

Auto-immunité et pronostic de l'hypertension artérielle pulmonaire
Auto-HTAP

VERSION n°1.1 du 19 octobre 2009

Promoteur :

Assistance Publique des Hôpitaux de Paris
Délégation régionale à la recherche clinique
Carré Historique – Hôpital Saint-louis
1, avenue Claude Vellefaux
75010 Paris
Chef de projet : Dr Saliha Djane
Tel 01 44 84 17 45 / Fax 01 44 84 17 99

Investigateur coordonnateur:

Pr Luc MOUTHON
Service de Médecine interne
Hôpital Cochin,
27 rue du Faubourg St Jacques
75679 PARIS Cedex 14
Tel 01 58 41 20 31 / Fax 01 58 41 14 50

UPRES EA 4058 – Faculté de Médecine Paris Descartes
Pavillon Gustave Roussy, 4ème étage
8 rue Méchain
75014 PARIS

Unité de Recherche Clinique :

URC Paris Centre
Site Tarnier
89 rue d'Assas
75006 PARIS
Chef de projet : Mélanie Annoussamy, PhD
Tel :01 58 41 28 84 / Fax :01 58 41 11 83

Comité de Pilotage : Pr Luc Mouthon

Un représentant du service de Biostatistiques du Pr Coste - Cochin

Chef de projet DRCD : Dr Saliha Djane

Chef de projet URC : Mme Mélanie Annoussamy

ARC de l'étude

**Page de SIGNATURE D'UN PROTOCOLE de recherche biomédicale
par l'investigateur COORDONNATEUR et le représentant du PROMOTEUR**

Recherche biomédicale N° **P071209**

code : **Auto-HTAP**

Titre : «Auto-HTAP – Auto-immunité et pronostic de l'hypertension artérielle pulmonaire »

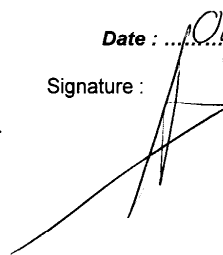
Version N° 1.1 du : 19/10/09

L'investigateur coordonnateur :
Pr Luc MOUTHON

Service de Médecine interne
Hôpital Cochin,
27 rue du Faubourg St Jacques
75679 PARIS Cedex 14

Date : 04.05.2010

Signature :



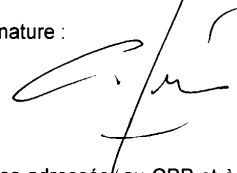
MOUTHON Luc
Professeur
Médecine Interne
Service de Médecine Interne - Hôpital Cochin - 75679 Paris Cedex 14

Le promoteur :
M. Christophe MISSE

Assistance publique – hôpitaux de Paris
Délégation Interrégionale à la Recherche Clinique
Hôpital Saint Louis
75010 PARIS

Date : 07.05.2010

Signature :



NB : cette version correspond au texte du protocole et annexes adressés/ au CPP et à l'autorité compétente respectivement pour avis et demande d'autorisation.
Si ensuite une autre version est rédigée suite à des modifications, il faut refaire le circuit des signatures afin d'être toujours à jour des versions du protocole actif.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

