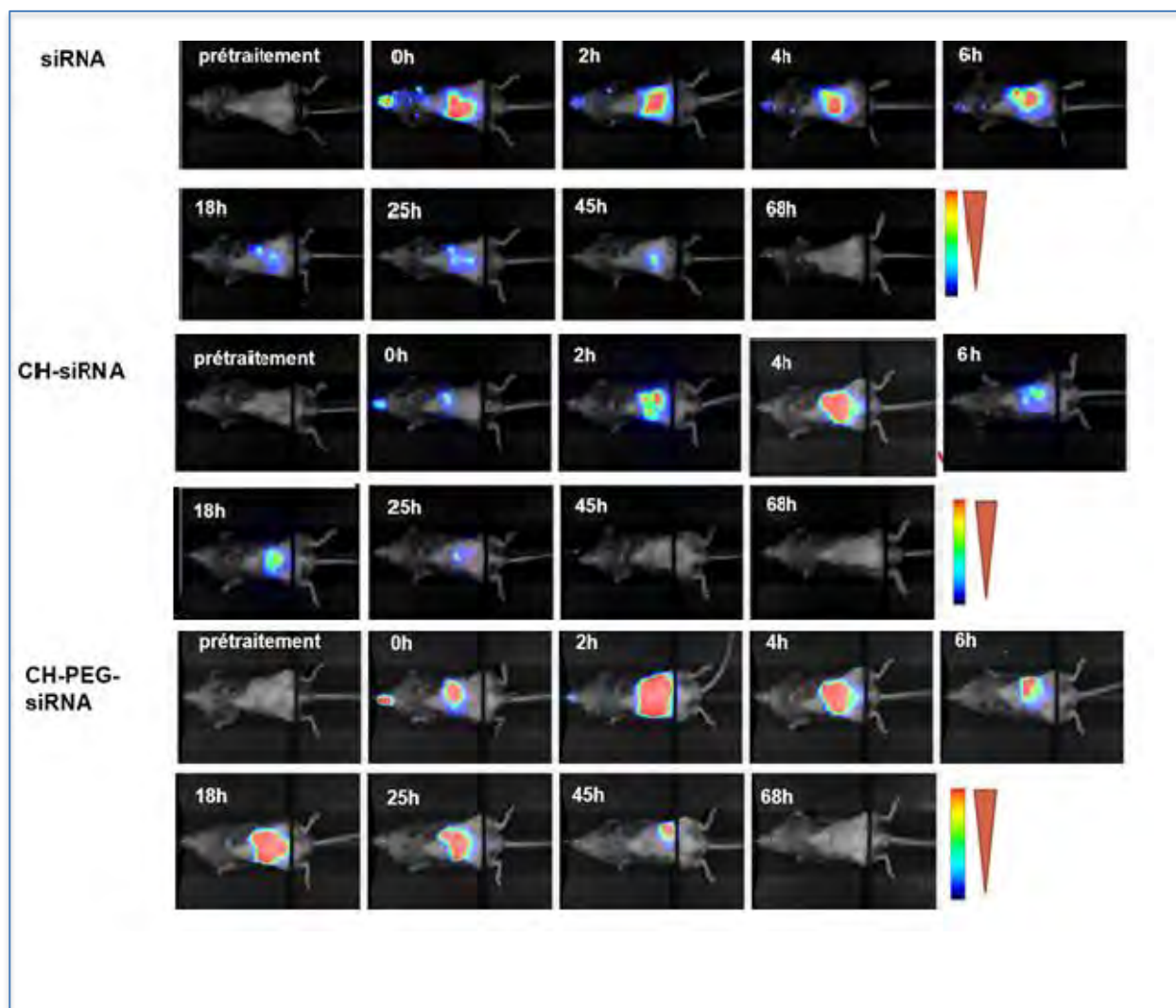


Figure 20: Vue dorsale des résultats de biodistribution in vivo des NPs chez la souris

Afin de réaliser cette expérience, 3 groupes de souris ont été utilisés :

Groupe 1 : 2 souris saines ayant reçu 200 μ l d'une solution siRNA-CY5.5. (**siRNA**)

Groupe 2 : 2 souris saines ayant reçu 200 μ l d'une solution chitosan-siRNA-Cy5.5. (**CH-siRNA**)

Groupe 3 : 2 souris saines ayant reçu 200 μ l d'une solution chitosane-PEG-siRNA- Cy5.5 (**CH-PEG-siRNA**).

Vue ventrale :

