

**Conseil scientifique ESPOIR**  
**Compte rendu des remarques formulées lors de la réunion du**  
**26 novembre 2004**

**I- Discussion générale sur le fond**

La réunion a permis de mettre en lumière :

**1- L'importance à attacher à l'utilisation des données ESPOIR**

- La rationalisation des utilisations des aliquots : il faut demander de façon strict le volume souhaité; pour les sérums, lors de la décongélation, 6 aliquots de 250µl seront faits à partir d'un seul. Cette décongélation unique, faite par le centre de collecte biologique, ne pose pas de problème pour la majorité des dosages. Si une technique empêche cette pratique, il faudra que le centre demandeur le précise.
- Une discussion portant sur la valorisation des échantillons Espoir est nécessaire. Pour cela, J Benessiano et F Berenbaum prépareront une présentation sur le sujet pour juin 2005.
- La nécessité de l'ajout d'une fiche dans le dossier d'appel d'offre pour justifier l'utilisation d'Espoir. Un des points soulevés est l'importance, dans les projets soumis, de la justification de l'utilisation du matériel ESPOIR, du nombre de sujets à inclure, et du type de patients à inclure (tous les patients à l'inclusion ? les 200 premiers ? les formes les plus typiques de polyarthrite rhumatoïde ?, 50 patients ayant une polyarthrite rhumatoïde certaine et 50 non polyarthrite rhumatoïde...). La présentation d'un projet biologique ne peut donc pas se limiter à la présentation de la méthode biologique.

**2-L'importance d'une définition stricte du reviewing des projets soumis**

- La nécessité de grilles de lecture des projets, différentes pour les reviewers internes et externes (à préparer par F Berenbaum et B Combe )
- Deux reviewers extérieurs et un intérieur, ou un reviewer extérieur et deux intérieurs, semblent souhaitables. Les reviewers externes jugerait le côté purement scientifique, les reviewers internes l'adéquation avec Espoir et l'intérêt de donner du matériel Espoir. Une critique au sein du comité scientifique pourrait être faite avant avis des reviewers (pour bonifier le projet) puis après (pour acceptation ou refus selon leur avis, ce qui a été proposé par F Berenbaum, mais ne fait pas l'unanimité).
- L'importance du délai laissé aux reviewers pour la lecture et critique des projets (les projets devront donc être soumis au moins deux mois avant la date de la réunion du conseil scientifique).

**3-La nécessité d'une définition de l'utilisation de la base de donnée**

On convient :

- Qu'il faut faire une charte de bonne utilisation des données lorsque la base (gelée) est prêtée pour une analyse faite indépendamment du centre de coordination.
- Que toutes les données obtenues seront de toutes façon intégrées dans la base de données par le centre de coordination par la suite si la saisie et l'analyse n'ont pas été faites par ce dernier.
- Il est convenu que tous les investigateurs retenus pourront lire les radiographies selon leur besoin, mais que cette lecture devra en tout cas être faite à Brest pour éviter les contre-types et déplacements de radiographies.

## **II- Discussion sur les projets soumis**

Les dossiers soumis en clinique et biologie ont été traités séparément en raison des différences de questions soulevées :

### **1- Dossiers cliniques**

-Pour le dossier de Cédric Lukas, un seul des deux reviewers sollicités a répondu. Le projet ne demandant aucun autre matériel que celui saisi systématiquement dans la base de donnée, il ne pose pas de problème de concurrence dans l'utilisation d'un matériel en quantité limitée comme la biologie. Il n'y a pas de critiques sur la méthodologie autres que celles soulignées par le reviewer (Cf annexe).

-Pour le dossier de Alain Saraux et Valérie Devauchelle, les principales remarques portent sur la décision d'utilisation des radiographies par un centre dans le cadre d'un projet. En effet, une alternative aurait été la lecture de toutes les radiographies par un groupe indépendant financé par la cohorte. L'inconvénient majeur de cette deuxième hypothèse est que selon l'objectif des études, la lecture ne doit pas être faite de la même façon (ordre des radiographies, lecture couplée ou non...).

L'étude des pieds de la première visite sera par principe couplée dès maintenant à celle des mains et les données saisies seront accessibles ensuite aux autres centres qui les souhaitent.

### **2-Dossiers biologiques**

Les deux dossiers de biologie suivants posent les mêmes questions aux membres du conseil scientifique :

-Ce sont des projets qui portent sur le pronostic alors que nous n'avons que les données initiales pour l'instant, et seulement pour certains patients. La réalisation de l'étude dans un délai d'un à deux ans paraît plus opportune.

- Les deux projets émanent d'équipes qui ont déjà fait un travail similaire sur une cohorte de plus petite taille : est-il pertinent de refaire la même étude dans ces conditions, avec un recul insuffisant pour parler de pronostic et a fortiori de diagnostic.

- Aucune explication ne porte sur la méthodologie autre que celle de la technique biologique, et on ne sait pas comment les auteurs justifient la pertinence de l'utilisation du matériel ESPOIR et le nombre de patients à inclure.

Dans le cas du projet de Arnaud Constantin, il semblerait plus logique de faire une étude de plus grande envergure, tant qu'à utiliser du matériel, en abordant toutes les MMP de façon similaire avec intégration obligatoire dans un modèle multivarié ; discussion du volume ADN nécessaire.

Pour le projet d'Olivier Vittecoq, la question est de savoir s'il faut faire l'examen seulement à une partie des patients (intérêt pour les études multivariées qui suivront) ou à des sous groupes sélectionnés (si la réponse à la question est alors plus abordable). et cibler l'objectif : diagnostic (si oui sur quelle base), Pronostic (justification) ?

### **3- Dossiers arrivés après la date de soumission**

Les projets de J-E Gottenberg et C Miceli-Richard sont parvenus au conseil scientifique bien après la dead-line de soumission et n'ont donc pas été reviewés.

Les critiques formulées sur place rejoignent celles des autres projets biologiques :

- Le premier projet, très exploratoire, doit justifier de la nécessité d'utiliser la cohorte et si oui spécifier quels patients de la cohorte doivent en faire l'objet si seulement une partie des patients est considérée.
- Le second projet, qui évalue une technique en cours de mise au point doit là aussi justifier la pertinence de l'utilisation du matériel ESPOIR et le nombre de patients à inclure.

#### **4-Conclusion**

Il est conclu que :

- Les deux dossiers cliniques peuvent être dès maintenant débutés sous réserve de la prise en compte des remarques formulées.
- Les dossiers biologiques y compris les deux derniers de Kremlin-Bicêtre devront être à nouveau soumis après modifications selon les remarques sus-citées et celles des reviewers(cf annexes ).

Alain Saraux, président du CS

Bernard Combe ,secrétaire du CS

### III- Projets soumis

*ESPOIR-SFR*

#### **TITRE DU PROJET**

Identification par analyse protéomique de nouvelles populations d'autoanticorps pouvant contribuer à l'élaboration d'algorithmes pronostiques chez les malades atteints de polyarthrite rhumatoïde dans la cohorte ESPOIR.

#### **RESPONSABLE PRINCIPAL DE LA DEMANDE**

Nom et adresse professionnelle : VITTECOQ Olivier, service de Rhumatologie, CHU de Rouen, 76031 Rouen cedex

Téléphone : 0232889019.

Télécopie : 0232889150

Date de naissance : 11/12/67

Statut :  PHU  PH  PU-PH  CCA  
 MCU-PH  Interne  
 Autre (précisez) \_\_\_\_\_  Membre S.F.R.

Appartenance administrative du laboratoire demandeur :

Université  INSERM  CNRS  Hôpital

#### **TITRES ET DIPLOMES HOSPITALO-UNIVERSITAIRES :**

1997 : doctorat en médecine ; DES de Rhumatologie

2001 : doctorat de sciences biologiques et médicales

2002 : post-doctorat à l'étranger (Pr GS Panayi, Guy's hospital, Londres)

2003 : habilitation à diriger les recherches

> août 2004 : professeur des universités – praticien hospitalier

## 1. RÉSUMÉ DU PROJET

**Titre** - Identification par analyse protéomique de nouvelles populations d'autoanticorps pouvant contribuer à l'élaboration d'algorithmes pronostiques chez les malades atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR) dans la cohorte ESPOIR.

**Etat des connaissances** - L'un des enjeux actuels est d'identifier les formes sévères de PR dès le début de la maladie aux fins d'introduire un traitement de fond puissant, notamment en ayant recours aux TNF-alpha bloquants qui ont démontré leur capacité à stopper l'évolution de la maladie. Actuellement, nous disposons de critères prédictifs de la progression de l'atteinte structurale applicables à l'échelon d'un groupe (< 80% de malades bien classés). Les marqueurs de nature biochimique, immunologique et génétique dont nous disposons sont insuffisants pour établir des index composites valables à l'échelon individuel. Par conséquent, la mise en évidence de nouveaux marqueurs prédictifs de la progression radiologique apparaît nécessaire. Les autoanticorps (autoAc) ont une place importante comme l'atteste la valeur pronostique des facteurs rhumatoïdes et des anti-CCP. Dans le cadre du programme ACPRA initié en 1999 dans l'unité Inserm U519, appliqué à la cohorte VErA de rhumatismes débutants non traités, de recrutement communautaire, nous avons identifié par analyse protéomique de nouvelles populations d'autoAc reconnaissant divers antigènes (alpha-énolase humaine, FUSE binding protein 1 et 2,...). D'autres couples autoAc/autoantigènes sont en cours d'identification. La validation de ces résultats s'avère donc indispensable dans une cohorte ayant des caractéristiques semblables.

**Objectifs** – (i) valider dans la cohorte ESPOIR les résultats obtenus jusqu'à présent à partir des malades de la cohorte VERA et (ii) identifier à partir des sérums des malades de la cohorte ESPOIR de nouvelles populations d'autoAc avec caractérisation moléculaire de leurs cibles antigéniques.

**Patients et méthodes** – A partir des 800 malades atteints de PR ou de rhumatisme indifférencié (possible PR) inclus dans la cohorte ESPOIR, les sérums recueillis à l'inclusion des 400 premiers malades seront étudiés. Un volume de 1,5 ml sera nécessaire à la réalisation des différentes techniques du projet. Dans un premier temps, les sérums seront testés par une technique d'immunoempreinte utilisant un nouvel extrait cellulaire (cellules mononucléées de PR). Les différents Western Blots ainsi obtenus feront l'objet d'une analyse bioinformatique permettant d'une part l'identification de bandes polypeptidiques récurrentes correspondant à de nouvelles protéines cibles et d'autre part de mettre en évidence par une méthode de clustering différents profils de réactivité caractéristiques de la maladie (comparativement à des populations témoins déjà analysées). Dans un deuxième temps, la caractérisation moléculaire des cibles antigéniques de ces autoAc sera effectuée par une analyse couplant l'électrophorèse bidimensionnelle et la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Les protéines d'intérêt seront produites sous forme recombinante par le système RTS in vitro puis fixées sur des billes Luminex, technologie permettant le criblage des sérums sur différentes protéines cibles (12 autoantigènes déjà identifiés dans le cadre de la cohorte VErA plus nouveaux autoantigènes issus du criblage sur cellules mononucléées de PR). Cette dernière étape permettra de valider les résultats obtenus dans le cadre de la cohorte VErA et de confirmer la réactivité des sérums vis-à-vis des nouvelles protéines mises en évidence dans le cadre de la cohorte ESPOIR. La valeur pronostique de ces nouveaux marqueurs sera étudiée ultérieurement, en combinaison avec les autres tests réalisés dans la cohorte.

**Faisabilité** - L'équipe 3 de l'unité Inserm 519 a acquis au cours de ces dernières années une grande expérience dans l'analyse protéomique. A ce titre, l'unité dispose de toute l'infrastructure et des moyens humains pour la réalisation de ce travail. En outre, la caractérisation moléculaire des cibles antigéniques des autoanticorps au cours des maladies autoimmunes constitue le projet de recherche G4-immunologie, coordonné par le Pr F Tron, impliquant les laboratoires d'ImmunoPathologie de Lille, Amiens, Rouen et Caen, qui a obtenu un financement à hauteur de 207 000 euros. La durée de l'étude sera de 2 ans et le budget prévisionnel (frais de fonctionnement) a été estimé à 50 000 euros.

**Résultats attendus** - Ce projet de recherche devrait aboutir à l'identification de nouveaux marqueurs

immunologiques, permettant d'enrichir le panel de marqueurs déjà étudiés dans la cohorte ESPOIR et d'envisager à moyen terme l'élaboration d'algorithmes pronostiques applicables à l'échelon individuel. De tels algorithmes devraient permettre l'identification dès les premières semaines d'évolution des patients à haut risque de développer une forme invalidante avec pour corollaire l'introduction très précoce d'une biothérapie.

\* avis favorable du CCPPRB :       Non Justifié    X Obtenu dans le cadre du  
projet ESPOIR initial  
 Nécessitant un amendement au projet  
ESPOIR initial

### 3. PROJET DE RECHERCHE DÉTAILLÉ :

Joindre en 2 exemplaires sur papier libre (10 pages maximum) un exposé détaillé du projet de recherche, en suivant le plan suivant :

#### 1. Titre du projet

Identification par analyse protéomique de nouvelles populations d'autoanticorps pouvant contribuer à l'élaboration d'algorithmes pronostiques chez les malades atteints de polyarthrite rhumatoïde dans la cohorte ESPOIR.

#### 2. Situation du sujet de recherche dans la littérature

La **polyarthrite rhumatoïde** (PR) est un problème majeur de santé publique en raison de sa forte prévalence (0,3%), du handicap fonctionnel consécutif aux destructions ostéo-cartilagineuses et de son coût socio-économique élevé. Il est désormais clairement établi que l'introduction très précoce d'un traitement de fond a un impact sur le devenir fonctionnel du patient. La PR est une maladie hétérogène dont 10 à 15% sont des formes sévères caractérisées par une progression rapide de la destruction articulaire, source de handicap (arrêt de l'activité professionnelle,...) à court terme. **L'un des enjeux majeurs est d'identifier ces formes sévères dès le début de la maladie** aux fins d'introduire un traitement de fond puissant, notamment en ayant recours aux TNF-alpha bloquants qui ont démontré leur capacité à stopper l'évolution de la maladie. Actuellement, nous disposons de **critères prédictifs de la progression de l'atteinte structurale applicables à l'échelon d'un groupe (< 80% de malades bien classés)**. Ils sont principalement représentés par la positivité des facteurs rhumatoïdes et des anticorps anti-CCP, une élévation des paramètres biologiques de l'inflammation et l'existence d'une atteinte structurale au début de la maladie (1,2). Par conséquent, la **mise en évidence de nouveaux marqueurs prédictifs de la progression radiologique** apparaît nécessaire.

De nombreux marqueurs de nature biochimique, génétique et immunologique sont des candidats potentiels. Parmi les marqueurs immunologiques, les autoanticorps (autoAc) ont une place importante comme l'atteste la valeur pronostique des facteurs rhumatoïdes et des anti-CCP. D'autres populations d'autoAc sont associées à la PR comme les anti-Sa, les anti-calpastatine, les anti-glucose-6-phosphate isomérase mais leur intérêt pronostique semble limité. En 1999, l'unité Inserm 519, à l'initiative du Pr François Tron, a mis en place un **programme baptisé "ACPRA" (Autoantigen Characterization by Proteomic and Recombinant Analysis)** d'identification de nouveaux couples autoantigènes/autoanticorps par criblage de banques d'expression et par analyse protéomique. A partir des sérums des 336 malades atteints d'arthrite débutante, non traitée, inclus dans la cohorte VErA dont la mise en place a été initiée en 1998 par le Pr Xavier Le Loët, nous avons identifié 2 protéines d'intérêt, la partie N-terminale de la calpastatine et l'alpha-énolase humaine (3,4). En outre, nous avons testé par une technique d'immunoempreinte utilisant différents extraits antigéniques les sérums des malades issus de la cohorte et avons répertorié différentes bandes polypeptidiques récurrentes dont les masses moléculaires ne correspondent pas à des antigènes déjà identifiés. La nature moléculaire de 12 d'entre elles a été identifiée par électrophorèse bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse. Il s'agit, entre autres, des FUSE binding protein 1 et 2 et de la protéine STI1 (5). La production des protéines recombinantes est actuellement en cours avec pour corollaire la mise au point de tests ELISA et/ou de tests multiparamétriques utilisant la technologie Luminex, permettant l'étude de la signification clinique des autoAc reconnaissant ces cibles antigéniques dans différentes populations de malades atteints de rhumatismes débutants. Ainsi, cette **approche par analyse**

protéomique apparaît pertinente pour l'identification de nouveaux marqueurs immunologiques

### 3. But de la recherche

Les objectifs du projet de recherche sont d'une part de **valider dans la cohorte ESPOIR les résultats obtenus jusqu'à présent** à partir des malades de la cohorte VErA et d'autre part, **d'identifier à partir des sérums des malades de la cohorte ESPOIR de nouvelles populations d'autoAc avec caractérisation moléculaire de leurs cibles antigéniques**

### 4. Patients et Méthodes

#### **Patients**

Huit cents malades, atteints de PR ou de rhumatisme inclassé pouvant devenir une PR, évoluant depuis moins de 6 mois et n'ayant jamais reçu de traitement de fond ou de corticothérapie, auront été inclus à la fin de l'année 2004. dans la cohorte ESPOIR grâce au concours de 14 centres hospitaliers et des rhumatologues libéraux. Les malades sont suivis tous les 6 mois pendant 2 ans puis annuellement. Chaque visite comporte une évaluation clinique (données saisies et transmises au centre coordinateur de Montpellier), la réalisation de radiographies standard des mains et des pieds (Centre de collecte à Brest), le recueil de matériel biologique (sérum, urine, ADN sanguin, si possible liquide et/ou tissu synovial) stocké au Centre de Ressources Biologiques de l'Hôpital Bichat. L'étude a été approuvée par le CPP de Montpellier. Les malades ont été informés de la nature et des objectifs de l'étude et ont donné leur consentement écrit (6).