PAGE DE SIGNATURE DU PROTOCOLE.....	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
TABLE DES MATIERES.....	4
RESUME.....	6
SCHEMA GENERAL DE L'ETUDE	9
I - INTRODUCTION.....	10
I - 1 - DONNEES DE LA LITTERATURE.....	11
I - 1 - 1 - PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE.....	11
I - 1 - 2 - PHYSIOPATHOLOGIE DE LA SCLERODERMIE SYSTEMIQUE.....	12
I - 1 - 3 - STRESS OXYDATIF ET HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE	13
I - 2 - JUSTIFICATION DE LA RECHERCHE.....	19
I - 3 - RESULTATS ATTENDUS ET PERSPECTIVES	23
I - 3 - 1 - IDENTIFICATION DES CIBLES ANTIGENIQUES DES AUTOANTICORPS.....	23
I - 3 - 2 - ETUDE DE LA PRODUCTION DE RADICAUX LIBRES IN VITRO	23
II – OBJECTIF DE L'ETUDE.....	24
II - 1 - HYPOTHESES TESTEES	24
II - 2 - OBJECTIF PRINCIPAL	24
II - 3 - OBJECTIFS SECONDAIRES.....	24
III – METHODOLOGIE.....	25
III - 1 - TYPE D'ETUDE.....	25
III - 2 - DUREE DE L'ETUDE.....	25
IV – POPULATION ETUDIEE	25
IV - 1 - CRITERES D'INCLUSION	25
IV - 2 - CRITERES DE NON INCLUSION.....	26
IV - 3 - NOMBRE DE SUJETS NECESSAIRES.....	26
IV - 4 - MODE DE RECRUTEMENT	28
V – CRITERES D'EVALUATION	29
V - 1 - CRITERE DE JUGEMENT PRINCIPAL	29
V - 2 - CRITERE DE JUGEMENT SECONDAIRE	29
V - 3 - CALENDRIER DES EVALUATIONS DANS LES DIFFERENTS GROUPES.....	29
VI – DEROULEMENT DE L'ETUDE POUR UN PATIENT	30
VI - 1 - VISITE V1 - VISITE D'INCLUSION	30
VI - 2 - VISITE V2 - VISITE A M12.....	30
VI - 3 - SORTIE DE L'ESSAI ET SORTIE PREMATUREE.....	31
VI - 4 - ARRET DE L'ETUDE	31
VI - 5 - EXPERIENCES REALISEES SUR LES PRELEVEMENTS.....	31
VI - 5 - 1 - Etude du stress oxydant.....	32
VI - 5 - 2 - Technique d'immunoblot monomensionnel.....	34
VI - 5 - 3 - Technique d'immunoblot quantitatif bidimensionnelle	35
VII – CONTROLE ET ASSURANCE DE LA QUALITE.....	37
VII - 1 - PROCEDURES DE MONITORING	37
VII - 2 - TRANSCRIPTION DES DONNEES DANS LE CAHIER D'OBSERVATION.....	38
VIII – GESTION DES DONNEES STATISTIQUES	38
IX – EVALUATION DE LA SECURITE	39
IX - 1 - DESCRIPTION DES PARAMETRES D'EVALUATION DE LA SECURITE.....	39
IX - 2 - PROCEDURE DE GESTION DES EVENEMENTS INDESIRABLES GRAVES.....	40
IX - 3 - COMITE DE PILOTAGE	41

X – DROIT D'ACCES AUX DONNEES ET DOCUMENTS SOURCE.....	41
XI – CONSIDERATIONS LEGALES ET ETHIQUES.....	41
XI - 1 - DEMANDE D'AUTORISATION AUPRES DE L'AFSSAPS.....	41
XI - 2 - DEMANDE D'AVIS AU COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES	42
XI - 3 - MODIFICATIONS.....	42
XI - 4 - DECLARATION CNIL.....	42
XI - 5 - RAPPORT FINAL DE LA RECHERCHE	43
XII – TRAITEMENT DES DONNEES ET CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES RELATIVES A LA RECHERCHE	43
XIII – ASSURANCE ET ENGAGEMENT SCIENTIFIQUE.....	44
XIII - 1 - ASSURANCE.....	44
XIII - 2 - ENGAGEMENT SCIENTIFIQUE.....	44
XIV – REGLES RELATIVES A LA PUBLICATION.....	45
XV – LISTE DES ANNEXES.....	46
ANNEXE I – INVESTIGATEURS ET EQUIPES ASSOCIÉES.....	47
ANNEXE II – REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	48