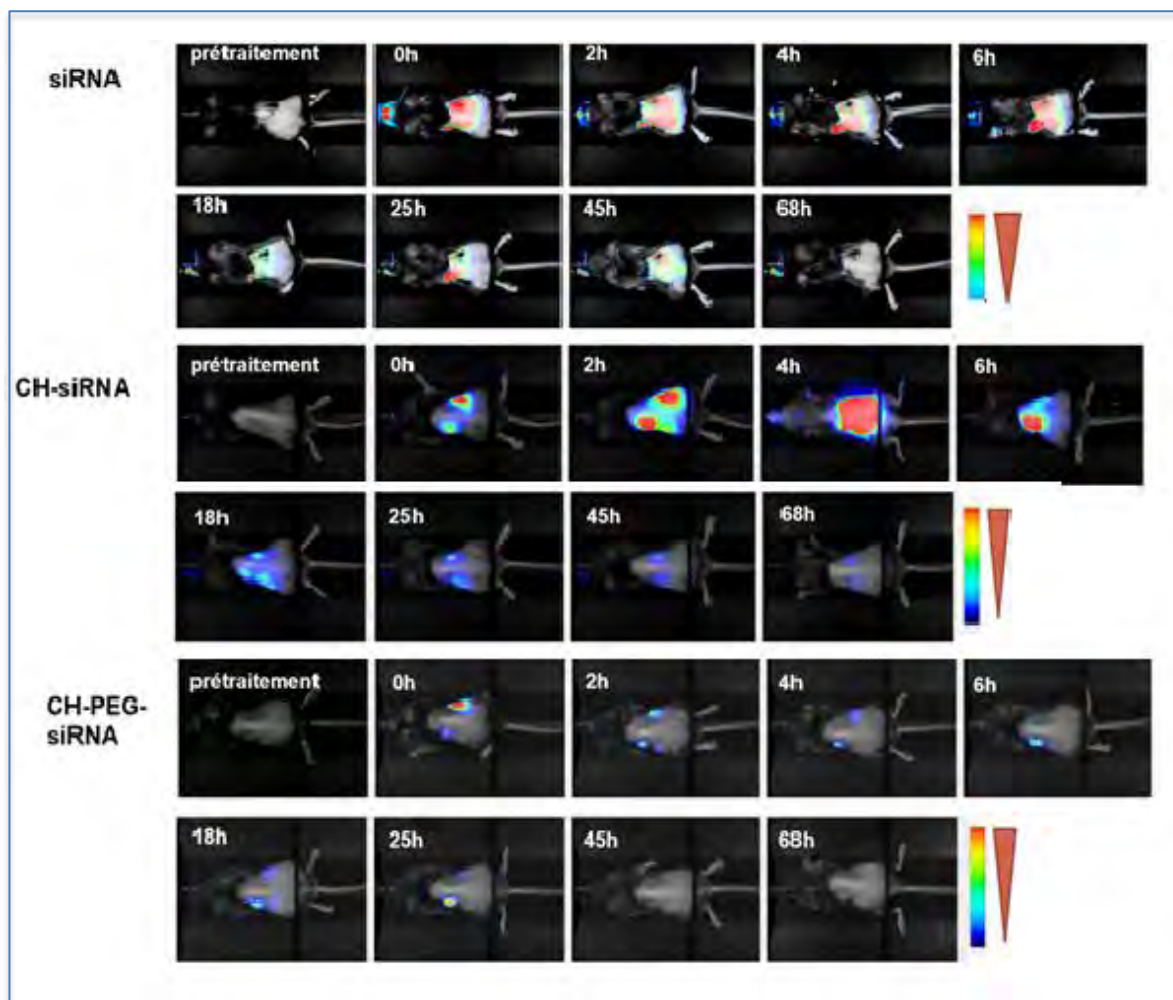


Figure 21: Vue ventrale des résultats de biodistribution in vivo des NPs chez la souris

Afin de réaliser cette expérience, 3 groupes de souris ont été utilisés :

Groupe 1 : 2 souris saines ayant reçu 200 μ l d'une solution siRNA-Cy5.5. (**siRNA**)

Groupe 2 : 2 souris saines ayant reçu 200 μ l d'une solution chitosan-siRNA-Cy5.5. (**CH-siRNA**)

Groupe 3 : 2 souris saines ayant reçu 200 μ l d'une solution chitosane-PEG-siRNA- Cy5.5 (**CH-PEG-siRNA**).

En observant les résultats obtenus, il est difficile de confirmer une différence significative entre les profils de distribution des différentes solutions administrées. Néanmoins, ces résultats démontrent la présence d'une forte fluorescence au niveau abdominal les premières heures après gavage. Cette fluorescence baisse avec le temps jusqu'à atteindre une intensité très faible, voire nulle après 68h.

Ce qui est plutôt surprenant et plutôt inattendu, c'est d'observer de la fluorescence abdominale après 45h chez les souris ayant reçu le siRNA seul quand il est attendu que ce dernier soit dégradé rapidement par des RNases dans l'organisme. L'hypothèse qui peut être donnée, est que le siRNA aurait été dégradé mais le marquage Cys5.5 aurait persisté d'où la fluorescence détectée des heures après l'administration. Afin d'éliminer ce biais, une

administration de Cys5.5 seul et de Chitosane-Cys5.5 seul auraient dû être faite afin d'observer le profil de biodistribution dans le temps et la fluorescence dû à ces composants

Concernant la distribution du CH-PEG-siRNA, il est possible d'observer une fluorescence au niveau abdominal (estomac, intestin et rate) tout au long des observations sans pouvoir distinguer de façon clair un passage intestinal vers d'autres organes).

L'observation la plus intéressante dans cette expérience est sans doute l'observation de fluorescence au niveau des reins chez les souris ayant reçus du CH-siRNA entre 25 et 68h post gavage. Cette observation confirme le passage systémique de ces NPs, que les NP soient peggylées ou non.

Il est nécessaire d'analyser l'efficacité et l'effets anti-inflammatoire de ces NPs *in vivo*. En cas d'effets anti-inflammatoire, il serait possible de confirmer le passage systémique des différentes solutions administrées (siRNA seul ou NPs) et d'ainsi conclure quant à leur dégradation ou non avant d'atteindre les tissus cibles.

3.7. Etude d'efficacité *in-vivo* :

L'effet anti-inflammatoire des NPs de chitosane-siRNA a été évalué *in-vivo* sur des souris DBA1. Les groupes de souris inclus dans cette expérience sont comme suit :

- Groupe 1 : 6 souris saines recevant une solution saline
- Groupe 2 : 6 souris arthritiques recevant une solution saline
- Groupe 3 : 6 souris arthritiques recevant une solution de siRNA-TNF α (75 ug/souris)
- Groupe 4 : 6 souris arthritiques recevant des NPs de DEAE15-chitosane équivalente à 75 ug de siRNA-TNF α /souris
- Groupe 5 : 6 souris arthritiques recevant des NPs de DEAE15-chitosane-PEG équivalente à 75 ug de siRNA-TNF α /souris

Remarque : perte de 2 souris durant l'expérience : 1 souris du groupe 3 a été euthanasié car elle présentait une masse d'environ 2 cm de diamètre au niveau abdominale, 1 souris du groupe 5 est morte suite à une mauvaise exécution de l'administration par gavage.

Tout au long de cette expérience, le poids des souris a été mesuré afin d'évaluer leur état général. En effet, l'inflammation des articulations pourraient induire une difficulté à marcher et à aller se nourrir ou avoir un effet sur l'appétit des souris en le diminuant. Il est aussi important de faire ces pesées car si les souris perdent du poids durant l'expérience et que ce dernier descend au-dessous de 15 g, le protocole éthique exige d'euthanasier la souris. L'épaisseur des pattes postérieur gauche ainsi que le score arthritique ont également été évalués durant cette expérience. Les résultats obtenus sont illustrés dans les **figures 23, 24 et 25** ci-dessous :