**La présente étude portera sur le sérum prélevé lors de la visite d'inclusion chez les 400 premiers malades inclus dans la cohorte**

#### **Méthodologie biologique**

Jusqu'à présent, les sérums de la cohorte VerA ont été criblés sur différents extraits protéiques provenant de la lignée pro-myélocytaire HL60, des cellules Raji et de la lignée Jurkat. Quant aux 400 sérums de la cohorte ESPOIR, ils seront analysés par une **technique d'immunoempreinte** utilisant un nouveau substrat antigénique (cellules mononucléées du sang périphérique provenant de PR). Après extraction par des solvants organiques, les protéines cellulaires sont soumises à une électrophorèse monodimensionnelle permettant leur séparation selon la masse moléculaire puis transférées sur une membrane de nitrocellulose sur laquelle seront criblés les sérums. A l'aide du logiciel ImageMaster (TotalLab) qui analyse les différents profils électrophorétiques, les sérums révélant un **profil de bandes polypeptidiques récurrentes** seront sélectionnés pour une **analyse sur des cartes protéiques obtenus après électrophorèse bidimensionnelle** qui combine 2 modes de séparation des protéines, selon leur point isoélectrique et leur masse. Comme précédemment, les protéines séparées en gel 2D, sont transférées sur une membrane de nitrocellulose pour être révélées par les sérums sélectionnés. Les tâches protéiques du gel 2D reconnues par les sérums et correspondant aux bandes récurrentes mises en évidence par électrophorèse 1D, sont excisées à l'aide d'un appareil d'excision Eltan Spot Picker (Amersham Biosciences) sous contrôle informatique, puis digérées par la trypsine. Les échantillons protéiques ainsi obtenus sont **analysés par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF**. Il en découle un spectre composé de pics représentant les fragments ionisés de la protéine et dont l'analyse par des logiciels (MS-Fit, PeptIdent) permet l'identification de la protéine.

Les protéines ainsi identifiées seront **produites sous forme recombinante en utilisant le système RTS in vitro** puis fixées sur des billes Luminex (Bio-Plex system, Bio-Rad). La **technologie Luminex** permettra le criblage des 400 sérums sur plusieurs protéines en utilisant un seul test selon une approche multiparamétrique. Cette étape permettra d'une part



de valider les résultats obtenus à partir de la cohorte VErA (12 nouvelles cibles antigéniques) et d'autre part de confirmer la réactivité des sérums mise en évidence par immunoempreinte sur cellules mononucléées de PR.

### **Analyse biostatistique**

Les sérums de la cohorte ESPOIR seront étudiés par une technique d'immunoempreinte afin de détecter de nouvelles populations d'autoAc. L'étude portera, non seulement sur l'identification de nouvelles populations d'autoAc considérées isolément, mais aussi et surtout sur la mise en évidence de profils de réactivité caractéristiques de la maladie. Cette approche multiparamétrique, utilisant une méthodologie de type clustering, sera mise en place dans le cadre du projet que nous avons soumis dans le cadre du programme PRO-A de l'Inserm et qui a été sélectionné pour financement (Coordinateur : O. Vittecoq). Par conséquent, elle pourra donc être appliquée à court terme à la cohorte Espoir. Ce travail sera réalisé par Romain Daveau, titulaire d'un DESS de bio-informatique, et actuellement en thèse de sciences (directeur de thèse : O. Vittecoq)

### **5. Faisabilité de l'étude**

L'équipe 3 de l'unité Inserm 519, dans laquelle s'intègrent les activités de recherche de Danièle Gilbert (Chargée de recherche Inserm), de Roland Charlionet (Chargé de recherche Inserm), d'Olivier Vittecoq (PU-PH), de Xavier Le Loët (PU-PH) et de François Tron (PU-PH, directeur de l'unité 519), a acquis au cours de ces dernières années une grande expérience dans l'analyse protéomique. A ce titre, l'unité dispose de toute l'infrastructure (Cf méthodologie biologique) et des moyens humains (2 thésards en science : Vincent Goeb, DES de Rhumatologie et Romain Daveau ; 1 technicienne de recherche ; Marlène thomas) pour la réalisation de ce travail. En outre, la caractérisation moléculaire des cibles antigéniques des autoanticorps au cours des maladies autoimmunes constitue le projet de recherche G4-immunologie, coordonné par le Pr F Tron, impliquant les laboratoires d'ImmunoPathologie de Lille, Amiens, Rouen et Caen, qui a obtenu un financement à hauteur de 207 000 euros.

### **6. Conséquences attendues**

Ce projet de recherche devrait aboutir à l'identification de nouveaux marqueurs immunologiques, permettant d'enrichir le panel de marqueurs déjà étudiés dans la cohorte ESPOIR et d'envisager à moyen terme l'élaboration d'algorithmes pronostiques applicables à l'échelon individuel. De tels algorithmes devraient permettre l'identification dès les premières semaines d'évolution des patients à haut risque de développer une forme invalidante avec pour corollaire l'introduction très précoce d'une biothérapie.

### **7. Calendrier de réalisation**

La durée du projet sera de 2 ans (années 2005 et 2006).

### **8. Références**

1. COMBE B. Prognostic factors in early inflammatory arthritis. **Rev Med Interne** 1996,17:224-30.
2. FORSLIND K, AHLMEN M, EBERHARDT K, et al. Prediction of radiological outcome in early rheumatoid arthritis in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP). **Ann Rheum Dis** 2004,63:1090-5
3. V. SAULOT, O. VITTECOQ, R. CHARLIONET, P. FARDELLONE, N. MACHOUR, C. LANGE, L. MARVIN, D. GILBERT, X. LE LOËT, F. TRON. *Autoantibodies directed against alpha-enolase, an enzyme of the glycolytic pathway, are present in early rheumatoid arthritis.. Arthritis Rheum* 2002, 46:1196-1201

4. V. SAULOT, O VITTECOQ, V. SALLE, J. LEGOEDEC, X LE LOËT, M. GODIN, JP DUCROIX, JF MENARD, F. TRON, D. GILBERT. Autoantibodies directed against the amino-terminal region of calpastatin predominantly bind to domain 1 in chronic rheumatic diseases. High levels of ACAST-D1 antibodies are associated with vasculitis in systemic lupus erythematosus (SLE). **J Autoimmunity 2002,19:55-61**
5. GOEB V. Identification de protéines reconnues par des autoanticorps au cours de la polyarthrite rhumatoïde: relations avec le profil antigénique Sa et mise en évidence de nouveaux marqueurs. DEA Université Paris VII – Denis Diderot.
6. COMBE B. The French early arthritis registry. Clin Exp Rheumatol 2003;21:S123-8.

#### **PAGE 4**

#### **Rôle du demandeur et de ses collaborateurs pour le projet(préciser la fonction de chacun ):**

Olivier Vittecoq - Coordination du projet ; Encadrement des thèses de sciences de Romain Daveau et Vincent Goeb.

Danièle Gilbert - Encadrement des thèses de sciences de Romain Daveau et Vincent Goeb ; Prise en charge de la production des protéines recombinantes par le système RTS.

Roland Charlionet – Prise en charge de l'analyse par spectrométrie de masse

Vincent Goeb – Prise en charge des techniques d'électrophorèse monodimensionnelle et de criblage des sérums sur le système Bio-Plex

Roamin Daveau – Prise en charge de l'analyse bio-informatique des immunoempreintes mono- et bi-dimensionnelle.

Marlène Thomas – Prise en charge des techniques d'électrophorèse mono- et bi-dimensionnelle.

**Collaborations** (indiquer précisément pour chacun) : Néant

Nom :

Intitulé et adresse du service ou du laboratoire

Rôle dans le projet :

## PUBLICATIONS

**Principales publications du demandeur (5)**

1. O. VITTECOQ, F. BRARD, F. JOVELIN, X LE LOËT, F. TRON, D. GILBERT. IgM anti-myeloperoxidase antibody-secreting lymphocytes are present in the peripheral repertoire of lupus mice but rarely differentiate into IgG-producing cells. **Clin Exp Immunol** 1999, **118** :122-130.
2. O. VITTECOQ, L AIT SAID, C MICHOT, O MEJJAD, JM THOMINE, P MITROFANOFF, J LECHEVALIER, P LEDOSSEUR, A GAYET, P LAURET, X LE LOËT. Evolution of chronic recurrent multifocal osteitis toward spondylarthropathy over the long term. **Arthritis Rheum** 2000, **43** :109-119.
3. V. SAULOT, O. VITTECOQ, R. CHARLIONNET, P. FARDELLONE, N. MACHOUR, C. LANGE, L. MARVIN, D. GILBERT, X. LE LOËT, F. TRON. Autoantibodies directed against alpha-enolase, an enzyme of the glycolytic pathway, are present in rheumatoid arthritis sera and predominantly bind to the post-translationally modified protein. **Arthritis Rheum** 2002, **46**:1196-1201
4. O. VITTECOQ, B. INCAURGARAT, J. LEGOEDEEC, G. LETOURNEUR, F. JOUEN-BEADES, D. ROLLAND, G. GERVASI, JF MENARD, P. FARDELLONE, A. DARAGON, M. JOLIVET, X LE LOËT, F. TRON. Autoantibodies recognizing citrullinated rat filaggrin in an ELISA using citrullinated and non-citrullinated recombinant proteins as antigens are highly diagnostic for rheumatoid arthritis. . **Clin Exp Immunol** 2004, **135**:173-80
5. O VITTECOQ, V CORRIGALL, M BODMAN-SMITH, G PANAYI. The molecular chaperone BiP inhibits the differentiation of monocytes into immature dendritic cells. **Soumis J Immunol**

**Publications sur le thème**

- 1.. O. VITTECOQ, F JOUEN-BEADES, K KRZANOWSKA, I BICHON-TAUVEL, JF MENARD, A DARAGON, D GILBERT, F TRON, X LE LOËT. Prospective evaluation of the frequency and clinical significance of anti-neutrophil cytoplasmic and anti-cardiolipin antibodies in community cases of patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology** 2000, **39** :481-9.
2. O. VITTECOQ, V SALLE, F JOUEN-BEADES, K KRZANOWSKA, JF MENARD, A GAYET, X LE LOËT, F TRON. Autoantibodies to the 27 C-terminal amino-acids of calpastatin are detected in a restricted set of connective tissue diseases and may be useful for rheumatoid arthritis diagnostic in community cases of very early arthritis. **Rheumatology** 2001,**40** :1126-34.
3. O. VITTECOQ, F JOUEN-BEADES, K KRZANOWSKA, I BICHON-TAUVEL, JF MENARD, A DARAGON, F TRON, X LE LOËT. Rheumatoid factors, anti-filaggrin antibodies, and low in vitro interleukin 2 and interferony production are useful immunological markers for early diagnosis of community cases of rheumatoid arthritis. Preliminary study. **Joint Bone Spine** 2001,**68** :144-53
4. V. SAULOT, O. VITTECOQ, R. CHARLIONNET, P. FARDELLONE, N. MACHOUR, C. LANGE, L. MARVIN, D. GILBERT, X. LE LOËT, F. TRON. *Autoantibodies directed against alpha-enolase, an enzyme of the glycolytic pathway, are present in early rheumatoid arthritis.* . **Arthritis Rheum** 2002, **46**:1196-1201
5. V. SAULOT, O VITTECOQ, V. SALLE, J. LEGOEDEEC, X LE LOËT, M. GODIN, JP DUCROIX, JF MENARD, F. TRON, D. GILBERT. Autoantibodies directed against the amino-terminal region of calpastatin predominantly bind to domain 1 in chronic rheumatic diseases. High levels of ACAST-D1 antibodies are associated with vasculitis in systemic lupus erythematosus (SLE). **J Autoimmunity** 2002,**19**:55-61
6. O VITTECOQ, S POUPLIN, K KRZANOWSKA, F JOUEN-BEADES, JF MÉNARD, A GAYET, A DARAGON, F TRON, X LE LOËT. *Rheumatoid factor is the strongest predictor of radiological progression of rheumatoid arthritis in a 3-year prospective study on community-recruited patients.* **Rheumatology** 2003,**42**:939-46
7. O. VITTECOQ, B. INCAURGARAT, J. LEGOEDEEC, G. LETOURNEUR, F. JOUEN-BEADES, D. ROLLAND, G. GERVASI, JF MENARD, P. FARDELLONE, A. DARAGON, M. JOLIVET, X LE LOËT, F. TRON. Autoantibodies recognizing citrullinated rat filaggrin in an ELISA using citrullinated and non-citrullinated recombinant proteins as antigens are highly diagnostic for rheumatoid arthritis. . **Clin Exp Immunol** 2004, **135**:173-80
8. F JOUEN, O VITTECOQ, F LEGUILLOU, et al. Diagnostic and prognostic values of anti-glucose-6-phosphate isomerase antibodies in community-recruited patients with very early arthritis. **Clin Exp Immunol** 2004,**137**:606-11
9. S THEBAULT, D GILBERT, N MACHOUR, et al. Two-dimensional electrophoresis and

mass spectrometry identification of proteins bound by a murine monoclonal anti-cardiolipin antibody: a powerful technique to characterize the cross-reactivity of a single autoantibody. **Electrophoresis 2000,21:2531-9.**

**BUDGET PRÉVISIONNEL DU PROJET DE RECHERCHE**

**1. Somme totale : 87 500 euros            durée prévue de l'étude (ans) : 2 ans.....**

**- achat de matériel**

.....Néant.....  
.....  
.....

**- Frais de fonctionnement :**

.....50 000 euros.....  
.....  
.....

**- Salaire / bourse :**

.....  
.....37 500 euros  
.....

**2. Organisme déjà sollicité et sommes obtenues**  
somm

**3. Organismes déjà sollicités et**  
attendues

- |                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| · G4-immunologie = 207 000 euros | · Néant |
| · PRO-A Inserm = 75 000 euros    | ·       |
| ·                                | ·       |
| ·                                | ·       |



**MATERIEL ESPOIR demandé :**

**(préciser s'il s'agit de données démographiques ,clinico- biologiques, ou autres recueillis dans le cadre de la cohorte ou de matériel biologique de la biothèque ; préciser le nombre de patients ou de prélèvements intéressés par la demande et en cas de matériel biologique le volume demandé)**

- **Matériel de la biothèque = sérums des 400 premiers malades inclus ; à terme, validation des résultats sur les sérums des 400 derniers malades de la cohorte ; volume demandé = 1,5 ml.**
- **accès aux données démographiques et clinico-biologiques de la base.**
- **à terme, accès aux résultats des analyses radiographiques (progresseurs versus non-progresseurs)**

Je soussigné(e), .....VITTECOQ Olivier..... m'engage :

-A accepter de passer une convention avec le comité de pilotage de la Cohorte ESPOIR  
-A faire figurer le nom d'« ESPOIR » dans le titre ou sous-titre des futures publications ainsi que les noms en tant que co-auteurs de 2 des membres\* de la cohorte ESPOIR (dont 1 membre du comité de pilotage).

-A adresser toute publication 10 jours avant soumission au comité de pilotage de la Cohorte ESPOIR

\*responsable d'un centre clinique ou membre du comité de pilotage



**Nom du demandeur :**

**VITTECOQ Olivier**

**Signature :**

*ESPOIR-SFR*

**TITRE DU PROJET**

Etude d'association entre des polymorphismes de gènes de métalloprotéases matricielles et le caractère persistant et érosif à 1 an d'un rhumatisme inflammatoire débutant.

**RESPONSABLE PRINCIPAL DE LA DEMANDE**

Nom et adresse professionnelle : Arnaud CONSTANTIN, Service de Rhumatologie, CHU de Rangueil, 1 avenue Jean Poulhès 31059 Toulouse Cedex 9.

Fixe : 0561322721, Portable : 0666218725, Télécopie : 0561322934, Email : [constant@cict.fr](mailto:constant@cict.fr)

Date de naissance : 17/07/66

Statut :  PHU  PH  PU-PH  CCA  
 MCU-PH  Interne  
 Autre (précisez) \_\_\_\_\_  Membre S.F.R.

Appartenance administrative du laboratoire demandeur :

Université  INSERM  CNRS  Hôpital

**TITRES ET DIPLOMES HOSPITALO-UNIVERSITAIRES :**

**Titres**

- **Interne des Hôpitaux de Toulouse (11/91-10/97)**
- **Chef de Clinique des Universités - Assistant des Hôpitaux de Toulouse.** Service de Rhumatologie, CHU Rangueil (11/97-10/99, 11/00-10/02)
- **Praticien Hospitalier Universitaire.** Service de Rhumatologie, CHU Rangueil (05/03-05/07)

**Diplômes**

- **Docteur en Médecine.** Université Paul Sabatier Toulouse III, 22/10/97.
- **Diplôme d'Études Spécialisées de Rhumatologie.** Université Paul Sabatier Toulouse III, 03/11/97.
- **Maîtrise de Sciences Biologiques et Médicales.** Université Paul Sabatier Toulouse III, Juillet 95. Certificat d'Immunologie (93-94), Certificat de Biochimie Spécialisée (94-95).

- **DEA Biologie Ostéoarticulaire, Biomécanique et Biomatériaux.** Université Denis Diderot Paris 7, année universitaire 95-96.
- **Doctorat de l'Université Toulouse III en Immunopathologie et Immunogénétique Humaines.** Université Paul Sabatier Toulouse III, 06/12/02.
- **DU de Pédagogie Médicale et de Santé.** Université Paul Sabatier Toulouse III (02-03).