RESUME

Titre	Auto-HTAP : Auto-immunité et pronostic de l'hypertension artérielle pulmonaire
Investigateur Coordinateur	Pr Luc MOUTHON (Hôpital Cochin)
Centre investigateur	Service de Médecine Interne, Hôpital Cochin
Durée de l'étude	36 mois
Suivi par patient	12 mois
But de l'étude	<p><u>Objectif principal :</u> Identifier des marqueurs immunologiques d'intérêt pronostique au cours de l'HTAP idiopathique ou associée à la sclérodemie systémique.</p> <p><u>Objectifs secondaires :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Identifier des marqueurs immunologiques d'intérêt pronostique au cours des autres formes d'HTAP. - Déterminer les valeurs pronostiques des marqueurs immunologiques et/ou de la synthèse des radicaux libres au cours de l'HTAP. - Tester l'efficacité <i>in vitro</i> de différents traitements vasodilatateurs sur les différents radicaux libres. - Corréler les résultats d'identification de production de radicaux libres et l'effet biologique <i>in vitro</i> des différents vasodilatateurs à la réponse thérapeutique clinique <i>in vivo</i>.
Méthodologie	Essai contrôlé, multicentrique, interventionnel
Nombre de centres	4 (Hôpital Cochin - Paris, Hôpital Antoine Bécclère - Clamart, Hôpital Claude Huriez - Lille, EFS)
Nombre de patients	<p>540 sujets seront inclus</p> <p>180 patients ayant une HTAP avec ou sans pathologie associée 160 patients avec une pathologie de fond mais n'ayant pas d'HTAP 180 sujets sains appariés pour le sexe et l'âge aux patients ayant une HTAP 20 patients ayant une hypertension pulmonaire post-embolique proximale opérable.</p>
Critères de sélection	<p><u>Critères d'inclusion :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Les malades âgés de plus de 18 ans (inclus) - Seuls les malades ayant une HTAP pré-capillaire seront inclus sur la base de la mise en évidence d'une HTAP par cathétérisme droit (pression artérielle pulmonaire moyenne au repos supérieure à 25 mm Hg, ou pression artérielle pulmonaire moyenne à l'effort de 30 mm Hg). - Les malades ayant une HTAP idiopathique ne devront pas avoir de maladie systémique associée. - Les malades infectés par le VIH1 ayant ou non à une HTAP (sur la base d'un test ELISA + western blot positifs). - Les malades ayant une hypertension portale associée ou non à une HTAP devront répondre aux critères suivants : mise en évidence de varices oesophagiennes à l'endoscopie, analyse des flux portes à l'échographie Doppler et confirmation d'un gradient de plus de 5 mmHg au cathétérisme des veines sus-hépatiques libres et bloquées. - Les malades ayant une cardiopathie congénitale associée ou non à une HTAP devront répondre aux critères suivants : mise en évidence d'une communication inter-auriculaire, inter-ventriculaire ou d'une persistance du canal artériel par imagerie (imagerie par ré-

	<p>sonance magnétique et/ou échocardiographie) confirmées par cathétérisme cardiaque.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Les malades sclérodermiques répondront aux critères de l'American College of Rheumatology (ACR) et/ou aux critères de Leroy et Medsger. - Les malades ayant une connectivite mixte (syndrome SHARP) associée ou non à une HTAP devront répondre aux critères de Sharp. - Les malades ayant un LES associé ou non à une HTAP devront répondre aux critères de l'ACR révisés et actualisés. - Les malades ayant un syndrome de Sjögren associé ou non à une HTAP devront répondre aux critères Américano-Européens. - Les malades ayant une HTAP post-embolique proximale opérable répondront aux critères suivants : défauts scintigraphiques segmentaires et matériel endo-vasculaire artériel pulmonaire chez un patient souffrant d'HTAP et confirmation du caractère obstructif et opérable à l'angiographie pulmonaire. - Malades ayant reçu une information éclairée et acceptant de signer le consentement éclairé - Malades affiliés à ou bénéficiaire d'une assurance maladie <p><u>Critères de non inclusion:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Femmes enceintes - Mineurs - Absence de signature du consentement éclairé. - Tumeur maligne associée
Déroulement de l'étude	<p>1 visite d'inclusion puis 1 visite à M12</p> <p><u>V1 - Visite d'inclusion</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Examen clinique - Vérification des critères d'éligibilité - Proposition de l'essai et recueil du consentement éclairé signé - Inclusion - prélèvement 2*7ml sur tube sec - Pour les patients atteints de sclérodemie systémique : biopsie cutanée <p><u>V2 – Visite à M12</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - examen clinique - prélèvement 2*7ml sur tube sec
Critères d'évaluation principal et secondaires	<p><u>Critère d'évaluation principal</u></p> <p>Identification des cibles antigéniques des Ac anti-cellules endothéliales, anti-fibroblastes et anti-cellules musculaires lisses vasculaires de patients atteints d'HTAP non idiopathique et non associée à la sclérodemie systémique et comparaison de ces cibles à celles identifiées chez les malades ayant une HTAP idiopathique ou associée à la sclérodemie systémique.</p> <p><u>Critères d'évaluation secondaires</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Détection par ELISA utilisant des protéines recombinantes d'autoanticorps associés à l'TAP spécifiques de chacun des groupes testés. 2. Constitution de sous groupes de patients atteints d'HTAP dont le sérum entraîne <i>in vitro</i> la production de différents types de radicaux libres testés et/ou la prolifération cellulaire. 3. Evaluation de l'intérêt pronostique de la mesure de la production de radicaux libres <i>in vitro</i> (corrélations avec les données cliniques et du cathétérisme droit). 4. Evaluation <i>in vitro</i> chez les producteurs de FRO du pouvoir inhibi-