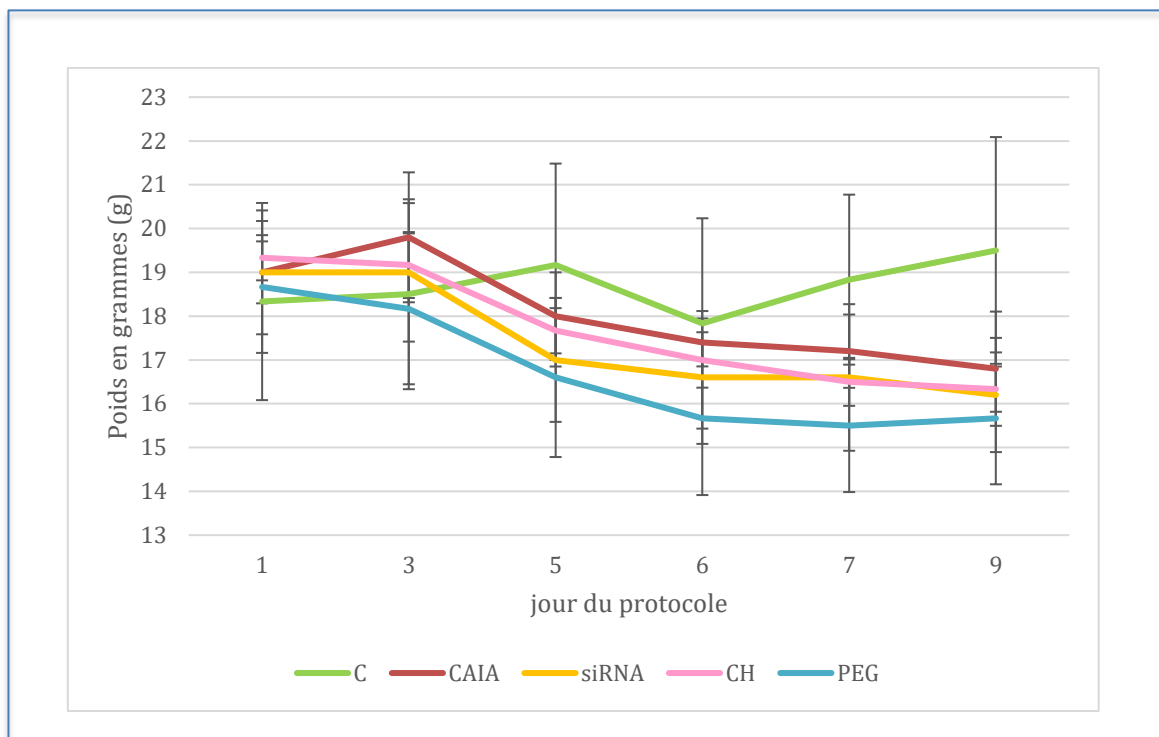


Figure 22: Poids des souris en fonction du temps.

Groupe **C** : 6 souris saines recevant une solution saline (**C** :- Contrôle)

Groupe **CAIA** : 6 souris arthritiques recevant une solution saline (**CAIA** : Collagen-Antibody-Induced Arthritis)

Groupe **siRNA** : 6 souris arthritiques recevant une solution de siRNA-TNF α (75 ug/souris)

Groupe **CH** : 6 souris arthritiques recevant des NPs de DEAE15-chitosane siRNA-TNF α (75ug/souris)

Groupe **PEG** : 6 souris arthritiques recevant des NPs de PEG-DEAE15-chitosane siRNA-TNF α (75ug/souris)

De manière générale, une diminution du poids des souris arthritiques (groupes 2,3,4 et 5) est observée contrairement aux souris contrôles (C) pour lesquelles le poids a augmenté au fil de l'expérience. Cette diminution de poids chez les souris arthritiques est plus prononcée après le 4^{ème} jour (jour de l'introduction du LPS et donc de l'induction de l'inflammation). L'inflammation des pattes et la douleur engendrée par la marche (pour aller manger) ainsi que la probable irritation de la gorge dû au gavage sont sans doute des facteurs qui ont eu un impact sur l'état générale des souris arthritiques.

En moyenne, les souris arthritiques sont passées d'un poids de départ compris entre 18,3-19,3 g à un poids compris entre 15,6-16,3 g au 9^{ème} jour de l'expérience contrairement aux souris contrôles qui ont quant à elle pris du poids : en moyenne elles sont passées d'un poids de 18,3 g au début de l'expérience à 19,5 g au 9^{ème} jour.

Remarque : il est difficile de comparer le poids des souris entre les différents groupes car les poids de départ sont différents.

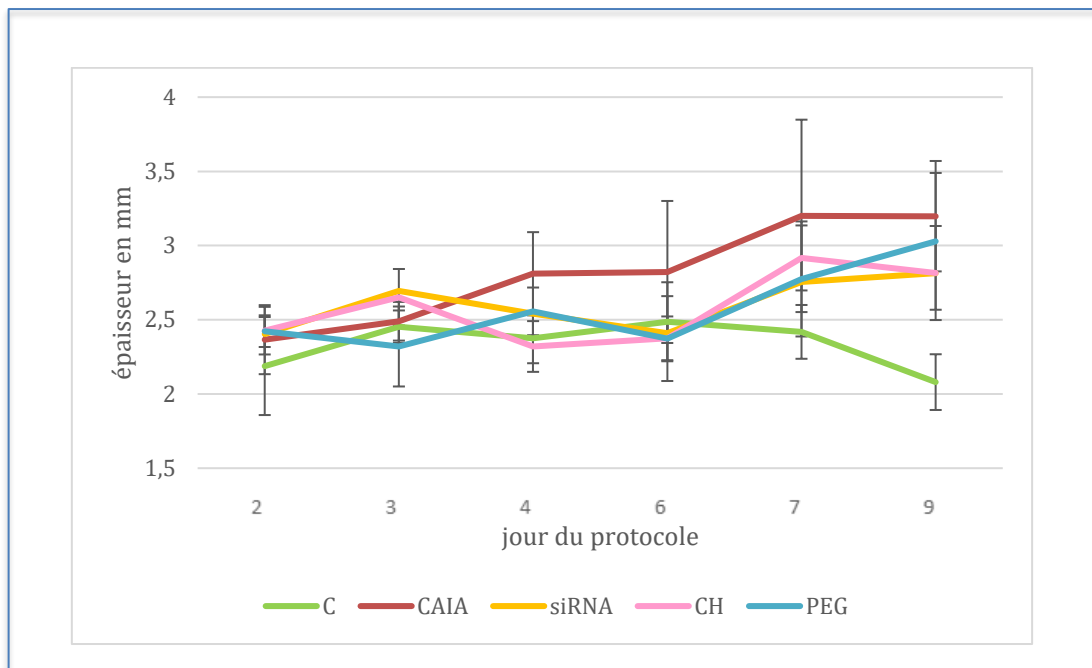


Figure 23: Épaisseur de la patte postérieure gauche des souris en fonction du temps.

Groupe **C** : 6 souris saines recevant une solution saline (**C** :- Contrôle)

Groupe **CAIA** : 6 souris arthritiques recevant une solution saline (**CAIA** : Collagen-Antibody-Induced Arthritis)

Groupe **siRNA** : 6 souris arthritiques recevant une solution de siRNA-TNF α (75 ug/souris)

Groupe **CH** : 6 souris arthritiques recevant des NPs de DEAE15-chitosane siRNA-TNF α (75ug/souris)

Groupe **PEG** : 6 souris arthritiques recevant des NPs de PEG-DEAE15-chitosane siRNA-TNF α (75ug/souris)

La mesure de l'épaisseur de la patte gauche des souris dans les différents groupes est une mesure rendue délicate d'une part à cause de l'outil de mesure (pied à coulisse) et d'autre part par le fait que les souris bougent beaucoup pendant cette opération qui est douloureuse pour elles (inflammation des pattes).