**Activités de recherche**

- **Année recherche, INSERM U563 (ex U395) Toulouse (11/95-10/96)**
- **Poste d'Accueil, INSERM U558 (ex U518) Toulouse (12/99-11/01)**
- **Au profil de l'unité INSERM U558 (12/01-12/03)**
- **Contrat d'Interface INSERM U558 (01/04-12/08)**

## SECTION 2

### 1. RÉSUMÉ DU PROJET

**Titre** - Etude d'association entre des polymorphismes de gènes de métalloprotéases matricielles et le caractère persistant et érosif à 1 an d'un rhumatisme inflammatoire débutant.

**Etat des connaissances** - Le concept de rhumatisme inflammatoire persistant et érosif se développe actuellement dans le milieu rhumatologique et constitue une alternative intéressante au concept de polyarthrite rhumatoïde. La mise en évidence de marqueurs associés au caractère érosif et persistant d'un rhumatisme inflammatoire débutant apparaît essentielle afin de pouvoir évaluer les stratégies thérapeutiques les plus agressives dans ce sous-groupe de malades.

**Objectif** - Tester l'hypothèse d'une association entre des polymorphismes de gènes de métalloprotéases matricielles et le caractère persistant et érosif à 1 an d'un rhumatisme inflammatoire débutant chez les malades inclus dans la cohorte ESPOIR.

#### **Patients et méthodes**

A partir des données recueillies à l'occasion de la visite à 1 an, les malades inclus dans la cohorte ESPOIR seront répartis en 2 groupes : le groupe des cas étant constitué des malades présentant un rhumatisme inflammatoire persistant (nombre d'articulations gonflées  $\geq 1$  sur 44 articulations évaluées) et érosif (score de Sharp érosion modifié par van der Heijde  $\geq 1$ ) à 1 an ; le groupe des contrôles étant constitué des malades ne combinant pas ces 2 critères à 1 an.

Le génotypage des polymorphismes 1G/2G du promoteur de la MMP-1 et 5A/6A du promoteur de la MMP-3 seront réalisés à partir de l'ADN génomique des malades de la cohorte ESPOIR selon une méthode de PCR fluorescente.

L'hypothèse d'une association entre les polymorphismes étudiés et le caractère persistant et érosif à 1 an du rhumatisme inflammatoire sera testée en comparant les fréquences alléliques et les fréquences génotypiques des marqueurs génétiques étudiés entre le groupe des cas et le groupe des contrôles (test du Chi-2, calcul des odds ratios et des intervalles de confiance à 95%). Le ou les polymorphismes éventuellement associés au caractère persistant et érosif seront intégrés dans une analyse en régression logistique prenant en compte les autres paramètres cliniques, biologiques, radiographiques et immunologiques associés, afin de développer un modèle prédictif du caractère persistant et érosif à 1 an d'un rhumatisme inflammatoire débutant.

**Faisabilité** – Le Groupe de Recherche Clinique et Bioclinique Arthrite et Rémission (Université Paul Sabatier – Toulouse III) et l'équipe 4 de l'INSERM U558 (Toulouse) possèdent l'expertise nécessaire dans le typage de polymorphismes de gènes candidats et dans l'analyse biostatistique des données génétiques en pathologie humaine.

**Résultats attendus** - La mise en évidence d'une association entre des polymorphismes de gènes de métalloprotéases matricielles et le caractère persistant et érosif à 1 an améliorerait nos capacités pronostiques devant un rhumatisme inflammatoire débutant.

\* avis favorable du CCPPRB :  Non Justifié  Obtenu dans le cadre du projet ESPOIR initial

Nécessitant un amendement au projet

ESPOIR initial



## SECTION 3

### **3. PROJET DE RECHERCHE DÉTAILLÉ :**

Joindre en 2 exemplaires sur papier libre (10 pages maximum) un exposé détaillé du projet de recherche, en suivant le plan suivant :

#### **1. Titre du projet**

Etude d'association entre des polymorphismes de gènes de métalloprotéases matricielles et le caractère persistant et érosif à 1 an d'un rhumatisme inflammatoire débutant.

#### **2. Etat des connaissances**

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie ubiquitaire fréquente. Son étiologie est inconnue à ce jour. Sa physiopathologie fait intervenir des facteurs génétiques et environnementaux (1). Elle se caractérise par une inflammation de la membrane synoviale qui aboutit à des dommages structuraux articulaires, source d'incapacité fonctionnelle. L'hétérogénéité phénotypique de la maladie et de son évolution se traduit par la coexistence de formes dites bénignes et de formes dites sévères, ces dernières étant caractérisées par l'apparition précoce, puis la progression rapide, des dommages structuraux. De nouvelles stratégies thérapeutiques ont émergé au cours de ces dernières années. Elles reposent sur l'introduction plus précoce de traitements de fond plus actifs chez des malades atteints de formes débutantes de PR. Elles visent non seulement à supprimer l'inflammation articulaire à court terme, mais surtout à prévenir ou à ralentir la progression des dommages structuraux à moyen ou long terme. Les stratégies thérapeutiques les plus agressives utilisent en induction des combinaisons de traitements de fond, de corticothérapie générale et d'agents biologiques. Leur plus grande efficacité est contrebalancée par un risque iatrogène et par un coût financier plus élevés (2).

Le concept de rhumatisme inflammatoire persistant et érosif se développe actuellement dans le milieu rhumatologique et constitue une alternative intéressante au concept de polyarthrite rhumatoïde. La mise en évidence de marqueurs associés au caractère érosif et persistant d'un rhumatisme inflammatoire débutant apparaît essentielle afin de pouvoir évaluer les stratégies thérapeutiques les plus agressives dans ce sous-groupe de malades. Des modèles prédictifs du caractère persistant et érosif d'un rhumatisme inflammatoire débutant ont récemment été proposés. Ils reposent essentiellement sur la combinaison de marqueurs cliniques, immunologiques et radiographiques. L'intégration de marqueurs génétiques, indépendamment associés au caractère érosif et persistant d'un rhumatisme inflammatoire améliorerait les performances de ces modèles (3).

Les allèles du locus HLA-DRB1 codant l'épitope partagé constituent à ce jour les marqueurs génétiques dont l'association avec la susceptibilité et la sévérité de la PR est la mieux documentée (4). D'autres marqueurs génétiques, tels que des polymorphismes localisés sur des gènes de métalloprotéases matricielles constituent des candidats intéressants. Une association entre un polymorphisme du gène codant la MMP-3 (stomélysine-1) et la sévérité structurale de la PR a été rapportée dans deux études indépendantes (5, 6). La recherche d'une association entre un polymorphisme du gène de la MMP-1 (collagénase-1) et la sévérité structurale de la PR a donné lieu à des résultats discordants (7-8). Aucun de ces polymorphismes de gènes de métalloprotéases matricielles n'a été évalué en tant que marqueur potentiellement associé au caractère persistant et érosif à 1 an d'un rhumatisme inflammatoire débutant.

### **3. Objectif de la recherche**

Tester l'hypothèse d'une association entre des polymorphismes de gènes de métalloprotéases matricielles et le caractère persistant et érosif à 1 an d'un rhumatisme inflammatoire débutant chez les malades inclus dans la cohorte ESPOIR.

### **4. Patients et Méthodes**

#### **Patients**

Huit cents malades atteints d'un rhumatisme inflammatoire débutant, potentiellement persistant et érosif, évoluant depuis moins de 6 mois, n'ayant pas reçu de traitement de fond ou de corticothérapie générale pendant plus de 2 semaines, auront été inclus fin 2004 dans la cohorte ESPOIR (9).

Ces malades bénéficient d'un suivi longitudinal prospectif, sur un rythme semestriel pendant 2 ans, puis sur un rythme annuel. La visite d'inclusion puis chaque visite de suivi comportent une évaluation clinique, biologique, immunologique et structurale avec des radiographies des mains et des pieds, ainsi qu'une collecte de matériel biologique (sérum, urine, AD et dans la mesure du possible liquide et/ou tissu synovial).

Les malades ont été informés de la nature et des objectifs de l'étude et ont donné leur consentement écrit. Cette étude a été approuvée par un CCPPRB.

#### **Génotypage des polymorphismes des gènes de la MMP-1 et MMP-3**

Le génotypage du polymorphisme 1G/2G du promoteur de la MMP-1 sera réalisé à partir de l'ADN génomique des malades de la cohorte ESPOIR, par le Groupe de Recherche Clinique et Bioclinique Arthrite et Rémission (dirigé par le Professeur Alain Cantagrel), au sein de l'Equipe d'Accueil 2405 de l'Université Paul Sabatier (dirigée par M. Bernard Pipy, DR INSERM), localisé au CHU de Rangueil à Toulouse, selon une méthode de PCR fluorescente (7).

Le génotypage du polymorphisme 5A/6A du promoteur de la MMP-3 sera réalisé à partir de l'ADN génomique des malades de la cohorte ESPOIR, par le Groupe de Recherche Clinique et Bioclinique Arthrite et Rémission, selon la même méthode (5).

#### **Analyses biostatistiques**

A partir des données recueillies à l'occasion de la visite à 1 an, les malades inclus dans la cohorte ESPOIR seront répartis en 2 groupes : le groupe des cas étant constitué des malades présentant un rhumatisme inflammatoire persistant (nombre d'articulations gonflées  $\geq 1$  sur 44 articulations évaluées) et érosif (score de Sharp érosion modifié par van der Heijde  $\geq 1$ ) à 1 an et le groupe des contrôles étant constitué des malades ne combinant pas ces 2 critères à 1 an.

##### **Analyse univariée.**

L'hypothèse d'une association entre le polymorphisme 1G/2G du promoteur de la MMP-1 et le caractère persistant et érosif à 1 an du rhumatisme inflammatoire sera testée en comparant les fréquences alléliques (allèles 1G et 2G) et les fréquences génotypiques (génotypes 1G1G, 1G2G et 2G2G) entre le groupe des cas et le groupe des contrôles. L'hypothèse d'une association entre le polymorphisme 5A/6A du promoteur de la MMP-3 et le caractère persistant et érosif à 1 an du rhumatisme inflammatoire sera testée en comparant les fréquences alléliques (allèles 5A et 6A) et les fréquences génotypiques (génotypes 5A/5A, 5A/6A et 6A/6A) entre le groupe des cas et le groupe des contrôles (test du Chi-2, calcul des odds ratios [OR] et des intervalles de confiance à 95% [IC 95%]).

##### **Analyse multivariée.**

En cas d'association d'un ou des ces 2 polymorphismes avec le caractère persistant et érosif à

1 an du rhumatisme inflammatoire, le ou les polymorphismes associés seront intégrés dans une analyse en régression logistique, prenant en compte les autres paramètres cliniques, biologiques, radiographiques et immunologiques associés, afin de développer un modèle prédictif du caractère persistant et érosif à 1 an d'un rhumatisme inflammatoire.

Les analyses biostatistiques seront réalisées à l'INSERM U558, au sein de l'équipe 4 (dirigée par le Docteur Anne Cambon-Thomsen, DR CNRS), en utilisant le logiciel d'analyses statistiques Stata statistical software (release 6.0. College Station [TX] : Stata Corporation ; 1999).

### **5. Faisabilité de l'étude**

L'accès à la base de données démographiques, clinico-biologiques et radiologiques des malades inclus dans la cohorte ESPOIR, ainsi que l'envoi d'échantillons d'ADN (5 µg d'ADN par patient, dissous dans du TE 1X pH8 à une concentration proche de 50 ng/µl, soit un volume final de 100 µl) issus de la bibliothèque constituée chez les malades inclus dans la cohorte ESPOIR rendront ce projet faisable.

Le Groupe de Recherche Clinique et Bioclinique Arthrite et Rémission possède l'expertise dans le domaine du génotypage des polymorphismes des gènes de la MMP-1 et de la MMP-3 en PCR fluorescente, comme cela a déjà été fait pour les malades de la cohorte Ranguel Midi-Pyrénées (5, 7). Les échantillons d'ADN issus de la bibliothèque de la cohorte ESPOIR seront stockés au sein du laboratoire de l'Equipe d'Accueil 2405 de l'Université Paul Sabatier, localisé au CHU de Ranguel à Toulouse.

L'équipe 4 de l'INSERM U558 possède l'expertise dans l'analyse biostatistique des données génétiques en pathologie humaine (5, 7).

### **6. Résultats attendus**

La mise en évidence d'une association entre des polymorphismes de gènes de métalloprotéases matricielles et le caractère persistant et érosif à 1 an d'un rhumatisme inflammatoire débutant améliorerait nos capacités pronostiques devant un rhumatisme inflammatoire débutant. Ces polymorphismes pourraient être combinés à d'autres marqueurs génétiques et non génétiques associés au caractère persistant et érosif, afin d'inclure des groupes homogènes de patients dans des essais de stratégies thérapeutiques.

### **7. Calendrier de réalisation**

Ce projet sera réalisé dans un délai de 1 an à compter de la mise à disposition de la base de données démographiques, clinico-biologiques et radiographiques des malades inclus dans la cohorte ESPOIR, ainsi que de la réception des échantillons d'ADN.

### **8. Références**

1- Seldin MF, Amos CI, Ward R, Gregersen PK. The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:1071-9.

2- O'Dell JR. Treating rheumatoid arthritis early: a window of opportunity ? *Arthritis Rheum* 2002;46:283-5.

3- Visser H, le Cessie S, Vos K, Breedveld FC, Hazes JM. How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:357-65.

4- Newton JL, Harney SM, Wordworth BP, Brown MA. A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2004;5:151-7.



- 5- Constantin A, Lauwers-Cances V, Navaux F, Abbal M, van Meerwijk J, Mazieres B, Cambon-Thomsen A, Cantagrel A. Stromelysin 1 (matrix metalloproteinase 3) and HLA-DRB1 gene polymorphisms: Association with severity and progression of rheumatoid arthritis in a prospective study. *Arthritis Rheum* 2002;46:1754-62.
- 6- Matthey DL, Nixon NB, Dawes PT, Ollier WE, Hajeer AH. Association of matrix metalloproteinase 3 promoter genotype with disease outcome in rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2004;5:147-9.
- 7- Constantin A, Lauwers-Cances V, Navaux F, Abbal M, van Meerwijk J, Mazieres B, Cambon-Thomsen A, Cantagrel A. Collagenase-1 (MMP-1) and HLA-DRB1 gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: a prospective longitudinal study. *J Rheumatol* 2002;29:15-20.
- 8- Lee YH, Kim HJ, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Functional polymorphisms in matrix metalloproteinase-1 and monocyte chemoattractant protein-1 and rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2003;32:235-9.
- 9- Combe B. The French early arthritis registry. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:S123-8.

## SECTION 4

**Rôle du demandeur et de ses collaborateurs pour le projet (préciser la fonction de chacun) :**

Bénédicte Jamard (MD), Alain Cantagrel (MD), Bernard Mazières (MD) et Arnaud Constantin (MD, PhD) : inclusion et suivi des patients de la cohorte ESPOIR, Service de Rhumatologie, CHU Rangueil, Toulouse.

Véronique Galéra (Assistant Ingénieur), Alain Cantagrel (MD) et Arnaud Constantin (MD, PhD) : génotypage des polymorphismes des gènes de métalloprotéases et conservation des échantillons d'ADN, GRCB Arthrite et Rémission, EA 2405, Université Paul Sabatier – Toulouse III.

Anne Cambon-Thomsen et Arnaud Constantin : analyses biostatistiques, INSERM U558, Toulouse.

**Collaborations** (indiquer précisément pour chacun) : Non.

Nom :

Intitulé et adresse du service ou du laboratoire

Rôle dans le projet :

## SECTION 5

### PUBLICATIONS

#### Principales publications du demandeur (5)

1. **Constantin A**, Loubet-Lescoulié P, Lambert N, Yassine-Diab B, Abbal M, Mazières B, de Préval C, Cantagrel A. Antiinflammatory and immunoregulatory action of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis : evidence of increased interleukin-4 and interleukin-10 gene expression demonstrated in vitro by competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Arthritis Rheum** **1998**;41:48-57.
2. **Constantin A**, Navaux F, Lauwers-Cancès V, Abbal M, van Meerwijk JPM, Mazières B, Cambon-Thomsen A, Cantagrel A. Interferon gamma gene polymorphism and susceptibility to, and severity of, rheumatoid arthritis. **Lancet** **2001**;358:2051-2.
3. **Constantin A**, Lauwers-Cancès V, Navaux F, Abbal M, van Meerwijk J, Mazières B, Cambon-Thomsen A, Cantagrel A. Collagenase-1 (MMP-1) and HLA-DRB1 Gene Polymorphisms in Rheumatoid Arthritis: a Prospective Longitudinal Study. **J Rheumatol** **2002**;29:15-20.
4. **Constantin A**, Lauwers-Cancès V, Navaux, F, Abbal M, van Meerwijk J, Mazières B, Cambon-Thomsen, A, Cantagrel A. Stromelysin-1 (MMP-3) and HLA-DRB1 gene polymorphisms : association with severity and progression of rheumatoid arthritis in a prospective study. **Arthritis Rheum** **2002**;46:1754-62.
5. **Constantin A**, Dieudé P, Lauwers-Cancès V, Jamard B, Mazières B, Cambon-Thomsen A, Cornélis F, Cantagrel A. Tumor necrosis factor receptor 2 gene polymorphism and severity of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum** **2004**;50:742-7.