	<p>teur des différents traitements vasodilatateurs et corrélation des résultats obtenus <i>in vitro</i> à l'inclusion et à un an aux résultats obtenus <i>in vivo</i> sous traitement.</p>
<p>Analyse statistique</p>	<p>Les données quantitatives seront comparées avec les tests appariés et non appariés <i>t</i> de Student, ou Wilcoxon. Lorsque l'analyse inclura plus de deux groupes, une analyse de variance ou un test de Kruskal-Wallis. Des ajustements dans des analyses de covariance ou des modèles de régression linéaire ou polynomiales seront également envisagés. Le calcul du coefficient de corrélation <i>r</i> de Pearson sera utilisé pour analyser la relation entre variables quantitatives.</p> <p>Les données qualitatives seront comparées avec des tests du chi-deux (appariés et non appariés), ou des tests exacts de Fisher. Des ajustements dans des modèles de régression logistique seront également envisagés.</p> <p>Les tests utilisés seront bilatéraux, et une valeur de $p < 0,05$ sera considérée comme significative (après correction potentielle, par exemple en utilisant la notion de False Discovery Rate de Benjamini and Hochberg pour les tests multiples).</p> <p>La sensibilité, spécificité, valeurs prédictive positive et négative des marqueurs immunologiques d'intérêt pronostique au cours de l'HTAP idiopathique ou associée à la sclérodémie systémique seront déterminées</p> <p>Enfin, des analyses de sensibilité des résultats aux données manquantes seront réalisées.</p> <p>L'analyse statistique sera réalisée au sein du laboratoire d'Informatique médicale et Biostatistique de l'hôpital Cochin, sous la responsabilité du Pr. Joël Coste. Le logiciel utilisé sera le logiciel SAS, version 9.1.</p>

SCHEMA GENERAL DE L'ETUDE

	V1 - Inclusion	Pour les patients HTAP V2 – M12
Examen clinique	X	X
Vérification des critères d'éligibilité	X	
Proposition de l'essai et recueil du consentement éclairé	X	
Inclusion	X	
Prélèvement sanguin	X	X
Biopsie cutanée*	X	

* biopsie cutanée : uniquement pour les patients atteints de sclérodermie systémique

I - INTRODUCTION

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie rare dont la prévalence est de 15 par million d'habitants en Europe. Les symptômes surviennent surtout à l'effort et incluent un essoufflement, une fatigue, une faiblesse, des douleurs thoraciques, des lipothymies et des syncopes (1). Puis apparaît une insuffisance cardiaque droite qui peut aboutir au décès. L'HTAP est de pronostic redoutable avec une médiane de survie d'environ 3 ans. Cette maladie peut survenir de façon sporadique (HTAP idiopathique), dans un contexte familial (HTAP familiale, dont le mode de transmission est autosomique dominant et la pénétrance de l'ordre de 20%, par mutation de BMPR2, un membre de la famille des récepteurs de TGF- β) ou compliquer l'évolution de certaines situations (une cardiopathie congénitale, l'infection par le VIH (2), une hypertension portale, une prise d'anorexigènes HTAP ou des connectivites comme la sclérodermie systémique (ScS) (3, 4), et plus rarement les connectivites mixtes et le lupus érythémateux systémique (LES) (5). Approximativement 8 à 12% des malades sclérodermiques développent une HTAP qui est responsable d'une forte mortalité (3, 4) dans ce contexte.

Sous le terme « d'hypertension artérielle pulmonaire » (HTAP) proprement dite sont regroupées différentes maladies touchant les artères pulmonaires de petit calibre entraînant une augmentation progressive des résistances artérielles pulmonaires et une défaillance ventriculaire droite. L'échographie cardiaque avec doppler pulsé permet de dépister l'existence d'une l'HTAP ; cependant, le diagnostic de certitude nécessite la réalisation d'un cathétérisme cardiaque droit. L'HTAP, qui résulte d'une obstruction chronique des petites artères pulmonaires, est définie par une pression artérielle pulmonaire moyenne supérieure à 25 mm de mercure au repos ou 30 mm de mercure à l'exercice et une pression artérielle pulmonaire d'occlusion inférieure ou égale à 15 mm Hg, ce qui élimine une cardiopathie gauche (1).