Néanmoins, une tendance générale est observée : une augmentation de l'épaisseur des pattes après le 4^{ème} jour chez les souris arthritiques (groupes 2,3,4 et 5) en comparaison avec les souris saines (C) (**figure 24**). Au 9^{ème} jour, les souris CAIA présentent l'inflammation la plus importante de la patte gauche en comparaison avec les autres groupes. Les souris siRNA, NPs, de CH-siRNA et les souris NPs de CH-PEG-siRNA ont quant à elles une inflammation intermédiaire (épaisseur moyenne se situant entre celle des souris CAIA et C).

Une différence significative, concernant la diminution de l'inflammation, ne peut pas être confirmée entre les souris siRNA CH et CH-PEG.

Cette expérience donne une indication générale quant à l'inflammation articulaire observée chez les souris. Effectivement elles présentent des limites liées au manque de précision de la mesure elle-même mais également au fait que la mesure ne se base que sur la patte gauche des souris et ne prend pas en compte les autres articulations, le degré de rougeur et

d'œdème caractéristiques de l'inflammation. C'est à cet effet que le score arthritique a été évalué chez les différents groupes de souris (**figure 25**)

Le score arthritique se base sur le degré d'inflammation (érythème et œdème) des articulations des 4 membres chez la souris : l'articulation interphalangienne, métacarpo-phalangienne et celle du carpe (ou tarse pour les pattes postérieures) .

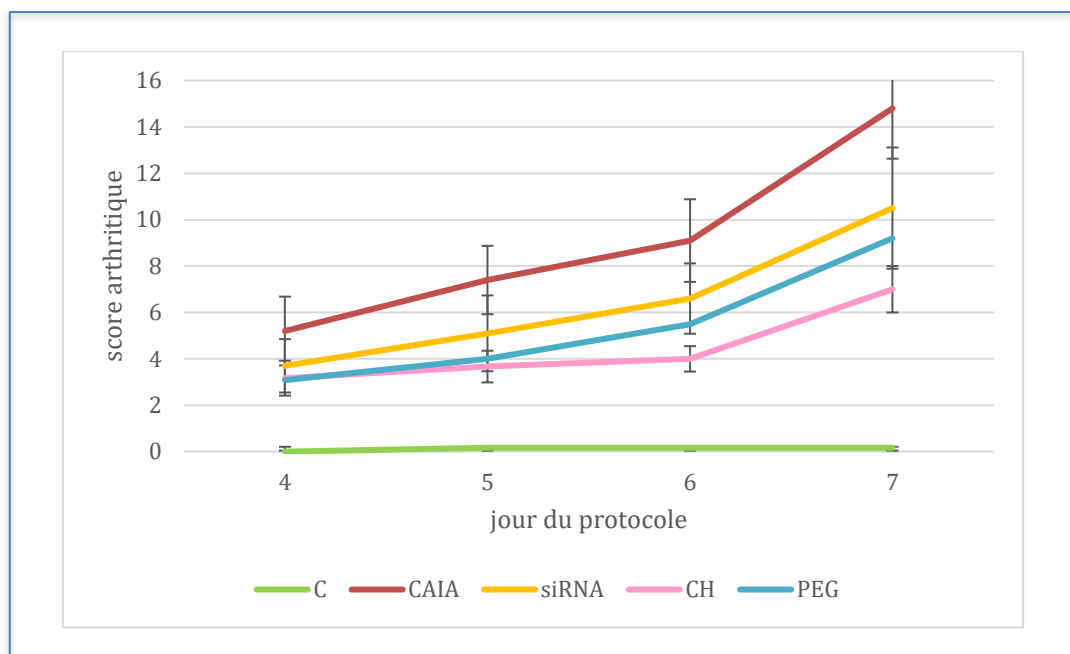


Figure 24:score arthritique des souris en fonction du temps.

Groupe **C** : 6 souris saines recevant une solution saline (**C** :- Contrôle)

Groupe **CAIA** : 6 souris arthritiques recevant une solution saline (**CAIA** : Collagen-Antibody-Induced Arthritis)

Groupe **siRNA** : 6 souris arthritiques recevant une solution de siRNA-TNF α (75 ug/souris)

Groupe **CH** : 6 souris arthritiques recevant des NPs de DEAE15-chitosane siRNA-TNF α (75ug/souris)

Groupe **PEG** : 6 souris arthritiques recevant des NPs de PEG-DEAE15-chitosane siRNA-TNF α (75ug/souris)

Le score arthritique a été évalué à l'aide d'un indice clinique de 4 points pour chaque patte, basé sur les signes macroscopiques (0 = aucune preuve d'inflammation, 1 = inflammation (enflure et/ou rougeur) dans une articulation, 2 = inflammation dans deux articulations, 3 = inflammation dans plus de deux articulations, et 4 = arthrite grave de l'ensemble de la patte et des articulations) pour un score total de 0 à 16 pour les quatre pattes

Le score arthritique a été évalué chez les souris des 5 groupes. Pour rappel l'inflammation a été induite au jour 4 pour atteindre son maximum au jour 7.

Les souris CAIA (groupe2) présentent une inflammation progressive des articulations, caractérisée par des rougeurs et des œdèmes (**figure 26**) et ont atteint un score arthritique de 14,8 au 7eme jour (**figure 25**). Le score arthritique des souris traitées avec les NPS : groupe 4 et 5 présentent quant à elles un score arthritique moyen de 7 et 9,2 respectivement, score inférieur à celui des souris CAIA et siRNA qui ont un score arthritique moyen de 14,8 et 10,5 respectivement au 7eme jour.