#### Publications sur le thème

1. **Constantin A**, Loubet-Lescoulié P, Lambert N, Yassine-Diab B, Abbal M, Mazières B, de Préval C, Cantagrel A. Antiinflammatory and immunoregulatory action of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis : evidence of increased interleukin-4 and interleukin-10 gene expression demonstrated in vitro by competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Arthritis Rheum** **1998**;41:48-57.
2. Cantagrel A, **Constantin A**, Vincent C, Abbal M, Laroche M, Ohayon E, Serre G, Mazières B. Rheumatoid factor and antikeratin antibody are independent from presence of DR4 or DR1 in rheumatoid arthritis. **Rev Rhum Engl Ed** **1999**;66:20-3.
3. Loubet-Lescoulié P, **Constantin A**, Mazières B, Tkaczuk J, de Préval C, Cantagrel A. Decreased peripheral blood T cell cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. **Scand J Rheumatol** **1999**;28:244-51.
4. Cantagrel A, Navaux F, Loubet-Lescoulié P, Nourashemi F, Enault G, Abbal M, **Constantin A**, Laroche M, Mazières B. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4 and interleukin-10 gene polymorphisms : relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum** **1999**;42:1093-100.
5. Pimentel Dos Santos F, **Constantin A**, Laroche M, Destombes F, Bernard J, Mazières B, Cantagrel A. Whole Body and Regional Bone Mineral Density in Ankylosing Spondylitis. **J Rheumatol** **2001**;28:547-9.
6. **Constantin A**, Navaux F, Lauwers-Cancès V, Abbal M, van Meerwijk JPM, Mazières B, Cambon-Thomsen A, Cantagrel A. Interferon gamma gene polymorphism and susceptibility to, and severity of, rheumatoid arthritis. **Lancet** **2001**;358:2051-2.
7. **Constantin A**, Lauwers-Cancès V, Navaux F, Abbal M, van Meerwijk J, Mazières B, Cambon-Thomsen A, Cantagrel A. Collagenase-1 (MMP-1) and HLA-DRB1 Gene

Polymorphisms in Rheumatoid Arthritis: a Prospective Longitudinal Study. **J Rheumatol** **2002**;29:15-20.

8. **Constantin A**, Lauwers-Cancès V, Navaux, F, Abbal M, van Meerwijk J, Mazières B, Cambon-Thomsen, A, Cantagrel A. Stromelysin-1 (MMP-3) and HLA-DRB1 gene polymorphisms : association with severity and progression of rheumatoid arthritis in a prospective study. **Arthritis Rheum** **2002**;46 :1754-62.
9. **Constantin A**, Dieudé P, Lauwers-Cancès V, Jamard B, Mazières B, Cambon-Thomsen A, Cornélis F, Cantagrel A. Tumor necrosis factor receptor 2 gene polymorphism and severity of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum** **2004**;50:742-7.

## SECTION 6

### **BUDGET PRÉVISIONNEL DU PROJET DE RECHERCHE**

**1. Somme totale : 14494,78 €**

**Durée prévue de l'étude (ans) : 1 an**

**- Achat de matériel : 0 €**

**Non.**

**- Frais de fonctionnement : 1600 €**

**Produits nécessaires à la PCR, au marquage fluorescent des produits amplifiés, à la réalisation des gels de polyacrylamide et coût de l'utilisation du séquenceur :**

**800 échantillons pour le polymorphisme MMP-1.**

**800 échantillons pour le polymorphisme MMP-3.**

**1 € par échantillon.**

**1600 \* 1 € = 1600 €**

**- Salaire / bourse : 12894,78 €**

**Emploi d'un assistant ingénieur (Mlle Véronique Galéra) pour une durée de 6 mois :**

**2149,13 € par mois \* 6 mois = 12894,78 €**

**2. Organisme déjà sollicité et sommes obtenues**

**Association Midi-Pyrénées Santé**

**Somme obtenue : 5000 €**

**3. Organismes déjà sollicités et sommes attendues**

**Appel d'offre local de la Délégation Régionale de la Recherche Clinique des Hôpitaux de Toulouse**

**Somme attendue : 10000 €**

## SECTION 7

### **MATERIEL ESPOIR demandé :**

**(préciser s'il s'agit de données démographiques ,clinico- biologiques, ou autres recueillis dans le cadre de la cohorte ou de matériel biologique de la biothèque ; préciser le nombre de patients ou de prélèvements intéressés par la demande et en cas de matériel biologique le volume demandé)**

#### **- Données démographiques, clinico-biologiques et radiographiques :**

Accès à la base de données démographiques, clinico-biologiques et radiographiques des malades inclus dans la cohorte ESPOIR.

#### **- Matériel biologique :**

Echantillons d'ADN (5 µg d'ADN par patient, dissous dans du TE 1X pH8 à une concentration proche de 50 ng/µl, soit un volume final de 100 µl) issus de la biothèque constituée à partir des malades inclus dans la cohorte ESPOIR.

Je soussigné(e), Arnaud CONSTANTIN, m'engage :

-A accepter de passer une convention avec le comité de pilotage de la Cohorte ESPOIR

-A faire figurer le nom d'« ESPOIR » dans le titre ou sous-titre des futures publications ainsi que les noms en tant que co-auteurs de 2 des membres\* de la cohorte ESPOIR (dont 1 membre du comité de pilotage).

-A adresser toute publication 10 jours avant soumission au comité de pilotage de la Cohorte ESPOIR

\*responsable d'un centre clinique ou membre du comité de pilotage

**Nom du demandeur : Arnaud CONSTANTIN**

**Signature : *Arnaud CONSTANTIN***

## **ESPOIR SFR**

### **TITRE DU PROJET**

Utilité de la radiographie des avant pieds de  $\frac{3}{4}$  pour la détection des érosions des rhumatismes inflammatoires débutants.

### **RESPONSABLE PRINCIPAL DE LA DEMANDE**

Nom et adresse professionnelle : Pr Alain Saraux, Service de rhumatologie, CHU de la Cavale Blanche, 29609 Brest Cedex

Téléphone : 02 98 34 72 67

Télécopie : 02 98 49 36 27

Date de naissance : .10.. / ..10.. / ..1962..

Statut : PU-PH

Appartenance administrative du laboratoire demandeur :

( **Université** (INSERM (CNRS

### **TITRES ET DIPLOMES HOSPITALO-UNIVERSITAIRES**

-Docteur en médecine, Rhumatologue: Thèse médecine BREST, avril 1992

-Maîtrise de Sciences: BREST, juin 1993

-Habilitation à diriger la recherche: BREST, décembre 1998

-Doctorat d'université: BREST, 2 avril 1999

## 2. RÉSUMÉ DU PROJET

Les radiographies des mains et des pieds font généralement partie du bilan initial réalisé devant un rhumatisme inflammatoire débutant. Elles servent essentiellement à classer les polyarthrites en « érosive » ou « non érosive », la notion d'érosion étant fortement associée au diagnostic de polyarthrite rhumatoïde. Leur apport à la fois diagnostic et pronostic à la phase initiale de la maladie est maintenant relativement bien établi. Néanmoins, l'utilité de faire des radiographie des pieds en plus de celle des mains, et a fortiori des pieds de  $\frac{3}{4}$  en plus de celle des pieds de face reste débattue. En effet, si plusieurs auteurs ont souligné la probable utilité de ces trois clichés combinés, aucune étude ne l'a démontrée.

L'objectif principal de notre travail est d'étudier l'apport de la radiographie des avant pieds de  $\frac{3}{4}$  dans cette indication.

Pour répondre à ces objectifs, nous proposons de calculer, au sein d'une population de rhumatismes inflammatoires débutants correspondant à une polyarthrite rhumatoïde ou à l'un de ses diagnostics différentiels, la proportion de patients ayant une érosion radiologique au niveau des avant pieds définie par 2 méthodes distinctes : présence d'érosion, lecture selon la méthode de Sharp modifiée par van der Heijde.

Si on démontre un gain de détection des érosions grâce au cliché de  $\frac{3}{4}$ , celui ci pourra être adjoint à une nouvelle définition des critères radiographiques de définition de la présence d'érosion au cours des rhumatismes débutants. Cette nouvelle définition pourra ensuite être testée en tant qu'outil diagnostic et pronostic au sein de la cohorte.

**Avis favorable du CCPPRB** : Obtenu dans le cadre du projet Espoir initial



### **3. PROJET DE RECHERCHE DETAILLE**

#### **• Titre du Projet**

Utilité de la radiographie des avant pieds de  $\frac{3}{4}$  pour la détection des érosions des rhumatismes inflammatoires débutants.

#### **• Responsable de la demande**

Alain Saraux (service de rhumatologie, CHU de Brest)

#### **• Collaborateurs du projet**

Valérie Devauchelle (service de rhumatologie, CHU de Brest)

Isabelle Samjee (service de rhumatologie, CHU de Brest)

#### **• But de la recherche**

L'objectif principal de notre travail est d'étudier l'utilité de la radiographie des avant pieds de  $\frac{3}{4}$  pour détecter des érosions des avant pieds.

Les objectifs secondaires sont les suivants :

- Etude de l'utilité de ce cliché de  $\frac{3}{4}$  selon la présence de signes cliniques d'atteintes des avant-pieds.
- Etude de l'utilité de ce cliché de  $\frac{3}{4}$  selon la certitude du clinicien dans le diagnostic de polyarthrite rhumatoïde et selon la présence des critères ACR 1987 de polyarthrite rhumatoïde.
- Afin d'évaluer l'apport de l'échographie et de l'IRM des avant pieds dans les rhumatismes débutants, nous comparerons nos résultats à ceux obtenus au moyen de ces examens dans le sous-groupe qui en aura bénéficié.

En outre, l'analyse des résultats en terme de sensibilité et spécificité pour le diagnostic de rhumatisme érosif et pour le diagnostic de polyarthrite rhumatoïde sera réalisée dans un second temps après un recul d'au moins de deux ans.

### • Situation du sujet de recherche dans la littérature

Actuellement, les critères de classification de polyarthrite rhumatoïde acceptés par tous sont ceux de l'ACR 1987 qui définissent l'atteinte radiologique par la présence « sur des radiographies de mains et de poignets en incidence postéro-antérieure, d'érosions typiques ou d'une déminéralisation localisée ou à proximité des articulations détruites (les lésions d'arthrose n'étant pas prises en compte) » (1), la déminéralisation devant être « sans équivoque ». A ces radiographies des mains sont le plus souvent ajoutés des clichés des avant-pieds de face, permettant d'augmenter la sensibilité de ce critère. Les radiographies servent en outre à classer les polyarthrites en « érosive » ou « non érosive », la notion d'érosion étant fortement associée au diagnostic de polyarthrite rhumatoïde. Leur apport à la fois diagnostic et pronostic à la phase initiale de la maladie est maintenant relativement bien établi. Néanmoins, l'utilité de faire des radiographie des pieds en plus de celle des mains, et a fortiori des pieds de  $\frac{3}{4}$  en plus de celle des pieds de face reste débattue. En effet, si plusieurs auteurs ont souligné la probable utilité de ces trois clichés combinés, aucune étude ne l'a démontrée. Les études de reproductibilité concernent l'évaluation des scores radiographiques élaborés par différents auteurs. Ces scores sont utilisés pour suivre l'évolution de la PR mais aussi pour la nouvelle classification des traitements de fond en SMARDs ou DMARDs. Les scores les plus utilisés actuellement sont ceux de Larsen, Sharp et Sharp modifié van der Heijde (2-4). La fiabilité globale de la lecture est confirmée par l'étude des coefficients de corrélation inter et intra-classe. Ces derniers mesurent l'accord entre deux observateurs indépendants pour un jugement de nature quantitative, c'est à dire dans le cas présent du score radiologique obtenu. En général, les coefficients de corrélation inter et intra-observateur des scores radiologiques sont bons (5-7). Plusieurs études (8, 9) ont démontré que la présence d'érosions (sans utiliser de méthode de cotation particulière) est aussi sensible que le score radiographique global ce qui permet de simplifier la lecture dans le cadre d'études épidémiologiques portant sur des populations importantes. On constate aussi que dans les études thérapeutiques, le critère « nombre de nouvelles érosions » est souvent retenu par les auteurs (10).

Parmi les quelques études prospectives portant sur les rhumatismes inflammatoires débutants, celle de Mau et coll (11) retrouve 33% d'érosions aux mains et aux pieds de patients

considérés comme PR selon les critères de l'ARA 1958, au sein d'une cohorte de rhumatismes inflammatoires débutants, contre 5% seulement pour les autres diagnostics. L'étude de Nissila et al (12) a permis d'évaluer la sensibilité et la spécificité des érosions aux mains et aux pieds pour le diagnostic de polyarthrite rhumatoïde défini selon les critères de l'ARA 1958 (28% des rhumatismes inflammatoires débutants de la cohorte). Les sensibilités des érosions aux mains et aux pieds sont respectivement de 17,5% et 19,1%. Ces derniers résultats sont très proches de ceux que nous avons observés (13, 14) dans une cohorte 270 de rhumatismes débutants (au moins une arthrite depuis moins de un an, dont 98 polyarthrites rhumatoïdes).

- 1- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24
- 2- Larsen A, Dale K, Eek M. Radiographic evaluation of rheumatoid arthritis and related conditions by standard reference films. *Acta Radiol Diagn* 1977;18:481-91
- 3- Sharp JT, Lidsky MD, Collins LC, Moreland J. Methods of scoring the progression of radiologic changes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1971;14:706-20
- 4- Van der Heijde D., Van Leeuwen M.A., Van Riel P.L.C.M., Koster A.M., Van t'Hof M.A., Van Rijswijk M.H, Van de Putte L.B.A. Biannual radiographic assessments of hands and feet in a three-year prospective follow-up of patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1992;35:26-34
- 5- Molenaar E.T.H, Edmonds J, Boers M, van der Heijde D.M.F.M, Lassere M. A practical exercise in reading RA radiographs by the Larsen and Sharp methods. *J Rheumatol* 1999;26:746-8
- 6- Drossaers-Bakker KW, Amesz E, Zwinderman AH, Breedveld FC, Hazes JMW. A comparison of three radiologic scoring systems for the long-term assessment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:1465-72
- 7- Van der heijde D.M.F.M. Plain X-rays in rheumatoid arthritis: overview of scoring methods, their reliability and applicability. *Baillieres Clin Rheumatol* 1996;10:435-53
- 8- Van der Heijde DMFM, Dankert T, Nieman F, Rau R, Boers M. Reliability and sensitivity to change of a simplification of the Sharp/Van der Heijde radiological assessment in rheumatoid arthritis. *Br Society for Rheumatol* 1999;38:941-7
- 9- Wolfe F, van der Heijde DMFM, Larsen A. Assessing radiographic status of

- rheumatoid arthritis: Introduction of a short erosion scale. *J Rheumatol* 2000;27:2090-9
- 10- Forre O and the norwegian arthritis study group. Radiologic evidence of the disease modification in rheumatoid arthritis patients treated with cyclosporine. *Arthritis Rheum* 1994; 37:1509-12
  - 11- Mau W, Raspe HH, MersjannH. Early arthritides: Nosography, nosology and diagnostic criteria. *Scand J Rheumatol* 1989;79:3-12
  - 12- Nissila M, Isomaki H, Kaarela K, Kiviniemi P, Martio J, Sarna S. Prognosis of inflammatory joint diseases: a three year follow-up study. *Scand J Rheum* 1983;12:33-8
  - 13- Pensec VD, Saraux A, Berthelot JM, Alapetite S, Jousse S, Chales G, Thorel JB, Hoang S, Nouy-Trolle I, Martin A, Chiocchia G, Youinou P, Le Goff P. Ability of foot radiographs to predict rheumatoid arthritis in patients with early arthritis. *J Rheumatol*. 2004 Jan;31(1):66-70
  - 14- Devauchelle Pensec V, Saraux A, Berthelot JM, Alapetite S, Chales G, Le Henaff C, Thorel JB, Hoang S, Nouy-Trolle I, Martin A, Baron D, Youinou P, Le Goff P. Ability of hand radiographs to predict a further diagnosis of rheumatoid arthritis in patients with early arthritis. *J Rheumatol*. 2001 Dec;28(12):2603-7.
  - 15- Devauchelle-Pensec V, Saraux A, Alapetite S, Colin D, Le Goff P. Diagnostic value of radiographs of the hands and feet in early rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2002 Oct;69(5):434-41.

**• Description du projet de recherche (malades, techniques, méthodologie, déroulement prévu)**

Pour répondre à ces objectifs, nous proposons de calculer, au sein d'une population de rhumatismes débutants correspondant à une polyarthrite rhumatoïde ou à l'un de ses diagnostics différentiels, la proportion de patients ayant une atteinte radiologique érosive au niveau des avant pieds définie par 2 méthodes distinctes : présence d'érosion (oui/non) et atteinte érosive selon le score de lecture de la méthode de Sharp modifié par van der Heijde.

- **Patients** : Ce sont ceux qui ont été inclus dans la cohorte espoir et qui ont eu une radiographie des avant pieds de face et de 3/4 à l'inclusion. L'objectif de cette cohorte multicentrique française d'arthrites débutantes (évoluant depuis moins de 6 mois) est de servir

de base de donnée pour des études de plusieurs natures: Les critères d'inclusion sont les suivants: Patient pour lequel le diagnostic de PR est possible, probable ou certain souffrant d'au moins deux arthrites depuis 6 semaines (le terme d'arthrite suppose un gonflement articulaire objectivé par l'investigateur. Les deux arthrites doivent être présentes et constatées par l'investigateur au moment de l'inclusion dans l'étude) et depuis moins de 6 mois (le patient doit pouvoir répondre sans ambiguïté à la question « à quelle date avez-vous constaté le gonflement des articulations ? ». Le délai entre la date donnée par le patient et le jour de l'inclusion doit être inférieur à 6 mois) et n'ayant jamais reçu ni traitement de fond ni corticoïdes.

Tous les patients ont un recueil de données cliniques et biologiques standardisées.

- **Radiographies** : Seul le cliché d'inclusion fera l'objet de ce premier travail. La technique radiographique est celle utilisée dans la cohorte : Les radiographies sont numérisées ou non. Si elles sont numérisées, elles sont fournies avec un facteur d'agrandissement de 100%. Elles sont dupliquées de façon à pouvoir en remettre un exemplaire au rhumatologue traitant. Le deuxième exemplaire est adressé au centre de collection radiologique, à Brest. Sur chaque radiographie est noté, au moyen d'une étiquette patient: Le numéro du centre, le nom de l'investigateur, le numéro patient, les initiales du patient, la date de la radiographie. La technique radiographique jointe à l'ordonnance lorsque le patient fait sa radiographie est la suivante : Pour la face, le cliché est fait sur un patient assis les deux pieds au contact, sur un seul film 24x30, les deux pieds étant radiographiés simultanément, après centrage sur la base des pouces, avec des constantes de 55 kv et 100 ma, les cotés droit et gauche étant notés. Pour le  $\frac{3}{4}$ , chaque pied est fait séparément.

- **Lecture radiographique** : La lecture des radiographies de pieds sera faite sur les clichés d'inclusion de face et de  $\frac{3}{4}$  selon une cotation des érosions (indice de Sharp modifié par van der heijde) et en « érosions présentes ou absentes » par deux lecteurs indépendants, en aveugle.

-**Statistique** : Nous calculerons tout d'abord les reproductibilités inter et intra observateurs en utilisant des tests kappa de Cohen pour les variables binaires et par coefficient de corrélation inter et intra classe pour les valeurs continues. Si celles-ci sont, comme classiquement, satisfaisantes, nous produirons les résultats en proportions de polyarthrites érosives selon que l'on fait l'un, l'autre ou les deux types de clichés.

Le résultat final sera exprimé en érosions présentes ou absentes sur le cliché de face, de  $\frac{3}{4}$  et par la combinaison des deux. Le cliché supplémentaire sera considéré comme utile si la proportion de cas avec érosions définis par la présence d'érosion sur au moins l'un des deux

clichés est de 2% supérieur à celui obtenu avec le cliché de face seul. On attend 50% de polyarthrites rhumatoïdes dans la cohorte dont 20% avec érosions sur le cliché de face (soit au total 10% des patients avec une atteinte érosive sur le cliché de face) et on espère retrouver des érosions chez 12% des patients avec l'adjonction du cliché de 3/4. Pour un nombre de cliché de 750, l'intervalle de confiance sera de 2%.

L'analyse sera ensuite faite après stratification sur la présence de signes cliniques aux avant-pieds (douleurs, synovites, squeeze test), selon la certitude du clinicien dans le diagnostic de polyarthrite rhumatoïde, et selon la présence des critères ACR 1987 de polyarthrite rhumatoïde

#### **• Conséquences attendues**

Si on démontre un gain de détection des érosions, le cliché de ¾ pourra être adjoint à une nouvelle définition des critères radiographiques de définition de la présence d'érosion.

Si le gain n'est pas démontré dans la population totale, l'analyse dans le sous groupe avec atteinte des avant pieds permettra de définir la pertinence de la sélection des patients avec atteinte clinique des avant pieds.

Cette nouvelle définition pourra ensuite être testée en tant qu'outil diagnostique et pronostic au sein de la cohorte.

#### **• Calendrier de réalisation**

- collection des clichés terminée en février 2005
- lecture des clichés entre mars et novembre 2005
- analyse statistique en décembre 2005
- soumission de l'article en mars 2006

**Rôle du demandeur et de ses collaborateurs pour le projet (préciser la fonction de chacun)**

Pr Alain Saraux : mise au point méthodologique du projet, analyse statistique, supervision du déroulement de l'étude

Dr Valérie Devauchelle : coordination de la lecture radiographique (méthode, formation d'un second lecteur), lecture radiographique, participation à l'analyse statistique, rédaction de l'article

Isabelle Samjee (interne) : lecture radiographique

Pr Bernard Combe : Expert

Pr Maxime Dougados : Expert

**PUBLICATIONS**

**Principales publications du demandeur (5)**

- 1- Saraux A, Berthelot JM, Devauchelle V, Bendaoud B, Chales G, Le Henaff C, Thorel JB, Hoang S, Jousse S, Baron D, Le Goff P, Youinou P. Value of antibodies to citrulline-containing peptides for diagnosing early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2003 Dec;30(12):2535-9.
- 2- Saraux A, Maillefert JF, Fautrel B, Flipo RM, Kaye O, Lafforgue P, Guillemin F, Botton E. Laboratory and imaging studies used by French rheumatologists to determine the cause of recent onset polyarthritis without extra-articular manifestations. *Ann Rheum Dis.* 2002 Jul;61(7):626-9.
- 3- Saraux A, Berthelot JM, Chales G, Le Henaff C, Mary JY, Thorel JB, Hoang S, Dueymes M, Allain J, Devauchelle V, Baron D, Le Goff P, Youinou P. Value of laboratory tests in early prediction of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002 Apr 15;47(2):155-65.
- 4- Saraux A, Berthelot JM, Chales G, Le Henaff C, Thorel JB, Hoang S, Valls I, Devauchelle V, Martin A, Baron D, Pennec Y, Botton E, Mary JY, Le Goff P, Youinou P. Ability of the American College of Rheumatology 1987 criteria to predict rheumatoid arthritis in patients with early arthritis and classification of these patients two years later. *Arthritis Rheum.* 2001 Nov;44(11):2485-91.
- 5- Saraux A, Guedes C, Allain J, Devauchelle V, Valls I, Lamour A, Guillemin F, Youinou P, Le Goff P. Prevalence of rheumatoid arthritis and spondyloarthropathy in Brittany, France. *Societe de Rhumatologie de l'Ouest. J Rheumatol.* 1999 Dec;26(12):2622-7.

**Publications sur le thème (5)**

- 1- Belghomari H, Saraux A, Allain J, Guedes C, Youinou P, Le Goff P. Risk factors for radiographic articular destruction of hands and wrists in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1999 Dec;26(12):2534-8.
- 2- Devauchelle Pensec V, Saraux A, Berthelot JM, Alapetite S, Chales G, Le Henaff C, Thorel JB, Hoang S, Nouy-Trolle I, Martin A, Baron D, Youinou P, Le Goff P. Ability



of hand radiographs to predict a further diagnosis of rheumatoid arthritis in patients with early arthritis. *J Rheumatol.* 2001 Dec;28(12):2603-7.

- 3- Devauchelle-Pensec V, Saraux A, Alapetite S, Colin D, Le Goff P. Diagnostic value of radiographs of the hands and feet in early rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine.* 2002 Oct;69(5):434-41.
- 4- Saraux A, Maillefert JF, Fautrel B, Flipo RM, Kaye O, Lafforgue P, Guillemin F, Botton E. Laboratory and imaging studies used by French rheumatologists to determine the cause of recent onset polyarthritis without extra-articular manifestations. *Ann Rheum Dis.* 2002 Jul;61(7):626-9.
- 5- Pensec VD, Saraux A, Berthelot JM, Alapetite S, Jousse S, Chales G, Thorel JB, Hoang S, Nouy-Trolle I, Martin A, Chiocchia G, Youinou P, Le Goff P. Ability of foot radiographs to predict rheumatoid arthritis in patients with early arthritis. *J Rheumatol.* 2004 Jan;31(1):66-70

**BUDGET PRÉVISIONNEL DU PROJET DE RECHERCHE**

**1. Somme totale : 0 euros                      durée prévue de l'étude (ans) : 1 ans.....**

**- achat de matériel**

.....Néant.....  
.....  
.....

**- Frais de fonctionnement :**

.....Néant.....  
.....  
.....

**- Salaire / bourse :**

.....  
.....0 euros  
.....

**MATERIEL ESPOIR demandé (préciser s'il s'agit de données démographiques ,clinico- biologiques, ou autres recueillis dans le cadre de la cohorte ou de matériel biologique de la biothèque ; préciser le nombre de patients ou de prélèvements intéressés par la demande et en cas de matériel biologique le volume demandé)**

Le matériel nécessaire se limite à l'autorisation de lecture des radiographies sur place, dans le centre de coordination radiographique de Brest.

Je soussigné(e), .....SARAUX alain.....

m'engage :

- A accepter de passer une convention avec le comité de pilotage de la Cohorte ESPOIR
  - A faire figurer le nom d'« ESPOIR » dans le titre ou sous-titre des futures publications ainsi que les noms en tant que co-auteurs de 2 des membres\* de la cohorte ESPOIR (dont 1 membre du comité de pilotage).
  - A adresser toute publication 10 jours avant soumission au comité de pilotage de la Cohorte ESPOIR
- \*responsable d'un centre clinique ou membre du comité de pilotage

**Nom du demandeur :**

**Signature :** SARAUX alain

*ESPOIR-SFR*

**TITRE DU PROJET**

Identification des déterminants de la prise en charge initiale d'une polyarthrite débutante

**RESPONSABLE PRINCIPAL DE LA DEMANDE :**

Nom et adresse professionnelle : Cédric LUKAS

Scé Immuno-Rhumatologie (Pr Combe), CHU Lapeyronie, 34295 Montpellier cedex 5

Téléphone : 04 67 33 87 10

Télécopie : 04 67 33 73 11

Date de naissance : **20 février 1976**

Statut :  PHU

PH

PU-PH

CCA

MCU-PH

Interne

Autre (précisez) \_\_\_\_\_

Membre S.F.R.

Appartenance administrative du laboratoire demandeur :

Université

INSERM

CNRS

Hôpital

**TITRES ET DIPLOMES HOSPITALO-UNIVERSITAIRES :**

Interne des hôpitaux de Montpellier

-C2 "méthodologie de la recherche clinique et épidémiologique" (Pr Daures)  
2003-2004

-C2 "Environnement et santé" (Pr Artus) 2003-2004

- DEA : "Epidémiologie clinique et évaluation des actions de santé" Université  
NANCY I 2004-2005

## **1. RÉSUMÉ DU PROJET**

On insiste actuellement sur la nécessité d'une prise en charge précoce dans la polyarthrite rhumatoïde. Néanmoins, la prise en charge d'une polyarthrite rhumatoïde débutante reste pour l'heure très hétérogène et mal définie. Elle est actuellement en pleine réévaluation à la fois sur le plan diagnostique et thérapeutique. Les facteurs déterminant l'établissement de la stratégie thérapeutique initiale restent à ce jour inconnus.

L'objectif principal de ce projet est la mise en évidence des éléments déterminant le choix de la stratégie thérapeutique initiale devant une polyarthrite indifférenciée récente.

Pour ce faire, nous utiliserons la base de données de la cohorte ESPOIR, qui est une cohorte de polyarthrites indifférenciées récentes, étude prospective, longitudinale, descriptive sur une durée de 10 ans, constituées de 800 sujets revus régulièrement tous les 6 mois. Les objectifs spécifiques de l'étude seront la description des caractéristiques de l'échantillon des sujets inclus, la description de la prise en charge de la thérapeutique initiale des sujets inclus dans la cohorte et surtout la recherche ensuite des facteurs déterminant cette prise en charge, observés parmi les caractéristiques de la maladie, celles concernant le patient et le mode et le lieu de la prise en charge. L'étude de l'évolution de la polyarthrite et l'adaptation des thérapeutiques sur la période des 6 premiers mois sera également réalisée, à la recherche des facteurs déterminant les modifications observées au cours du temps.

\* avis favorable du CCPPRB :  
projet ESPOIR initial

Non Justifié

Obtenu dans le cadre du

au projet ESPOIR initial


Nécessitant un amendement

**3. PROJET DE RECHERCHE DÉTAILLÉ :**


Joindre en 2 exemplaires sur papier libre (10 pages maximum) un exposé détaillé du projet de recherche, en suivant le plan suivant :

- Titre du projet
- Situation du sujet de recherche dans la littérature
- But de la recherche
- Description du projet de recherche (malades, techniques, méthodologie, déroulement prévu)
- Conséquences attendues
- Calendrier de réalisation





## Identification des déterminants de la prise en charge initiale d'une polyarthrite débutante



### I. Contexte - Les Rhumatismes Inflammatoires Débutants. - La Polyarthrite Rhumatoïde.

La Polyarthrite Rhumatoïde (PR) est le plus **fréquent** des rhumatismes inflammatoires chroniques, touchant notamment 0.3 à 0.5 % de la population française (1). Elle atteint les deux sexes, peut survenir chez des patients de tout âge, avec cependant un pic de fréquence chez la femme entre 40 et 60 ans.

Son évolution s'accompagne d'une augmentation de la mortalité avec un ratio standardisé de mortalité variant de 1,68 à 2,30 selon les études (2), mais aussi et surtout d'un pronostic fonctionnel sévère.

Ainsi, les manifestations de la maladie sont à l'origine d'une **limitation précoce des capacités fonctionnelles** (2-8) et, après 10 ans de suivi, 92 % des malades présentent un handicap important pour les activités de la vie quotidienne (2), avec interruption définitive de l'activité professionnelle pour la majorité d'entre eux (4).

La prise en charge d'un malade atteint de PR nécessite l'emploi de **traitements lourds** (méthotrexate, corticothérapie, biothérapies telles que les anti-TNF $\alpha$ ...), dont l'effet reste souvent incomplet, imprédictible et uniquement suspensif :

si l'on utilise des critères stricts (tels les critères ACR 50), la proportion de malades répondeurs primaires aux différents traitements reste inférieure à 50 % (9, 10) et le recours à la chirurgie est fréquent du fait des dégâts articulaires (15% des malades après 5 ans d'évolution) (8).

Cependant, bien qu'un consensus soit établi à propos de la nécessité d'utilisation d'au moins un traitement de fond avec un objectif de quiescence de la maladie, une étude française

récente relevait chez 1109 patients suivis dans des centres hospitaliers répartis sur le territoire français la présence d'une maladie évolutive, non contrôlée chez 13% des sujets et l'emploi d'un traitement de fond chez seulement 82,1% des malades (11).

La prise en charge d'une **polyarthrite débutante** reste pour l'heure mal définie et est actuellement en pleine réévaluation, à la fois sur les plans diagnostique et thérapeutique :

**Devant un tableau clinique de rhumatisme inflammatoire périphérique débutant, il est actuellement reconnu que la mise en route d'un traitement de fond actif doit être précoce si le diagnostic de Polyarthrite Rhumatoïde débutante probable est retenu** (12, 13, 14, 15).

En effet, la synovite inflammatoire à l'origine des symptômes de la maladie, mais aussi des destructions ostéoarticulaires observées au cours de son évolution, est plus accessible à ce stade aux thérapeutiques, avec même la possibilité d'une réversibilité complète initiale, suggérant l'existence d'une « **fenêtre d'opportunité** » (16, 17).

Toutefois, ce **diagnostic de PR débutante est difficile**, les critères classiques de classification de la maladie, établis par l'*American College of Rheumatology* (ACR) (18), ne peuvent en effet s'appliquer qu'à des sujets souffrant de PR établie ancienne.

C'est par conséquent en s'appuyant sur un **faisceau d'arguments cliniques et biologiques** que le praticien doit évaluer l'opportunité de mise en route d'un traitement dit « agressif », c'est-à-dire comportant une association de traitement de fond reconnu actif dans la PR (DMARD-*Disease Modifying Anti-Rheumatism Drug*-, biothérapies telles que les anti-TNF $\alpha$ ) à une corticothérapie, avec pour **objectif l'obtention d'une rémission complète** de la maladie (14, 15, 19, 20).

Ces arguments se fondent sur les **caractéristiques propres du patient**, tels son sexe et son âge, sur des **données cliniques**, comme la localisation des articulations touchées, mais également sur des **résultats biologiques** ayant valeurs d'indicateurs sans jamais toutefois être parfaitement spécifiques (Facteur Rhumatoïde, Anticorps anti-CCP, gène HLA DRB1\*04...).

Pourtant, même s'il **n'existe pas à l'heure actuelle de standardisation concernant la prise en charge des patients atteints de polyarthrite débutante**, certaines recommandations globales ont été proposées et reconnues (21), préconisant par exemple l'introduction **précoce**

**d'un traitement de fond et l'adaptation rapprochée des thérapeutiques** engagées, avec pour **objectif l'obtention de la rémission** (19, 20, 22, 23, 24, 25, 26) .

Or, on relève une nette **hétérogénéité dans la prise en charge initiale**, aux niveaux international et européen, mais également à l'échelle française. Ainsi, les variations observées sur les pratiques d'un panel de 917 rhumatologues français face à une polyarthrite débutante étaient grandes en ce qui concernaient les examens prescrits dans un but **diagnostique**, hétérogénéité retrouvée dans deux autres études (27, 28), mais aussi et **surtout dans la prise en charge thérapeutique** initiale, avec notamment la prescription d'un traitement de fond dans seulement 74% des cas (29).

Les **facteurs déterminants pour l'établissement du choix de la stratégie thérapeutique initiale**, s'ils sont pour certains évoqués, restent à ce jour inconnus. En effet, si des caractéristiques propres du médecin ont été identifiées comme à l'origine d'une partie de la disparité observée dans les prescriptions, tels que son expérience, son lieu d'étude ou de pratique médicale, son mode de rémunération (30), les éléments-clés provenant du patient ou les caractéristiques cliniques et biologiques de la maladie **n'ont pour l'heure pas été identifiés**.

## **II. Objectifs de l'étude .**

Le projet de recherche aura pour objectif principal la **mise en évidence des éléments déterminant le choix de la stratégie thérapeutique initiale devant une polyarthrite indifférenciée récente**, avec comme objectifs spécifiques :

◆ La description des caractéristiques de l'échantillon des sujets inclus dans la Cohorte ESPOIR :

Les **données démographiques et socio-économiques des sujets** (sexe, âge, catégorie socioprofessionnelle, niveau d'instruction, revenus, lieu de résidence), seront décrites.

Les **caractéristiques cliniques de la maladie** dans sa présentation initiale seront également analysées, ainsi que **les résultats biologiques et radiologiques** recueillis lors de l'inclusion au sein de la cohorte.

Elles seront comparées avec la population générale / les populations rencontrées dans d'autres études de cohorte étudiant les rhumatismes inflammatoires.