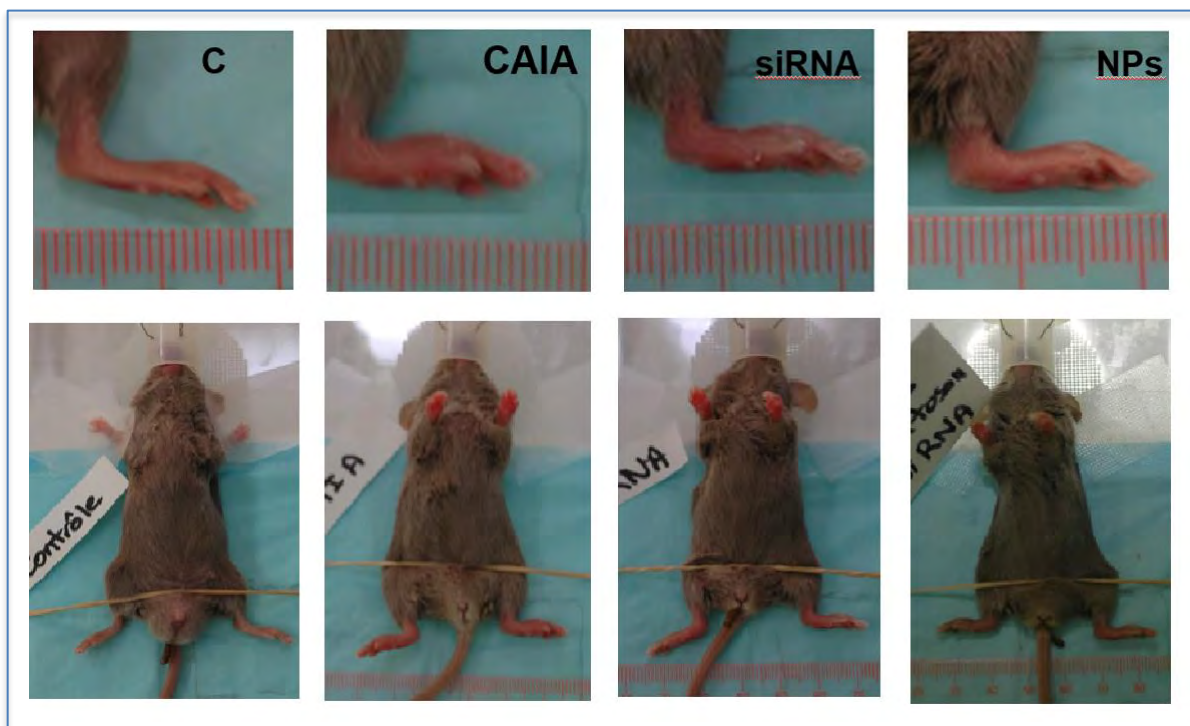


Figure 25:Pattes de souris au jour 10.

Groupe **C** : 6 souris saines recevant une solution saline (**C**:- Contrôle)

Groupe **CAIA** : 6 souris arthritiques recevant une solution saline (**CAIA** : Collagen-Antibody-Induced Arthritis)

Groupe **siRNA** : 6 souris arthritiques recevant une solution de siRNA-TNF α (75 ug/souris)

Groupe **CH** : 6 souris arthritiques recevant des NPs de DEAE15-chitosane siRNA-TNF α (75ug/souris)

Groupe **PEG** : 6 souris arthritiques recevant des NPs de PEG-DEAE15-chitosane siRNA-TNF α (75ug/souris)

Remarque : absence de photos pour le groupe PEG-CH-siRNA dû à un incident technique avec l'appareil photo.

Ces résultats sont prometteurs quant au potentiel thérapeutique des NPs de chitosane-siRNA (TNF-alpha), administrées par voie orale à des souris arthritiques.

Depuis Shi et al., 2018, a confirmé l'efficacité des NPS par voie IP : une amélioration de la synovite, de l'érosion osseuse et de la destruction du cartilage chez les souris CAIA a été observée avec des NPs Folate-PEG-CH-DEAE15/siRNA-TNF α . une réduction des concentrations sériques de marqueur de l'activité des ostéoclastes (résorption osseuse) a été observés chez les souris traitées avec les NPs par rapport aux souris arthritiques. L'amélioration des résultats des paramètres osseux par les NPs de folate-CH a été soutenue par une diminution des scores d'érosion osseuse et des marqueurs du métabolisme osseux (66).

III. Conclusion :

La Polyarthrite Rhumatoïde est la maladie auto-immune qui a bénéficié des plus importants progrès au cours de ces dernières années. Les avancés concernant le diagnostic ainsi que la disponibilité d'un éventail thérapeutique ont permis de trouver « chaussure à chaque pied » facilitant ainsi l'atteinte de la rémission clinique, ou à défaut d'obtenir un faible niveau d'activité de la maladie. Les principes qui accompagnent cet objectif tels que traiter tôt avec un traitement efficace optimisé et traiter avec un contrôle étroit pour adapter au plus tôt la stratégie sont maintenant appliqués en pratique courante. Les manifestations sévères, fréquentes auparavant, existent toujours mais sont devenues plus rares. La PR est toujours une maladie qui diminue l'espérance de vie, mais la mortalité liée à la maladie serait en train de s'améliorer, notamment par une moindre survenue de complications systémiques liées à la PR. Cela a été rendu possible notamment grâce au dépistage et de la prise en charge des comorbidités associées à la PR. Comme c'est le cas dans les maladies chroniques, la PR s'inscrit dans le domaine de la prévention de la destruction articulaire et du handicap, mais aussi du dépistage systématique des patients à risque de développer des comorbidités cardiovasculaires, métaboliques, respiratoires, osseuses ou encore infectieuses.

Cette étude préliminaire sur la thématique des NPs de chitosane-siRNA TNF alpha dans la thérapie génique de la PR par voie orale présente des résultats encourageants. En effet, elle a démontré la stabilité des NPs de chitosane siRNA dans différents milieux et à différents pH, leur non-toxicité cellulaire ainsi que leur efficacité à la fois *in vitro* et *in vivo*.

La thérapie génique à base de NPs de chitosane-siRNA pour le silencing du TNF alpha est une approche prometteuse pour le traitement de la PR par voie orale et pourrait potentiellement substituer certaines thérapies disponibles actuellement sur le marché qui sont plus invasives et plus coûteuses. Cette étude a pu également démontrer que cette technique pouvait être élargie à d'autres pathologies inflammatoires, digestives par exemple, pour un effet plus local.

Cependant, des études plus approfondies sont nécessaires pour compléter ce travail préliminaire en répétant les expériences *in vitro* et *ex vivo* (n=3) pour leur donner plus de significativité, évaluer l'adsorption des NPs aux protéines du sang et les caractériser au pH sanguin, utiliser une méthode reconnue pour évaluer le passage intestinale (chambre de Ussing par exemple), et puis compléter ce travail par des études sur la toxicité des NPs *in vivo*, de faire une étude pharmacocinétique afin d'estimer le temps de demi-vie, la clairance, la biodisponibilité ainsi que la dose efficace optimale des NPs.

Depuis d'autres études ont été effectuées et leurs résultats semblent prometteurs quant à l'efficacité et l'innocuité des NPs de chitosane siRNA. Rondon et al., 2020, s'est penché sur la

toxicité des NPS et a démontré que les nanoparticules de DEAE12-CH-PEG-FA2/siRNA sont hémocompatibles grâce à leur faible caractère hémolytique, bas niveau d'agrégation plaquettaire et l'absence d'effet sur le système du complément et le système de coagulation. Leur niveau d'innocuité a également été confirmé par la faible réponse oxydative et la non-production des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-6 (67).

D'autres études, utilisant le chitosane comme vecteur, se sont penchées sur des applications locales comme l'étude portant sur la biocompatibilité des nanogels à base de chitosane comme plateformes d'administration de médicaments pour les applications ostéoarticulaire. Des résultats encourageants et prometteurs pour l'administration intra-articulaire de médicaments ou d'agents diagnostiques pour les pathologies articulaires ont été obtenues (68). Ainsi d'autres voies d'administrations et d'autres formes galéniques peuvent être envisagées pour les nanoparticules de chitosane siRNA faisant de ces dernières un outils thérapeutique flexible aux perspectives prometteuses.