- ◆ La prise en charge thérapeutique initiale des sujets inclus dans la cohorte sera ensuite étudiée, évaluant le **délai d'initiation** et le **type de traitement de fond** débuté, l'éventuel recours à une **corticothérapie** locale ou régionale, ainsi que l'utilisation de **traitements associés**, médicamenteux ou non (Anti-Inflammatoires non Stéroïdiens, antalgiques, kinésithérapie, appareillage...) ou de traitements locaux intra-articulaires (infiltrations cortisoniques, synoviorthèse...)
  
- ◆ Nous rechercherons ensuite les **facteurs déterminants pour la prise en charge initiale observée** parmi les caractéristiques de la maladie (forme clinique, données anamnestiques et biologiques, radiologiques), celles concernant le patient (données socio-démographiques, existence de facteurs de co-morbidité), et le mode et le lieu de prise en charge (médecin hospitalier ou libéral, urbain ou rural) ...
  
- ◆ L'étude de l'évolution de la Polyarthrite et l'adaptation des thérapeutiques sur la période des 6 premiers mois sera également réalisée, à la recherche des **facteurs déterminants les modifications observées au cours du temps**.

En effet, les changements du type de traitement de fond lors de la prise en charge d'un sujet atteint de polyarthrite rhumatoïde peuvent survenir dès les premiers mois, que l'origine en soit l'inefficacité ou l'apparition d'effets secondaires contraignant à l'abandon du produit en cours, avec en moyenne, selon une méta-analyse récente, un taux de maintien thérapeutique au mieux de 90% environ à 6 mois pour le méthotrexate, et déjà descendu à 80% environ pour d'autres DMARDs comme la sulfasalazine ou les sels d'or injectables (31).

### **III. Matériel et Méthode**

#### **1) Population**

Les sujets inclus doivent être âgés de 18 à 70 ans, présenter une atteinte inflammatoire d'au moins deux articulations périphériques depuis 6 semaines à 6 mois, avec un diagnostic évoqué de Polyarthrite Rhumatoïde débutante ou un rhumatisme inflammatoire inclassé susceptible d'évoluer vers une PR, à l'exclusion d'autres cadres nosologiques rendant improbable le diagnostic de PR.

Ils ne doivent avoir reçu avant l'inclusion aucun traitement de fond ni corticoïdes, sauf si ces derniers ont été administrés pendant moins de deux semaines, à une posologie inférieure à 20 mg/jour et s'ils ont été stoppés au moins deux semaines avant la visite d'inclusion à ESPOIR.

## 2) Echantillon étudié

Notre projet se propose d'utiliser la base de données de la cohorte ESPOIR.

La cohorte **ESPOIR** (Etude et Suivi des **PO**lyarthrites **IND**ifférenciées **R**écentes) est une étude longitudinale prospective descriptive, promue par la **Société Française de Rhumatologie**.

L'objectif principal est la constitution, par un réseau de 14 services recruteurs de Rhumatologie hospitalo-universitaires français, d'une **cohorte multicentrique de sujets présentant une arthrite débutante** (évoluant depuis moins de 6 mois) servant de base de données pour des études d'ordre diagnostique, pronostique, médico-économique, et pathogénique.

Elle consiste en l'observation, le recueil de données et le suivi sur les plans **clinique, biologique, radiologique, médico-économique et histologique**, dans le cadre de protocoles précisément définis, de **800 patients** présentant une **polyarthrite inflammatoire débutante** et répondant aux critères sus-cités. Le recrutement a été débuté en Décembre 2002, avec une fin des inclusions prévue pour Décembre 2004 (714 inclus au 30 Octobre 2004).

**La prise en charge thérapeutique** des patients inclus et suivis est laissée au **libre choix du médecin traitant**, qu'il soit **rhumatologue ou non**, exerçant en **milieu hospitalier ou libéral**.

## 3) Recueil des données

Les données de la cohorte ESPOIR sont recueillies au cours de **visites semestrielles pendant les deux premières années puis annuellement** au-delà **jusqu'à la dixième année**.

Elles concernent plusieurs champs :

**Démographiques :**

- Age, sexe, lieu de naissance, origine ethnique, lieu de résidence du sujet

Social :

- Statut matrimonial, nombre d'enfants, catégorie socio-professionnelle, revenu personnel et familial, niveau d'instruction

**Anamnestiques :**

- Date de début des troubles, existence d'un facteur déclenchant, forme de début (aiguë, subaiguë, progressive...)
- Antécédents personnels, facteurs de co-morbidité connus, intoxication tabagique et éthylique
- Existence de manifestations extra-articulaires rapportées

**Thérapeutiques :**

- Dates, durées, type, posologie des traitements médicamenteux utilisés par le sujet au cours de la période écoulée, en classant les médicaments comme à visée anti-rhumatismale (traitement de fond), symptomatiques (antalgiques par exemple) ou sans rapport direct avec le rhumatisme inflammatoire (indication liée à une pathologie associée)
- Recours éventuels à des gestes complémentaires locaux (infiltrations...)
- Recours à des accessoires (orthèses plantaires, appareillage visant à prévenir les déformations articulaires, cannes...)
- Recours à la chirurgie orthopédique correctrice

**Cliniques :**

- Poids, Taille, Pression artérielle du sujet
- Éléments d'évaluation d'activité de la maladie au jour de la consultation : nombre de réveils nocturnes, durée de dérouillage matinal, Echelle Visuelle Analogique d'appréciation par le sujet de la douleur, des réveils nocturnes et du dérouillage matinal
- Questionnaires de Qualité de vie (HAQ, SF36, EMIR Court, EUROQOL)
- Examen clinique : nombre et localisation des articulations douloureuses et gonflées, existence d'anomalies cliniques extra-articulaires.

### **Biologiques :**

- Bilan biologique initial étendu comportant ionogramme sanguin, bilan phosphocalcique, fonctions hépatique et rénale, électrophorèse des protéines sanguines, hémogramme, bilan d'hémostase, bilan lipidique, bilan inflammatoire (VS, CRP), Uricémie, Sérologie des hépatites B et C, éléments immunologiques avec recherche de Facteur Rhumatoïde, d'Anticorps anti-nucléaires et anti-CCP/filaggrine.

### **Médico-économiques – coûts direct et indirect :**

- Recensement des examens biologiques ou radiologiques réalisés dans le cadre du suivi de la maladie ou sans rapport évident direct
- Existence et dénombrement des consultations de médecine générale ou spécialisée, des séjours hospitaliers éventuels au cours de la période écoulée
- Recours à des soins paramédicaux tels que kinésithérapie, ergothérapie...
- Evaluation des déplacements liés aux soins et leur type (ambulance...)
- Aménagement éventuel du domicile ou du véhicule du sujet
- Retentissement sur l'activité professionnelle, existence d'aides sociales financières ou matérielles

### **Effets indésirables :**

- Les éventuels effets secondaires rencontrés sont répertoriés lors des visites de suivi.

### **Radiologiques :**

. - Chaque patient bénéficie lors du bilan initial d'un cliché thoracique, d'une radiographie des deux mains et poignets de face, des deux avant-pieds de face.

- Toute autre localisation douloureuse pourra faire l'objet d'un cliché radiologique.

Pour le suivi, les clichés porteront systématiquement sur les mains-poignets (cliché de face) et les avant-pieds (cliché de face) chaque année, et éventuellement sur les localisations douloureuses (prescription laissée au choix de l'investigateur).

## **4) Stratégie d'analyse**

La description des variables décrivant les caractéristiques des sujets composant l'échantillon sera effectuée sur un mode univarié, autorisant alors une approche globale des sujets composant la cohorte et la mise en évidence d'éventuelles disparités apparentes.

L'analyse du **choix de stratégie thérapeutique initiale** selon les **éléments déterminants** provenant du **sujet**, de la **maladie** ou du **médecin**, sera faite de manière traditionnelle, permettant dans un premier temps la mise en évidence des facteurs impliqués dans la mise en route précoce d'un traitement de fond, puis en utilisant une méthode multivariée par Analyse des Correspondances Multiples (ACM) avec projection.

Pour étudier l'évolution chronologique des traitements et leur adaptation, des analyses de type GEE (équations d'estimation généralisées) seront réalisées.

Une modélisation markovienne sera ensuite tentée.

#### **IV. Perspectives**

Parallèlement, une analyse de la littérature portant sur la prise en charge de ces polyarthrites récentes est en cours de réalisation, dont les résultats seront utilisés pour émettre des recommandations lors d'une conférence de consensus organisée par l'EULAR (European League Against Rheumatism).

Nous pourrions secondairement analyser les écarts relevés entre les stratégies observées au sein de la cohorte ESPOIR et les recommandations émises par l'EULAR de manière classique et de manière multivariée (modèle logistique) afin de mettre en évidence les facteurs explicatifs de ces éventuelles disparités.

#### **V. Bibliographie**



1. Saraux A, Guedes C, Allain J, Devauchelle V, Valls I, Lamour A et coll. Survey of rheumatoid arthritis and spondylarthropathy in Brittany. *J Rheumatol.* 1999;26:2622-2626
2. Pincus T., Callahan L.F., Sale W.G. et al. Severe functional declines, work disability, and increased mortality in seventy-five rheumatoid arthritis patients studied over nine years. *Arthritis Rheum.* 1984;27:864-872.
3. Dellhag B., Bjelle A. A five-year followup of hand function and activities of daily living in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Care Res.* 1999;12:33-41.
4. Wolfe F., Hawley D.J. The longterm outcomes of rheumatoid arthritis :Work disability : a prospective 18 year study of 823 patients. *J Rheumatol.* 1998;25:2108-2117.
5. Kvalvik A.G., Jones M.A., Symmons D.P. Mortality in a cohort of Norwegian patients with rheumatoid arthritis followed from 1977 to 1992. *Scand J Rheumatol.* 2000;29:29-37.
6. Barrett E.M., Scott D.G., Wiles N.J., Symmons D.P. The impact of rheumatoid arthritis on employment status in the early years of disease : a UK community-based study. *Rheumatol.* 2000;39:1403-1409.
7. Jantti J., Aho K., Kaarela K., Kautiainen H. Work disability in an inception cohort of patients with seropositive rheumatoid arthritis : a 20 year study. *Rheumatology.* 1999;38:1138-1141.
8. Fex E., Larsson B.M., Nived K., Eberhardt K. Effect of rheumatoid arthritis on work status and social and leisure time activities in patients followed 8 years from onset. *J Rheumatol.* 1998; 25:44-50.
9. Weinblatt M.E., Kremer J.M., Bankhurst A.D. et al. A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor : Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *N Engl J Med.* 1999;340:253-259.
10. Markham A., Lamb H.M. Infliximab : a review of its use in the management of rheumatoid arthritis. *Drugs.* 2000;59:1341-1359.
11. Guillemin F, Durieux S, Daures JP, Lafuma A, Saraux A, Sibilia J, Bourgeois P, Sany J. Costs of rheumatoid arthritis in France: a multicenter study of 1109 patients managed by hospital-based rheumatologists.*J Rheumatol.* 2004 Jul;31(7):1297-304.
12. Anderson JJ, Wells G, Verhoeven AC, Felson DT. Factors predicting response to treatment in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:22-29.

13. Quinn MA, Emery P. Window of opportunity in early rheumatoid arthritis : possibility of altering the disease process with early intervention. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:S154-7
14. Bredveld F, Kalden JR. Appropriate and effective management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum. Dis.* 2004;63:627-33
15. Smolen J, Aletaha D, Machold K. Therapeutic strategies in early rheumatoid arthritis. *Bailleres Clini. Rheum.*
16. Nell VP, Machold KP, Eberl G, Stamm TA, Uffmann M, Smolen JS. Benefit of very early referral and very early therapy with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2004 Jul;43(7):906-14. Epub 2004 Apr 27.
17. Emery P. Evidence supporting the benefit of early intervention in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2002;suppl 66:3
18. Arnett FC, Edworthy SM, Block DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-324
19. De Vries-Bouwstra JK, Goekoop-Ruiterman YPM, Van Zeben D, Breedveld FC, Dijkmans BAC, Hazes JMW et al. A comparison of clinical and radiological outcomes of four treatment strategies for early rheumatoid arthritis: Results of the Best trial. *Ann Rheum Dis* 63 (Suppl. 1), 58. 2004
20. Porter DR, Grigor C, Stirling A, Capell HA. A randomized controlled trial of a strategy of tight control of disease activity in rheumatoid arthritis - outcome over 18 months. *Arthritis Rheum* 48 (Suppl), Abstract 515. 2003
21. Aletaha D, Eberl G, Nell VP, Machold KP, Smolen JS. Attitudes to early rheumatoid arthritis: changing patterns. Results of a survey. *Ann Rheum Dis.* 2004 Oct;63(10):1269-75.
22. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Clinical Guidelines. *Arthritis Rheum.* 1996 May;39(5):713-22.
23. Bingham SJ, Buch MH, Tennant A, Emery P. The impact of escalating conventional therapy in rheumatoid arthritis patients referred for anti-tumour necrosis factor-alpha therapy. *Rheumatology (Oxford)*. 2004 Mar;43(3):364-8. Epub 2003 Dec 01.

24. Jacobs JW, Blaauw AA, Dijkmans BA, van Riel PL, Bijlsma JW. Pharmacotherapy of patients with (early) rheumatoid arthritis Ned Tijdschr Geneesk. 2000 Jan 29;144(5):211-6.
25. Verstappen SM, Jacobs JW, Bijlsma JW, Heurkens AH, van Booma-Frankfort C, Borg EJ, Hofman DM, van der Veen MJ ; Utrecht Arthritis Cohort Study Group. Five-year followup drugs versus treatment according to the pyramid approach in the first year. Arthritis Rheum. 2003;48:1797-1807
26. Bijlsma JW, Jacobs JW. The practice guideline 'Rheumatoid arthritis' (first revision) from the Dutch College of General Practitioners: a response from the perspective of rheumatology. Ned Tijdschr Geneesk. 2004 Mar 20;148(12):557-8.
27. Fautrel B, Saraux A, Maillefert JF, Kaye O, Lafforgue P, Flippe RM, Penrod JR, Guillemin F; Club Rhumatisme & Inflammation of the the French Society for Rheumatology. Costs of workups for the diagnosis of early arthritis: results of a nationwide survey. Arthritis Rheum. 2004 Aug 15;51(4):507-12.
28. de Asit N, Le Loet X, Czernichow P, Bertho JM, Delcambre B, Tonnel F, Loyau G, Dapogny C, Treves R, Valat JP, Tauveron P, Sebert JL, Boumier P. How do French rheumatologists treat early rheumatoid arthritis? Rev Rhum Engl Ed. 1996 Mar;63(3):188-95.
29. Maravic M, Berge C, Daures JP, Boissier MC. Survey of practices regarding management of early rheumatoid arthritis by rheumatologists in France. Clin Exp Rheumatol. 2004 May-Jun;22(3):319-27.
30. Criswell LA, Henke CJ. What explains the variation among rheumatologists in their use of prednisone and second line agents for the treatment of rheumatoid arthritis? J Rheumatol. 1995 May;22(5):829-35.
31. Maetzel A, Wong A, Strand V, Tugwell P, Wells G, Bombardier C. Meta-analysis of treatment termination rates among rheumatoid arthritis patients receiving disease-modifying anti-rheumatic drugs. Rheumatology (Oxford). 2000 Sep;39(9):975-81.

**Rôle du demandeur et de ses collaborateurs pour le projet (préciser la fonction de chacun) :**

**Contribution personnelle du demandeur .:**

- Contrôle et correction éventuelle de données manquantes ou aberrantes
- Rédaction, mise en application, adaptation et correction des programmes statistiques d'analyse des données
- Recueil, interprétation, discussion des résultats
- Discussion et rédactions des conclusions

**Collaborations** (indiquer précisément pour chacun) :

-Pr J Pierre Daures ,IURC Montpellier

Rôle dans le projet : Stratégie d'analyse et réalisation d'analyses statistiques

-Pr Francis Guillemin , Chu de Nancy, Innitiateur du projet et co-responsable du DEA

-Pr Bernard Combe, ImmunoRhumatologie,CHU de Montpellier .Encadrement du projet



**PUBLICATIONS DU DEMANDEUR**  
NEANT

Principales publications (5)

Publications ayant trait au thème :

**BUDGET PRÉVISIONNEL DU PROJET DE RECHERCHE**

**1. Somme totale :** **durée prévue de l'étude (ans) : 1 an**

**- achat de matériel**

.....  
.....  
.....

**- Frais de fonctionnement :**

.....  
.....  
.....

**- Salaire / bourse :**

**Bourse de l'EULAR 1 an**

.....  
.....

**2. Organisme déjà sollicité et sommes obtenues**  
**sommes**

·  
·  
·  
·

**3. Organismes déjà sollicités et attendues**

·  
·  
·  
·





**MATERIEL ESPOIR demandé :**

**(préciser s'il s'agit de données démographiques ,clinico-biologiques, ou autres recueillis dans le cadre de la cohorte ou de matériel biologique de la biothèque ; préciser le nombre de patients ou de prélèvements intéressés par la demande et en cas de matériel biologique le volume demandé)**

**Accès à la base de données démographiques et clinico-biologique**

**- il est souhaitable de disposer des données sur l'ensemble de la cohorte.**

Je soussigné(e), ..... m'engage :

-A accepter de passer une convention avec le comité de pilotage de la Cohorte ESPOIR

-A faire figurer le nom d'« ESPOIR » dans le titre ou sous-titre des futures publications ainsi que les noms en tant que co-auteurs de 2 des membres\* de la cohorte ESPOIR (dont 1 membre du comité de pilotage).

-A adresser toute publication 10 jours avant soumission au comité de pilotage de la Cohorte ESPOIR

\*responsable d'un centre clinique ou membre du comité de pilotage

**Nom du demandeur :**

**Signature :**



# **Les anticorps anti-TCR : un ESPOIR pour le diagnostic et le pronostic des polyarthrites rhumatoïdes débutantes**

J-E Gottenberg<sup>1</sup>, F Jambou<sup>2</sup>, S Cohen-Kaminsky<sup>2</sup>, X Mariette<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM E 109, service de Rhumatologie de l'Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre

<sup>2</sup> Département de physiologie thymique, CNRS UMR 8078, Université Paris XI, Hôpital Marie Lannelongue.

## 1. Rationnel

La développement des maladies auto-immunes est lié à un défaut de contrôle des lymphocytes auto-réactifs par les mécanismes physiologiques de régulation immunitaire. La cohorte ESPOIR offre une opportunité unique d'étudier le rôle physiopathologique au cours de la polyarthrite rhumatoïde (PR) d'un mécanisme régulateur récemment identifié : les anticorps anti-récepteurs T (TCR). Au cours de la PR et d'autres maladies auto-immunes, les lymphocytes T auto-réactifs utilisent un répertoire immunologique biaisé faisant appel de manière préférentielle à certains gènes codant pour la région variable (V) de leur TCR (1). Afin de limiter la survenue de manifestations auto-immunes liées à ces lymphocytes T auto-réactifs, deux mécanismes homéostatiques peuvent être mis en action : les lymphocytes T spécifiques anti-TCR et les anticorps anti-TCR (2). Les anticorps anti-TCR existent chez l'homme à l'état physiologique, leur sécrétion est augmentée avec l'âge, lors de certaines infections virales, comme le VIH, de situations d'allo-immunisation (transplantation, grossesse) et de certaines maladies auto-immunes (myasthénie, lupus érythémateux disséminé). L'effet immuno-modulateur de ces anticorps anti-TCR pourrait expliquer en partie l'efficacité des immunoglobulines polyvalentes (3) et motive les essais de vaccination

dans la sclérose en plaque et le psoriasis par des peptides spécifiques de la région CDR2 du TCR (4).

Le rôle protecteur des anticorps anti-TCR a été bien démontré dans la myasthénie par une équipe française. Après avoir montré l'augmentation intra-thymique des lymphocytes V $\beta$ 5.1, qui est le TCR dominant de reconnaissance de certains épitopes du récepteur de l'acétylcholine, cible auto-antigénique dans la myasthénie, cette équipe a montré que l'injection d'anticorps monoclonal anti- V $\beta$ 5.1 permet de prévenir l'apparition de la maladie dans les modèles animaux. De manière passionnante, chez les patients, la présence de ces anticorps est restreinte aux patients HLA-DR3, et est très majoritairement retrouvée chez les patients ayant une myasthénie d'apparition récente et une atteinte clinique moins sévère. De plus, la présence de titres élevés de ces anticorps anti-TCR est facteur de bon pronostic (5).

Les résultats de cette étude suggèrent que le développement de la réponse humorale anti-TCR est contemporaine des premiers symptômes ; un déficit de synthèse des anticorps anti-TCR pourrait participer au développement de l'auto-immunité et/ou empêcher la guérison spontanée des patients.

Au cours de la polyarthrite rhumatoïde, le répertoire du récepteur T des lymphocytes CD4 et CD8 sanguins et infiltrant la synoviale peut présenter des biais en faveur de l'utilisation préférentielle de certains gènes V $\beta$  (6,7,8,9). Ainsi une expansion oligo-clonale des gènes V $\beta$  3 , 14 (7) et 17 (7,8) du TCR a-t-elle été retrouvée dans les lymphocytes sanguins et synoviaux CD4. Un essai randomisé contre placebo a montré la tolérance et l'efficacité (ACR 20) à 20 semaines d'une vaccination par une combinaison des 3 peptides V $\beta$  3, 14 et 17 du TCR chez 66 patients atteints de PR (10).

Les anticorps anti-TCR ont également été retrouvés chez les patients ayant une PR (11), mais leur présence n'a pas été recherchée dans les rhumatismes inflammatoires
---

indifférenciés et l'intérêt diagnostique et pronostique de ces anticorps n'a pas été évalué.

La cohorte ESPOIR peut donc permettre de déterminer si les anticorps anti-TCR apparaissent précocement et spécifiquement au cours de la PR et si leur présence et l'évolution de leur taux sont des marqueurs pronostiques.

## 2. Adéquation de l'étude des anticorps anti-TCR à la cohorte ESPOIR

Les moyens d'évaluer aisément le diagnostic et le pronostic d'un rhumatisme inflammatoire débutant restent limités. La prise en charge précoce, les prélèvements biologiques et le suivi clinique à long terme réalisés dans le cadre du suivi de cohorte ESPOIR pourront permettre d'identifier l'intérêt diagnostique et pronostique d'un dosage sérologique des anticorps anti-TCR.

## 3. Objectifs de l'étude

- étudier la présence des anticorps anti-TCR au cours des rhumatismes inflammatoires débutants : prévalence des anti-TCR dans les PR par rapport aux autres rhumatismes inflammatoires, corrélation aux expansions clonales du répertoire T
- analyser la corrélation entre le titre des anticorps anti-TCR et la sévérité de la maladie, appréciée par le DAS28 et le score radiologique de Sharp
- évaluer la relation entre HLA (épitope partagé), sécrétion des anti-TCR et des anticorps anti-CCP

## 4. Collaboration

Cette étude pourra bénéficier de l'entière collaboration de l'équipe qui a démontré le rôle des anti-TCR au cours de la myasthénie :

Drs Florence Jambou et Sylvia Cohen-Kaminsky, Département de physiologie thymique, CNRS UMR 8078, Université Paris XI, Hôpital Marie Lannelongue.

#### 5. Techniques utilisées

- étude du répertoire T (par PCR long range multiplex [12] ) afin de détecter les expansions clonales des gènes du TCR. Cette technique récente permet d'étudier le répertoire T  $V\alpha$ ,  $V\beta$  complet à partir de l'ADN génomique.
- recherche des anticorps anti-TCR par ELISA (F. Jambou, S. Cohen-Kaminsky). Cet ELISA « maison » utilise comme antigènes les différents peptides  $V\beta$  de la région CDR2 du TCR.
- typage HLA classe II en biologie moléculaire (recherche de l'épitope partagé).

#### 6. Matériel biologique

- 1 ml de sérum (à l'inclusion et après 1 an de suivi) de 200 patients ayant une PR et de 200 patients ayant un autre rhumatisme inflammatoire
- 2,5 microgrammes d' ADN de 200 patients ayant une PR et de 200 patients ayant un autre rhumatisme inflammatoire.

## 7. Références

- (1) Schluter SF, et al. Autoregulation of TCR V region epitopes in autoimmune disease. *Adv Exp Med Biol* 1995 ;383 : 231-236
- (2) Jambou F, et al. Immunoregulation by V $\beta$  specific antibodies in myasthenia gravis: mining physiological T cell homeostasis for TCR specific therapy. *Cell Mol Biol* 2003; 49:181-192.
- (3) Kazatchine MD, et al. Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with normal polyspecific human IgG (intravenous immunoglobulin, IVig). *New Engl J Med* 2001;345: 747-755.
- (4) Vandenbark AA, et al. TCR peptide therapy in human autoimmune diseases. *Neurochem Res* 2001;26:713-730
- (5) Jambou F, et al. Circulating regulatory anti-T cell receptor antibodies in patients with myasthenia gravis. *J Clin Invest* 2003;112:265-274.
- (6) Stamenkovic I, et al. Clonal dominance among T-lymphocyte infiltrates in arthritis. *Proc Natl Acad Sci* 1988;85:1179-83.
- (7) Goronzy JJ, et al. Dominant clonotypes in the repertoire of peripheral CD4<sup>+</sup> T cells in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1994;94:2068-76.
- (8) Li Y, et al. CDR3 sequence motifs shared by oligoclonal rheumatoid arthritis synovial T cells. Evidence for an antigene-driven response. *J Clin Invest* 1994;94: 2525-31.
- (9) Hall FC, et al. TCR V $\beta$  spectratyping in RA: evidence of clonal expansions in peripheral blood lymphocytes. *Ann Rheum Dis* 1998;57:319-22.
- (10) Moreland LW, et al. T cell receptor peptide vaccination in rheumatoid arthritis: a placebo-controlled trial using a combination of Vbeta3, Vbeta14, and Vbeta17 peptides. *Arthritis Rheum* 1998;41:1919-29.
- (11) Landsperger WJ, et al. Fine specificity analysis of autoantibodies to T cell receptor CDR1 segment in rheumatoid arthritis. *Ann NY Acad Sci* 1997;815:459-461
- (12) Pasqual N, et al. Quantitative and qualitative changes in V-J alpha rearrangements during mouse thymocytes differentiation: implication for a limited T cell receptor alpha chain repertoire. *J Exp Med* 2002 ;196:1163-1173.

C Miceli-Richard, F Lavie, JE Gottenberg, X Mariette

INSERM E 109, service de Rhumatologie de l'Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre

## 1. BAFF et pathologies auto-immunes

BAFF (B cell Activator Factor of the tumor necrosis factor (TNF) Family), encore appelé BLyS (B Lymphocyte Stimulator) est un composant de la superfamille du TNF récemment isolé (1). BAFF est une protéine transmembranaire de type 2 comportant 285 acides aminés présente également sous forme soluble après clivage enzymatique (2-4). Cette cytokine peut se lier à trois types de récepteurs transmembranaires appartenant à la famille des TNF-récepteurs exprimés par le lymphocyte B : BCMA (B cell maturation antigen), TACI (transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor) et BAFF-R (ou BR3).

Différents travaux ont montré le rôle de BAFF dans la maturation et la survie lymphocytaire B (5-7). Son rôle dans la modulation de la réponse immune a également été évoqué. Ainsi une hyperexpression de BAFF pourrait permettre un échappement des lymphocytes B auto-réactifs aux processus de sélection négative, favorisant ainsi leur survie et donc la survenue de maladies auto-immunes.

Le rôle de BAFF au cours des maladies auto-immunes a été mis en évidence notamment par l'étude d'un modèle animal de souris transgéniques pour BAFF (8). Ces souris développent une hyperplasie lymphoïde B des organes lymphoïdes secondaires intéressant les centres germinatifs ganglionnaires et spléniques avec une hyperlymphocytose B sanguine, une grande quantité d'auto-anticorps (facteur rhumatoïde et anticorps anti-ADN), une activation lymphocytaire T CD4 et CD8 et des signes cliniques séquentiels évoquant à la fois une polyarthrite rhumatoïde, un lupus (glomérulonéphrite) et un syndrome de Sjögren. Elles présentent en effet avec l'âge des lésions de sialadénite sévère, une diminution de la



production de salive et une destruction des glandes sous-maxillaires, comparables aux constatations faites au cours du SSp (9).

Un inhibiteur de BAFF, le récepteur soluble TACI-Ig diminue significativement les symptômes dans les modèles de souris lupiques NZB\*NZW F1 (augmentation de la survie et diminution de la protéinurie) et diminue la progression de l'inflammation et de la destruction articulaire dans les modèles murins d'arthrite au collagène, modèle expérimental de polyarthrite rhumatoïde (10, 11).

Chez l'homme, la concentration sérique de BAFF est augmentée au cours de différentes maladies auto-immunes telles la polyarthrite rhumatoïde (PR), le lupus systémique (LES) et le syndrome de Sjögren primitif (SSp) comparativement aux sujet sains (12-14). Une corrélation entre les taux sériques de BAFF et facteur rhumatoïde est observée au cours de la PR (12). Une telle corrélation a été rapportées avec d'autres auto-anticorps : anticorps anti-ADN au cours du LES (13) et notre groupe a montré une corrélation entre le taux sérique de BAFF et la présence d'anticorps anti-SSA au cours du SSp (14).

Les polymorphismes génétiques de BAFF ont été étudiés chez des patients atteints de PR. Aucune association significative n'a pu être mise en évidence (15). Néanmoins, les polymorphismes rapportés concernaient une population Japonaise. Pour cette raison, un séquençage du promoteur, des 6 exons et des régions introniques flanquantes a été effectué par notre groupe chez des patients ayant un SSp et des témoins, tous d'origine Caucasienne. Un polymorphisme du promoteur (-871T/C) a été mis en évidence avec une fréquence suffisante dans la population caucasienne (>5%) pour être génotypé dans une étude d'association cas-témoins. L'étude de ce polymorphisme dans une population de patients caucasiens atteints de PR n'a pas été effectuée à ce jour. Nos premiers résultats laissent penser que ce polymorphisme, situé dans le site consensuel de liaison du facteur de transcription NFkB, pourrait avoir un rôle fonctionnel sur le niveau d'expression sérique de la protéine BAFF et de l'ARNm de BAFF.

## 2. BAFF et PR : hypothèses physiopathogéniques

Le profil cytokinique de la PR est de type Th1 avec entre autre une sécrétion d'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) et d'interleukine 2 (IL-2). L'IFN $\gamma$  (comme l'IL-10) est connu pour augmenter l'expression de BAFF par les monocytes et les cellules dendritiques (16). L'augmentation sérique de BAFF rapportée au cours de la PR pourrait donc être dépendante du niveau d'expression systémique d'IFN $\gamma$ .

Une corrélation entre le niveau d'expression sérique de BAFF et le profil cytokinique du rhumatisme inflammatoire étudié pourrait ainsi être observée. Dans un rhumatisme débutant, le dosage sérique de BAFF pourrait alors constituer l'un des éléments prédictifs d'évolution vers une PR. Une production locale de BAFF dans les articulations étant le siège d'une arthrite a été mise en évidence au cours de la PR (12) et au cours d'arthrites d'autres origines, non infectieuses (17). Le taux synovial de BAFF était significativement plus élevé en cas d'arthrite comparativement à une population de patients ayant un épanchement articulaire d'origine mécanique (17). Par ailleurs, les taux sériques de BAFF étaient inférieurs aux taux mesurés dans le liquide synovial. Cette observation suggère une production locale de BAFF. Cette production pourrait être expliquée par l'infiltrat monocytaire et macrophagique présent au sein du pannus synovial mais en situation pathologique d'auto-immunité, BAFF pourrait également être exprimé par d'autres cellules que la lignée monocyte-macrophage : lymphocytes T activés, lymphocytes B ou synoviocytes. Ainsi, au cours du SSp, notre groupe a montré l'expression de BAFF par les lymphocytes T infiltrant les glandes salivaires, contrairement à ce qui est observé chez les sujets sains ou atteints de sarcoïdose (18).

Le rôle potentiel de BAFF dans la physiopathogénie de la PR est à ce jour méconnu. Une production locale de BAFF pourrait favoriser la survie des lymphocytes B, la formation de centres germinatifs ectopiques au sein de la membrane synoviale, la commutation isotypique et la production locale de facteur rhumatoïde IgG et d'anticorps anti-peptides citrullinés.

Par ailleurs, si l'observation de taux sériques élevés de BAFF au cours de la PR a été rapportée, aucune corrélation de ce taux avec l'activité de la maladie et/ou son évolution structurale n'a été recherchée.



### 3. Objectifs du projet de recherche

L'objectif de ce travail de recherche est d'étudier l'expression de BAFF dans une cohorte de rhumatismes inflammatoires indifférenciés et dans le groupe de patients ayant évolués vers une PR :

- a. Mesure du taux sérique de BAFF et quantification de l'ARNm de BAFF des PBMC par PCR-Q (si le nombre d'échantillons d'ARNm analysable est suffisant):
  - comme facteur prédictif d'évolution vers une PR
  - comme facteur corrélé à l'activité de la PR
  - comme facteur prédictif de sévérité structurale de la PR
  
- b. Etude de l'expression synoviale de BAFF :
  - Mesure de la concentration de BAFF dans le liquide synovial
  - Détection de BAFF en immuno-histochimie et analyse des différentes populations cellulaires exprimant BAFF dans la membrane synoviale
  
- c. Etude du polymorphisme -871C/T du promoteur de BAFF :
  - Recherche d'une association avec la PR (approche cas-témoins)
  - Recherche d'une corrélation entre les variants alléliques de ce polymorphisme et le niveau d'expression sérique de BAFF

### 4. Méthodes

4.1 Mesure de l'expression de BAFF sérique et dans le liquide synovial par technique ELISA.

- a. Etude de l'expression de BAFF comme facteur prédictif d'évolution vers une PR :

Mesure de BAFF soluble dans le sérum des patients à l'inclusion dans ESPOIR. Un kit ELISA BAFF a été développé par le Pr Dominique Emilie – IFR cytokines – Hôpital Antoine Béchère. Il est à noter que kit ELISA BAFF commercialisé par R & D a été retiré du marché.

Recherche d'une expression différentielle initiale de BAFF entre patients ayant évolué vers une PR et le groupe de patient ayant un rhumatisme resté indifférencié ou ayant évolué vers un autre rhumatisme inflammatoire que la PR après 2 ans d'évolution. Cette quantification sera effectuée chez 200 patients et utilisera 20 µl de sérum par individu.

b. Corrélation de l'expression de BAFF avec l'activité de la PR

Mesure de BAFF soluble dans le sérum (kit ELISA) des patients de la cohorte ESPOIR ayant un diagnostic de certitude de PR. Recherche d'une corrélation de ce taux sérique à des facteurs clinico-biologiques d'activité de la maladie (DAS28, VS, CRP) à J0, 1 an et 2 ans.

c. Mesure du taux sérique de BAFF comme facteur prédictif de sévérité structurale de la PR

Mesure de BAFF soluble dans le sérum des patients de la cohorte ESPOIR ayant un diagnostic de certitude de PR. Recherche d'une corrélation de ce taux sérique à l'inclusion (M0), avant traitement, avec la sévérité structurale de la PR à 2 ans.

d. Quantification de l'ARNm de BAFF sur des PBMC (en fonction du nombre d'échantillons disponibles)

Recherche d'une corrélation entre le niveau d'expression de l'ARNm de BAFF et les paramètres étudiés précédemment (facteurs prédictifs d'évolution vers une PR, d'activité de la PR et de la sévérité structurale de la PR). La PCR-quantitative de BAFF est actuellement utilisé en routine dans notre laboratoire sur des PBMC de patients atteints de SSp.

d. Mesure de la concentration de BAFF dans le liquide synovial

Mesure de BAFF soluble dans le liquide synovial (kit ELISA) des patients de la cohorte ESPOIR ayant un diagnostic de certitude de PR. Recherche d'une corrélation de ce taux synovial à l'inclusion (M0), avant traitement local, avec la sévérité structurale de l'articulation concernée à 2 ans. Comparaison au taux sérique de BAFF au même moment (M0). Comparaison au niveau d'expression de BAFF dans les différentes populations cellulaires de la membrane synoviale en immunofluorescence et immunohistochimie (cf infra).