Références bibliographiques :

1. Pillon, F., & Michiels, Y. (2013). Épidémiologie et physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. *Actualités Pharmaceutiques*, 52(531), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2013.09.018>
2. Polyarthrite rhumatoïde. (2017, May 1). Inserm - La science pour la santé. <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/polyarthrite-rhumatoide>
3. Aletaha, D. (2018, October 2). Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. *Rheumatoid Arthritis | JAMA | JAMA Network*. <https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/2705192>
4. Roudier, J., Massy, E., & Balandraud, N. (2018). Intérêt du génotypage HLA-A, B, C, DR dans le diagnostic d'un rhumatisme inflammatoire. *Revue Du Rhumatisme*, 85(6), 521–523. <https://doi.org/10.1016/j.rhum.2018.02.004>
5. B.Combe, C.Lukas, J.Morel (2015, Juillet). Polyarthrite rhumatoïde de l'adulte : épidémiologie, clinique et diagnostic- EMC-appareil locomoteur-volume 10 > n°3 >
6. Minichiello, E., Semerano, L., & Boissier, M. C. (2017). Incidence, prévalence et sévérité de la polyarthrite rhumatoïde au XXI e siècle. *Revue Du Rhumatisme Monographies*, 84(4), 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.monrhu.2017.07.002>
7. C. (2018). Chapitre 11 : Polyarthrite rhumatoïde. *Immunopathologie: Réussir les ECNi (les référentiels des collèges) (French Edition) (2nd ed.)* (p.153-167). Elsevier MASSON.
8. Biver, E., Beague, V., Verloop, D., Mollet, D., Lajugie, D., Baudens, G., Neirinck, P., & Flipo, R. M. (2009b). Une prévalence faible et stable de la polyarthrite rhumatoïde dans le Nord–Pas-de-Calais, une singularité régionale en France et en Europe ? *Revue Du Rhumatisme*, 76(9), 869–872. <https://doi.org/10.1016/j.rhum.2008.11.017>
9. C. (2020) chapitre 17 : Polyarthrite rhumatoïde. *Rhumathologie :College rhumatologie 7° edition*. (2020). (p.247-275) - ELSEVIER-MASSON
10. Schaefferbeke, T., Truchetet, M. L., & Richez, C. (2012). Où et quand commence la polyarthrite rhumatoïde ? *Revue Du Rhumatisme*, 79, A13–A17. [https://doi.org/10.1016/s1169-8330\(12\)70055-8](https://doi.org/10.1016/s1169-8330(12)70055-8).
11. N. (2014). Facteurs de risque pour le développement d'une polyarthrite rhumatoïde. *Revue Médicale Suisse*. <https://www.revmed.ch/RMS/2014/RMS-N-421/Facteurs-de-risque-pour-le-developpement-d-une-polyarthrite-rhumatoide>
12. COFER, Collège Français des Enseignants en Rhumatologie- © Université Médicale Virtuelle Francophone Item 121 : Polyarthrite rhumatoïde <http://campus.cerimes.fr/rhumatologie/enseignement/rhumato16/site/html/cours.pdf>
13. Nielen, M. M. J., van Schaardenburg, D., Reesink, H. W., van de Stadt, R. J., van der Horst-Bruinsma, I. E., de Koning, M. H. M. T., Habibuw, M. R., Vandenbroucke, J. P., & Dijkmans, B. A. C. (2004). Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: A study of serial

- measurements in blood donors. *Arthritis & Rheumatism*, 50(2), 380–386.
<https://doi.org/10.1002/art.20018>
14. Dumontet, E., & Bigot-Corbel, E. (2012). Physiopathologie de l'atteinte osseuse et articulaire dans la polyarthrite rhumatoïde. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2012(446), 65–72.
[https://doi.org/10.1016/s1773-035x\(12\)71738-0](https://doi.org/10.1016/s1773-035x(12)71738-0)
 15. ((s. d.). Eurofins Biomnis – Biologie MédiOcale Spécialisée. https://www.eurofins-biomnis.com/referentiel/liendoc/precis/FACTEURS_RHUMATOIDES.pdf
 16. Morel, J., Miossec, P., & Combe, B. (2006). Immunopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. *EMC - Appareil Locomoteur*, 1(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/s0246-0521\(04\)35153-3](https://doi.org/10.1016/s0246-0521(04)35153-3)
 17. (s. d.). CRI-net.com - Club Rhumatismes et Inflammations. http://www.cri-net.com/ckfinder/userfiles/files/formation/fichesImmuno/Chap_8.pdf
 18. Michaël Touba. La polyarthrite rhumatoïde : traitements immunomodulateurs et stratégies vaccinales associées. *Sciences pharmaceutiques*. 2015. ffhal-01734346f
 19. Combe, B. (2007). Polyarthrite rhumatoïde : clinique et diagnostic. *EMC - Appareil Locomoteur*, 2(3), 1–15. [https://doi.org/10.1016/s0246-0521\(07\)43710-x](https://doi.org/10.1016/s0246-0521(07)43710-x)
 20. Steinbach, T. (2021, 20 septembre). Bronchectasies - Troubles pulmonaires - Édition professionnelle du Manuel MSD. Édition professionnelle du Manuel MSD. <https://www.msmanuals.com/fr/professional/troubles-pulmonaires/bronchectasies-et-atélectasies/bronchectasies>
 21. Aletaha, D., & Smolen, J. S. (2018). Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis. *JAMA*, 320(13), 1360. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.13103>
 22. T. (2017, February 14). Chapitre 18 Item 192 – UE 7 – Polyarthrite rhumatoïde I Polyarthrite. *dokumen.tips*. <https://dokumen.tips/documents/chapitre-18-item-192-ue-7-polyarthrite-rhumatoide-i-polyarthrite-.html>
 23. Belon, J., Faure, S., Pillon, F., & Besson, L. (2013). Polyarthrite rhumatoïde. *Pathologies et thérapeutiques commentées : Enseignements spécifiques, intégrés et formation d'application (Les cours de L2-M2 Pharma) (French Edition)*. Elsevier Masson.
 24. Boutry, N., Flipo, R. M., & Cotten, A. (2008). Polyarthrite rhumatoïde de l'adulte. *EMC - Radiologie et Imagerie Médicale - Musculosquelettique - Neurologique - Maxillofaciale*, 3(3), 1–19.
[https://doi.org/10.1016/s1879-8551\(08\)70809-1](https://doi.org/10.1016/s1879-8551(08)70809-1)
 25. Michaël Touba. La polyarthrite rhumatoïde : traitements immunomodulateurs et stratégies vaccinales associées. *Sciences pharmaceutiques*. 2015. ffhal-01734346f
 26. D. Wendling Service de Rhumatologie CHU Besançon (2014). Pied et Polyarthrite Rhumatoïde - https://streamingcanalu.fmsh.fr/vod/media/canalu/documents/cutms/diu.de.podologie.2014.pied.et.polyarthrite.rhumato.de_20146/9.wendling.pied.et.polyarthrite.rhumato.de.pdf

27. Bontoux, D., Debais, F., & Azaïs, I. (2014). Rhumatologie (LE LIVRE DE L'!) (2e éd.)(à partir de p287). LAVOISIER MSP.
28. CHU Toulouse (2004). Polyarthrite rhumatoïde. Support de cours DCEM2-
<https://lab25.pagesperso-orange.fr/FT/chutoulouse/par2.pdf>
29. OLUMIANT désormais pris en charge dans la dermatite atopique. (2021). VIDAL.
<https://www.vidal.fr/maladies/recommandations/polyarthrite-rhumatoide-1481.html#prise-en-charge>
30. Combe, B. (2007). Polyarthrite rhumatoïde : clinique et diagnostic. EMC - Appareil locomoteur, 2(3), 1-15. [https://doi.org/10.1016/s0246-0521\(07\)43710-x](https://doi.org/10.1016/s0246-0521(07)43710-x)
31. ITEM_58_POLYARTHRITE_RHUMATOIDE(2019)<https://www.medecinesfax.org/useruploads/files/58%20polyarthrite%20rhumatoide.pdf>
32. Wilfried Gerhard. La polyarthrite rhumatoïde de l'adulte : stratégies thérapeutiques et concept du patient-expert. Sciences pharmaceutiques. 2014. ffhal-01732795f
33. OLUMIANT désormais pris en charge dans la dermatite atopique. (2021). VIDAL.
<https://www.vidal.fr/maladies/recommandations/polyarthrite-rhumatoide-1481.html#prise-en-charge>
34. Le Loët, X., Goëb, V., & Lequerré, T. (2006). Polyarthrite rhumatoïde. EMC - Traité de Médecine AKOS, 1(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/s1634-6939\(06\)39642-1](https://doi.org/10.1016/s1634-6939(06)39642-1)
35. Benfreha Asmaa, Polyarthrite rhumatoïde : de la physiopathologie à la thérapie, thèse d'exercice, Limoges, Université de Limoges, 2018. Disponible sur <http://aurore.unilim.fr/ori-oai-search/notice/view/unilim-ori-103138>
36. Carli, P., Landais, C., Aletti, M., Cournac, J. M., Poisnel, E., & Paris, J. F. (2009). Traitement actuel de la polyarthrite rhumatoïde. La Revue de Médecine Interne, 30(12), 1067–1079. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2009.08.002>
37. METOJECT en stylo prérempli : prise en charge étendue à la maladie de Crohn. (2018). VIDAL.
<https://www.vidal.fr/medicaments/substances/methotrexate-2347.html>
38. Résumé des caractéristiques du produit - METHOTREXATE TEVA 10 POUR CENT (5 g/50 mL), solution injectable - Base de données publique des médicaments. (2021). BASE DE DONNÉES PUBLIQUE DES MÉDICAMENTS. <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=61153021&typedoc=R>
39. C. (2021). sulfasalazine - CISMef. Catalogue et index des sites médicaux de langue française. <https://www.cismef.org/page/sulfasalazine>
40. Maghraoui, E. (2013). Les traitements symptomatiques et de fond classiques de la polyarthrite rhumatoïde. [rhumato.info](http://www.rhumato.info). <http://www.rhumato.info/cours-revues2/115-polyarthrite-rhumatoide/1880-les-traitements-symptomatiques-et-de-fond-classiques-de-la-polyarthrite->

rhumatoïde#: %7E: text=La%20sulfasalazine%20(SZP)%20pourrait%20agir, diminution%20du%20c
himiotactisme%20des%20polynucl%C3%A9aires

41. PR de l'adulte: conception actuelle- Polyarthrite rhumatoïde de l'adulte: conception actuelle - Jacques Sany - Google Livres
42. Champs, F. O. (2014, mars). L'impact socio-économique des biothérapies dans la polyarthrite rhumatoïde. <https://dune.univ-angers.fr/fichiers/20040309/2014PPHA1701/fichier/1701F.pdf>
43. Laurent, C. (2019). Anti-TNF alpha. COLLÈGE NATIONAL DE PHARMACOLOGIE MÉDICALE. <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/anti-tnf-alpha>
44. Paitraud, D. (2018, 4 octobre). Annulation de l'AMM de PRODINAN au 22 avril 2021 : arrêt des prescriptions et délivrances. VIDAL. <https://www.vidal.fr/actualites/22886-polyarthrite-rhumatoïde-kevzara-sarilumab-nouvel-inhibiteur-des-recepteurs-d-il6.html>
45. Combe, B. (2006). Polyarthrite rhumatoïde de l'adulte : traitement. EMC - Appareil Locomoteur, 1(2), 1–23. [https://doi.org/10.1016/s0246-0521\(06\)35154-6](https://doi.org/10.1016/s0246-0521(06)35154-6)
46. Kim, J., Chun, K., McGowan, J., Zhang, Y., Czernik, P. J., Mell, B., Joe, B., Chattopadhyay, S., Holoshitz, J., & Chakravarti, R. (2021). 14-3-3ζ: A suppressor of inflammatory arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(34), Article e2025257118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025257118>
47. faculté de médecine, Université Paul Sabatier. La polyarthrite rhumatoïde. Toulouse. France, 2004. <http://www.medecine.ups-tlse.fr/DCEM2/module8/item121/pdf/item121.pdf>
48. bibliomer. Chitine et chitosan. ifremer, 2010. http://bibliomer.ifremer.fr/documents/fiches/Chitine_et_chitosan_vf.pdf
49. Alameh, M. (2018, 8 janvier). siRNA Delivery with Chitosan : Influence of Chitosan Molecular Weight, Degree of Deacetylation, and Amine to Phosphate Ratio on in Vitro Silencing Efficiency, Hemocompatibility, Biodistribution, and in Vivo Efficacy. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29211954/>.
50. Duncan, G. A., Jung, J., Hanes, J., & Suk, J. S. (2016). The Mucus Barrier to Inhaled Gene Therapy. *Molecular Therapy*, 24(12), 2043-2053. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.182>
51. Shi, Q. (2018, 12 janvier). In vivo therapeutic efficacy of TNFα silencing by folate-PEG-chitosan-DEAE/siRNA nanoparticles in arthritic mice. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29391796/>
52. Howard, K. A., Paludan, S. R., Behlke, M. A., Besenbacher, F., Deleuran, B., & Kjems, J. (2009). Chitosan/siRNA Nanoparticle-mediated TNF-α Knockdown in Peritoneal Macrophages for Anti-inflammatory Treatment in a Murine Arthritis Model. *Molecular Therapy*, 17(1), 162–168. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.220> Shi et al 2012