4.2 Etude de l'expression in situ de BAFF par immunohistochimie et immunofluorescence in situ.

Mise en évidence de l'expression in situ de BAFF par immunohistochimie utilisant un anticorps spécifique anti-BAFF appelé Buffy-2 (Apotech Product, Lausanne, Switzerland). Recherche d'une expression de BAFF sur les biopsies de membrane synoviale dans les lymphocytes T (anti CD4, CD8 et D3), lymphocytes B (anti CD20) et dans les synoviocytes par double marquage en immunofluorescence et analyse en microscopie confocale.

#### 4.3 Etude du polymorphisme -871C/T du promoteur de BAFF

Analyse effectuée à partir de l'ADN extrait des cellules du sang périphérique des patients. Amplification PCR du fragment d'intérêt utilisant des amorces spécifiques de la région promotrice de BAFF. Génotypage du polymorphisme par digestion avec une enzyme de restriction (Fau I). Etude d'association analysant l'ADN de 200 patients et de 200 témoins disponibles au laboratoire. Recherche d'une corrélation entre génotype (CC, CT ou TT) et taux sériques de BAFF.

### 5. Retombées attendues

Notre groupe, fortement impliqué dans l'étude de BAFF au cours du SSp, dispose des outils permettant de caractériser l'expression sérique et synoviale de BAFF au cours de la PR. La corrélation entre niveau d'expression sérique et/ou synovial de BAFF et évolution structurale ou activité clinico-biologique de la maladie sera également possible. La collection de matériels biologiques variés (tissu synovial, sérum, ADN, ARN pour certains patients) dans une cohorte de patients ayant une PR débutante ou un rhumatisme inflammatoire encore indifférencié constitue une opportunité unique de progresser dans la compréhension du rôle de BAFF dans la physiopathogénie de la PR.

En effet, compte tenu l'importance potentielle de BAFF, l'inhibition de cette molécule représente un espoir thérapeutique. Dans deux modèles murins de maladies autoimmunes, les souris NZB/W et l'arthrite au collagène, il existe une diminution importante des signes cliniques avec un traitement par un inhibiteur de BAFF : le récepteur soluble TACI combiné à

un fragment Fc d'immunoglobuline. Les résultats de la première étude de phase 1 chez l'homme dans le lupus avec un anticorps monoclonal anti-BAFF entièrement humanisé, le LymphoStat-B\* ont été récemment présentés (Furie, ACR 2003). En dehors de résultats de tolérance très rassurants, cette phase 1 laisse entrevoir des espoirs thérapeutiques. En effet, chez les patients traités par la dose la plus forte : 20 mg, il existe une diminution d'environ 50 % du taux de lymphocytes B circulants et une diminution d'environ 40 % du titre d'anticorps anti-ADN double brin. Ainsi, il semble bien que l'inhibition de BAFF puisse entraîner une diminution du nombre des lymphocytes B autoréactifs et du titre des auto-anticorps dans les pathologies autoimmunes. Ainsi, une meilleure caractérisation du rôle de BAFF dans la physiopathogénie de la PR est de prime importance pour les développements thérapeutiques futurs.

## REFERENCES

- 1- Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, et al. BLYS, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med* 1999 ; 189 : 1747-56.
- 2- Moore PA, Belvedere O, Orr A, Pieri K, LaFleur DW, Feng P, et al. BLYS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science*. 1999 ; 285 : 260-3.
- 3- Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, Ambrose C, Baetscher M, Schneider P, et al. Mice transgenic for BLYS develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med*. 1999 ;190 :1697-710.
- 4- Kanakaraj P, Migone TS, Nardelli B, Ullrich S, Li Y, Olsen HS, et al. BlyS binds to B cells with high affinity and induces activation of the transcription factors NF-kappaB and ELF-1. *Cytokine*. 2001 ; 13 : 25-31.
- 5- Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, Cachero TG, Shulga-Morskaya S, Dobles M et al. An essential role for BLYS in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* 2001 ; 293 : 2111-4.
- 6- Gross JA, Dillon SR, Mudri S, Johnston J, Littau A, Roque R. TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking BLYS. *Immunity*. 2001 ; 15 : 289-302.
- 7- Mackay F, Browning JL. BLYS: a fundamental survival factor for B cells. *Nat Rev Immunol*. 2002 ; 2 : 465-75.
- 8- Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, Ambrose C, Baetscher M, Schneider P, et al. Mice transgenic for BLYS develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med*. 1999 ;190 : 1697-710.
- 9- Groom J, Kalled SL, Cutler AH, Olson C, Woodcock SA, Schneider P, et al. Association of BLYS/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome. *J Clin Invest*. 2002 ;109 :59-68.
- 10- Gross JA, Johnston J, Mudri S, Enselman R, Dillon SR, Madden K, et al. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature*. 2000 ; 404 : 995-9.



- 11- Zhang HG, Yang P, Xie J, Liu Z, Liu D, Xiu L et al. Depletion of collagen II-reactive T cells and blocking of B cell activation prevents collagen II-induced arthritis in DBA/1j mice. *J Immunol.* 2002 ;168 : 4164-72.
- 12- Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, Stohl W. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 2001 ; 44 : 1313-9.
- 13- Zhang J, Roschke V, Baker KP, Wang Z, Alarcon GS, Fessler BJ, et al. Cutting edge : a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2001 ;166 : 6-10.
- 14- Mariette X, Roux S, Zhang J, Bengoufa D, Lavie F, Zhou T, et al. The level of BLyS (BLYS) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2003 ; 62 ; 168-71.
- 15- Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, Hashimoto H, Tokunaga K. Analysis on the association of human BLYS (BAFF, TNFSF13B) polymorphisms with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* 2002 ; 3: 424-9.
- 16- Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, Moore PA, Olsen HS, Migone TS, et al. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood.* 2001 ; 97 : 198-204.
- 17- Tan SM, Xu D, Roschke V, Perry JW, Arkfeld DG, Ehresmann GR, Migone TS, Hilbert DM, Stohl W. Local production of B lymphocyte Stimulator Protein and APRIL in arthritic joints of patients with inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48:982-92.
- 18- Lavie F, Miceli-Richard C, Quillard J, Roux S, Leclerc P, Mariette X. Expression of BAFF (BlyS) in T cells infiltrating labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *J Pathol* 2004; 202:496-502.

#### IV- Remarques des Reviewers

##### **REVIEWER 1**

Rapport d'analyse concernant l' «Identification des déterminants de la prise en charge initiale d'une polyarthrite débutante» par Mr Cédric Lukas, Interne dans le service du Pr Combe, immuno-rhumatologie, CHU Lapeyronie

La justification de l'étude repose sur les données de la littérature et est pleinement justifiées par le manque d'argument pour choisir les thérapeutiques initiales des polyarthrites récentes.

La cohorte Espoir, matériel de l'étude, parfaitement définie pourrait permettre de remplir l'objectif qui est de mettre en évidence des éléments déterminants la stratégie thérapeutique des polyarthrites indifférenciées.

Les objectifs principaux sont de décrire les choix des différentes stratégies employées par les thérapeutes suivant les patients inclus dans la cohorte Espoir. Le recueil des données dépend donc de la cohorte elle-même. La méthodologie statistiques est succinctement décrites mais semble appropriée reposant sur une analyse univariée, puis sur une ACM. Les analyses GEE et la modélisation markovienne sont mentionnées. La bibliographie concernant les analyses statistiques et leur choix n'est pas mentionnée.

La faisabilité est évidente en ce qui concerne le recueil de données. Il n'est pas précisé le cadre exact de l'analyse qui sera réalisée par l'étudiant (stage de DEA, thèse de sciences, disponibilité clinique ou formation médicale en cours). Cependant le rattachement à un centre source de la cohorte Espoir ainsi que l'inscription en DEA de méthodologie de l'investigateur sont une garantie que ces analyses seront menées à leur terme.

Cette étude devrait rendre le service attendu qui est de préciser les choix stratégies utilisées en France pour le traitement des polyarthrites récentes.

Il faut rappeler qu'aucun financement n'est demandé, ni de matériel biologique (ce qui n'apparaît pas dans la demande mais semble évident compte-tenu de la méthodologie choisie).

En conclusion il s'agit d'une étude reposant sur l'analyse des données cliniques de la cohorte espoir répondant aux questionnements inhérents au traitement des polyarthrites récentes, et donc représentant un bénéfice évident pour la communauté médicale et les patients. Devant une méthodologie correcte, et du fait d'objectifs clairs et adaptés, l'avis est très favorable.

Toutefois il serait souhaitable que l'investigateur définisse des objectifs en terme de durée pour l'analyse des données, qui sont en cours de recueil et le seront au moment de l'analyse.

**REVIEWER 2** Rapport d'analyse concernant l' «Identification des déterminants de la prise en charge initiale d'une polyarthrite débutante» par Mr Cédric Lukas, Interne dans le service du Pr Combe, immuno-rhumatologie, CHU Lapeyronie

Reviewing non reçu

**REVIEWER 1 :** projet "Identification par analyse protéomique de nouvelles populations d'autoanticorps pouvant contribuer à l'élaboration d'algorithmes pronostiques chez les malades atteints de polyarthrite rhumatoïde dans la cohorte ESPOIR." Par X Vittecoq et X Le Loet

L'approche est tout à fait pertinente et l'étude du protéome à la recherche de nouveaux marqueurs un abord original. Pas de problème de méthodologie, par contre un point me paraît être soulevé à savoir la faisabilité de l'analyse de 400 prélèvements par cette approche (MALDI-TOF) avec isolement des protéines d'intérêt, puis genèse de protéines recombinantes, puis fixation sur billes pour criblages de cellules. En dehors de ce point le projet me paraît devoir être soutenu.

**REVIEWER 2** : projet "Identification par analyse protéomique de nouvelles populations d'autoanticorps pouvant contribuer à l'élaboration d'algorithmes pronostiques chez les malades atteints de polyarthrite rhumatoïde dans la cohorte ESPOIR." Par X Vittecoq et X Le Loet

Critique du projet projet manuscrit soulignant deux questions :

- Le serum M0 est-il indispensable à ce projet ?
- Si oui, peut-on réduire le volume.

Le manuscrit est adressé à l'équipe de Rouen.

**REVIEWER 1 : Utilité de la radiographie des avant-pieds de  $\frac{3}{4}$  pour la détection des érosions des rhumatismes inflammatoires débutants**

Je ne suis pas sûre d'avoir bien compris ce que tu entendais par "juger la possibilité d'attribuer du matériel ESPOIR au demandeur".

J'ai lu le dossier qui me paraît clair, très intéressant et facilement réalisable. La lecture des radios de F et  $\frac{3}{4}$  pourrait cependant être réalisée de façon indépendante, et confrontée à une nouvelle lecture des 2 clichés en même temps afin d'éviter que l'analyse du cliché de  $\frac{3}{4}$  ne soit influencée par celle de face. Le cliché de  $\frac{3}{4}$  est en effet peut être supérieur à la face...

**REVIEWER 2 : Utilité de la radiographie des avant-pieds de ¾ pour la détection des érosions des rhumatismes inflammatoires débutants**

Responsable principal : A. Saraux, Brest

L'objectif principal de ce travail est d'étudier l'utilité de la radiographie des avant-pieds de ¾ pour détecter des érosions des avant-pieds.

Les objectifs secondaires sont : (i) étude de l'utilité du cliché de ¾ selon la présence de signes cliniques d'atteinte des avant-pieds ; (ii) étude de l'utilité du cliché de ¾ selon la certitude du clinicien du diagnostic de polyarthrite rhumatoïde et selon la présence des critères ACR 1987 de polyarthrite rhumatoïde ; (iii) étude de l'apport de l'échographie et de l'IRM des avant-pieds *versus* radiographies standard.

En ce qui concerne **l'objectif principal** ne s'agit-il pas plutôt de l'étude de la "fréquence des **érosions supplémentaires** décelée par les radiographies de ¾ des avant-pieds". Ne faudrait-il pas aussi étudier la concordance érosion - radiographie standard / érosion - ¾ ?

En ce qui concerne les objectifs secondaires : (i) ne s'agit-il pas plutôt du lien entre érosions décelées sur les radiographies de ¾ et signes cliniques ; (ii) n'y a-t-il pas risque d'un raisonnement circulaire dans la mesure où l'assurance du diagnostic de PR par le clinicien dépend en grande partie de la présence d'érosion ; enfin en ce qui concerne (iii) comment va-t-on procéder pour évaluer l'apport de l'échographie et de l'IRM *versus* les radiographies standard ?

**Description du projet de recherche** (malades, techniques, méthodologie, déroulement prévu) : il est proposé de calculer le pourcentage de patients ayant une atteinte érosive des avant-pieds par deux méthodes distinctes : présence d'érosion : oui / non et score de Sharp vdH. Il s'agit là d'une autre question sous ensemble de la question principale... à ce propos la présence d'érosion selon une méthode binaire sera-t-elle recherchée aux mêmes sites articulaires des avant-pieds que ceux définis par la méthode de Sharp vdH.

Au total, projet intéressant et pertinent sous réserve de :

- Vérifier que la qualité recommandée pour les clichés des avant-pieds soit bonne (quid des clichés de mauvaise qualité ?)

- Préciser de façon plus détaillée la procédure de lecture : on suppose notamment que les clichés de  $\frac{3}{4}$  seront présentés en même temps que les clichés de face du même patient...
  - Y aura t-il un consensus pour la phase de lecture binaire ? sinon quid ?
  - Pour le Sharp vdH quel score retiendra t-on : le score moyen ? mais ici on ne s'intéresse qu'à la présence oui / non ? Comment faire un Sharp sur un cliché de  $\frac{3}{4}$  ?
  
- S'intéresser principalement voire exclusivement à la sensibilité comparée des radiographies des avant-pieds de face et des avant-pieds de  $\frac{3}{4}$  + de face pour déceler des érosions : étude de la concordance.
  
- Par ailleurs quel est le rôle des experts B. Combe et M. Dougados ?

Ce projet a l'avantage de pouvoir être réalisé dès maintenant d'autant qu'aucun budget spécifique n'est nécessaire.

En prenant en compte les remarques précédentes, la mise à disposition du matériel Espoir au demandeur paraît tout à fait légitime.



**REVIEWER 1** Etude d'association entre des polymorphismes de gènes de métalloprotéases matricielles et le caractère persistant et érosif à 1 an d'un rhumatisme inflammatoire débutant  
Présenté par : Arnaud CONSTANTIN,

Projet basique, très standard, visant à tester l'hypothèse de gènes candidats associés à un pronostic érosif péjoratif au cours de polyarthrites débutantes.

La cohorte ESPOIR se prête parfaitement à ce travail qui a pour but de repérer par des marqueurs génétiques les polyarthrites qui vont devenir érosives et persistantes, qu'il s'agisse de PR ou de non PR au terme de la première année de suivi.

Les deux gènes testés seront les gènes codant pour les MMP1 et MMP3 et les variants alléliques étudiés portent sur le polymorphismes des régions promotrices.

Une telle étude est basée sur des travaux provenant de deux groupes différents dont celui du demandeur et ayant montré une relation entre sévérité anatomique de la PR et polymorphisme du gène de MMP3. Les résultats pour MMP1 sont actuellement discordants et une troisième cohorte (ESPOIR) permettrait de trancher (le mieux serait sans doute une étude de familles PR plutôt que l'étude de cohortes).

La faisabilité est excellente puisqu'il s'agit de répéter sur ESPOIR un travail déjà effectué par cette équipe sur sa propre cohorte « Midi-Pyrénées ».

L'originalité est donc « modeste » et je suggérerais plutôt de tester cette hypothèse sur les familles de PR disponibles à GenHotel.

Le budget devrait être obtenu par le PHRC régional (demandé) et l'Association Midi-Pyrénées santé (déjà obtenu).

**REVIEWER 2** Etude d'association entre des polymorphismes de gènes de métalloprotéases matricielles et le caractère persistant et érosif à 1 an d'un rhumatisme inflammatoire débutant  
Présenté par : Arnaud CONSTANTIN,

*INTÉRÊT SCIENTIFIQUE* : Le demandeur a précédemment étudié l'association entre certains polymorphismes des gènes des MMP-1 (collagénase-1) et MMP-3 (stromélysine) et la sévérité structurale de la PR. Une association a été mise en évidence par 2 équipes indépendantes pour la MMP-3, alors que les résultats étaient discordants pour la MMP-1. L'objectif du projet proposé est de tester l'association entre des polymorphismes situés dans les promoteurs de chacun de ces deux gènes et le caractère persistant et érosif à 1 an des polyarthrites incluses dans la cohorte ESPOIR. En cas d'association non fortuite, une analyse multivariée sera réalisée pour faire ressortir les paramètres prédictifs les plus pertinents. L'intérêt scientifique est certain, la cohorte ESPOIR représentant une excellente opportunité de tester ce type d'hypothèse.

*QUALITÉ MÉTHODOLOGIQUE* :

Les techniques de génotypages sont mises au point au laboratoire et ne posent apparemment pas de problème particulier, si l'on en croit les publications du demandeur sur le sujet.

La méthodologie de l'analyse statistique s'appuie sur l'expertise de l'unité INSERMU558 d'Anne Cambon-Thomsen, sur l'organigramme de laquelle figure le demandeur.