53. Shi, Q., Fernandes, J., Winnik, F., Benderdour, M., Zhang, Qiu & Dai. (2012). Low molecular weight chitosan conjugated with folate for siRNA delivery in vitro : optimization studies. *International Journal of Nanomedicine*, 5833. <https://doi.org/10.2147/ijn.s35567>
54. NANOTECHNOLOGIES NANOPARTICULES : QUELS DANGERS, QUELS RISQUES. COMITÉ DE LA PRÉVENTION ET DE LA PRÉCAUTION. ministere de l'échologie et du developpement durable. France, 2006. <http://www.ladocumentationfrancaise.fr/var/storage/rapports-publics/074000286.pdf>
55. Eric Houdeau. Nanoparticules et barrière intestinale : comprendre les mécanismes de franchissement. *Innovations Agronomiques*, INRAE, 2012, 24, pp.105-112. fffhal-02644520f
56. Iranpur Mobarakeh, V., Modarressi, M. H., Rahimi, P., Bolhassani, A., Arefian, E., Atyabi, F., & Vahabpour, R. (2019). Optimization of chitosan nanoparticles as an anti-HIV siRNA delivery vehicle. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.036>
57. Ivan T. Lucas. Reactivity of nanoparticles at charged interfaces:Electronic transfer in colloidal suspension and electrokinetic phenomena at the nanometric scale.. Other. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007. English. ffNNT : ff. fftel-00200446f
58. Patil, S., Sandberg, A., Heckert, E., Self, W., & Seal, S. (2007). Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials*, 28(31), 4600–4607. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.029>
59. Muzzarelli, R. A. A. (1997). Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53(2), 131–140. <https://doi.org/10.1007/pl00000584>
60. fernandes, j. (s. d.). Folic acid-chitosan-dna nanoparticles (Brevet).
61. Ding, L., Huang, Y., Cai, X., & Wang, S. (2019). Impact of pH, ionic strength and chitosan charge density on chitosan/casein complexation and phase behavior. *Carbohydrate Polymers*, 208, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.015>
62. Lipid-Based Nanoparticles for Drug Delivery Systems. (s. d.) - Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery. (2019). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/c2017-0-00272-0>
63. Sarah Triboulet. Etude des effets de deux types de nanoparticules métalliques sur des macrophages murins par une approche protéomique. *Sciences agricoles*. Université de Grenoble, 2013. Français. ffNNT : 2013GRENV021ff. fftel-01124157f
64. Rodrigues, S., Dionísio, M., López, C. R., & Grenha, A. (2012). Biocompatibility of Chitosan Carriers with Application in Drug Delivery. *Journal of Functional Biomaterials*, 3(3), 615-641. <https://doi.org/10.3390/jfb3030615>

65. Prego, C., Torres, D., Fernandez-Megia, E., Novoa-Carballal, R., Quiñoá, E., & Alonso, M. J. (2006). Chitosan–PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery. *Journal of Controlled Release*, 111(3), 299–308. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.12.015>
66. Shi, Q., Rondon-Cavanzo, E.-P., Dalla Picola, I. P., Tiera, M. J., Zhang, X., Dai, K., Benabdoune, H. A., Benderdour, M., & Fernandes, J. C. (2018). In vivo therapeutic efficacy of TNF α ; silencing by folate-PEG-chitosan-DEAE/siRNA nanoparticles in arthritic mice. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 13, 387–402. <https://doi.org/10.2147/ijn.s146942>.
67. Rondon, E. P., Benabdoun, H. A., Vallières, F., Segalla Petrônio, M., Tiera, M. J., Benderdour, M., & Fernandes, J. C. (2020). Evidence Supporting the Safety of Pegylated Diethylaminoethyl-Chitosan Polymer as a Nanovector for Gene Therapy Applications. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 15, 6183–6200. <https://doi.org/10.2147/ijn.s252397>.
68. Manivong, S., Garcia Ac, A., Patten, S. A., Fernandes, J. C., Benderdour, M., Banquy, X., Moldovan, F., & Roullin, V. G. (2022). Chitosan-Based Nanogels : Synthesis and Toxicity Profile for Drug Delivery to Articular Joints. *Nanomaterials*, 12(8), 1337. <https://doi.org/10.3390/nano12081337>

Titre et résumé en Anglais

Nanoparticles of chitosan siRNA anti-TNF alpha for gene therapy of rheumatoid arthritis by oral administration

Rheumatoid arthritis is the autoimmune disease that has benefited from the most significant advances in recent years, whether in the areas of pathophysiology, diagnosis or therapeutics. Together, these elements have significantly improved the management and prognosis of rheumatoid arthritis, to the point that rheumatoid arthritis is now considered by some to be a benign disease. Research and development of innovative therapies continues to advance. Among this research, a preliminary study of gene therapy based on chitosan-siRNA nanoparticles directed against TNF-alpha which represents a promising approach with encouraging results in terms of their non-toxicity, oral bioavailability and efficacy both *in vitro* and *in vivo*.

Nanoparticules de chitosane siRNA anti-TNF alpha dans la thérapie génique par voie orale de la polyarthrite rhumatoïde.

Présentée et soutenue publiquement par LYDIA OUYAHIA
Le 10 mai 2023 à Toulouse

RESUME en français

La polyarthrite rhumatoïde est la maladie auto-immune qui a bénéficié des plus importants progrès au cours de ces dernières années, que ce soit dans les domaines de la physiopathologie, du diagnostic ou des thérapeutiques. Ces éléments réunis ont permis d'en améliorer considérablement la prise en charge et le pronostic, à tel point que la polyarthrite rhumatoïde est maintenant considérée, par certains, comme une pathologie plutôt bénigne. La recherche et le développement de thérapies innovantes continue de progresser. Parmi ces travaux de recherche, une étude préliminaire de thérapie génique à base de nanoparticules de chitosane-siRNA dirigés contre le TNF alpha qui représente une approche prometteuse avec des résultats encourageants quant à leur non-toxicité, leur biodisponibilité par voie orale ainsi que leur efficacité à la fois *in vitro* et sur le modèle murin.

DISCIPLINE administrative : Sciences pharmaceutiques

MOTS-CLES :

Polyarthrite rhumatoïde, facteur rhumatoïde, anticorps anti-CCP, sDMARDs, thérapie génique, nanoparticules, chitosane, siRNA-TNFalpha.

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Laboratoire d'orthopédie-Hôpital du sacré cœur de Montréal
5400 Boulevard Guoin O, Montréal, QC H4J 1V5, CANADA

Directeur de thèse : Julio César Fernandes – Isabelle Lajoie-Mazenc