Les hypertensions pulmonaires (HTP) dites secondaires n'appartiennent pas au groupe des HTAP proprement dites. Ces HTP sont secondaires à une cause bien identifiée pouvant bénéficier d'un traitement spécifique comme le cœur pulmonaire chronique post embolique, l'insuffisance cardiaque gauche, ou les pathologies respiratoires chroniques (HTP hypoxique). Enfin, d'autres causes plus rares comme la sarcoïdose, l'histiocytose X, la lymphangiomeiomyomatose et les HTAP dues à des compressions extrinsèques peuvent être observées.

I - 1 - DONNEES DE LA LITTERATURE

I - 1 - 1 - Physiopathologie de l'hypertension artérielle pulmonaire

Le domaine de l'HTAP a connu ces dernières années des progrès majeurs, tant dans la compréhension des mécanismes à l'origine de la maladie que dans la mise au point de nouveaux médicaments ciblant certains dysfonctionnements physiopathologiques (6).

La pathogénie de l'HTAP est multifactorielle. Une vasoconstriction, un remodelage des parois vasculaires et des thromboses contribuent à l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires au cours de l'HTAP (7). Le processus de remodelage vasculaire intéresse l'ensemble des composantes de la paroi vasculaire, et chaque type cellulaire présent au sein de cette paroi (cellules endothéliales (CE), cellules musculaires lisses, fibroblastes), ainsi que des cellules inflammatoires et des plaquettes, semblent jouer un rôle dans la pathogénie de la maladie (8). La néo-muscularisation des petites artères pulmonaires périphériques normalement non musculaires, jusque dans l'acinus respiratoire, est une caractéristique commune à toutes les formes de remodelage associées à l'HTAP. Les mécanismes cellulaires responsables de la muscularisation de cette partie des vaisseaux pulmonaires ne sont pas complètement élucidés. L'HTAP pourrait être associée à une altération de l'équilibre entre prolifération et apoptose, avec comme conséquence des artères pulmonaires épaissies et obstruées. De plus, une prolifération des CE conduisant à la formation de lésions plexiformes est fréquente. Le stimulus déclenchant ou l'atteinte cellulaire qui provoque cette prolifération endothéliale anormale est inconnu, mais pourrait avoir une composante hypoxique ou inflammatoire, ou être en partie la conséquence de contraintes de cisaillement (shear stress) ou la réponse à des drogues au sens large ou des toxines sur un fond de susceptibilité génétique.

Une vasoconstriction pulmonaire survient précocement au cours de la maladie et pourrait être secondaire à une anomalie morphologique ou fonctionnelle des canaux potassiques (9) et/ou à une dysfonction endothéliale (10). Cette dysfonction endothéliale est à l'origine d'une production insuffisante de substances vasodilatatrices comme le NO et la prostacycline (11) et d'une production excessive de substances vasoconstrictrices comme l'endothéline 1 (12).

Des études génétiques récentes ont mis en évidence le rôle potentiel de facteurs de croissance comprenant des membres de la superfamille du TGF- β , l'angiopoïétine 1, des récepteurs et des transporteurs de la sérotonine. Des mutations du gène codant pour le « bone morphogenetic receptor II » (BMPRII) ont été identifiées dans 60% des cas de formes familiales d'HTAP et 10 à 30% des cas des formes sporadiques d'HTAP (13, 14, 15). D'autres mutations sur des récepteurs du TGF- β , ALK-1 et endogline ont été identifiées chez des malades ayant un antécédent personnel ou familial de maladie de Rendu-Osler (16, 17).

I - 1 - 2 - Physiopathologie de la sclérodermie systémique

La sclérodermie systémique (ScS) est une affection au cours de laquelle on observe une sclérose du derme et de certains viscères comme le poumon, le coeur et le tube digestif ainsi que des anomalies vasculaires comme un phénomène de Raynaud ou une HTAP. Si la ScS n'est pas à proprement parler actuellement considérée comme une maladie autoimmune, trois types principaux d'autoanticorps spécifiques mutuellement exclusifs peuvent être mis en évidence: il s'agit des anticorps (Ac) anti-centromère (18), associés aux formes limitées de ScS, des Ac anti-Scl-70 (anti-topoisomérase 1) (19) qui sont associés aux formes diffuses de ScS, et des Ac anti-ARN polymérase III (20), qui sont également rencontrés dans les formes diffuses, en association à la survenue de complications rénales (crise rénale sclérodermique). Ces autoanticorps apparaissent être des marqueurs utiles pour le diagnostic et l'identification des antigènes impliqués dans la survenue de la maladie (21). D'autres autoanticorps ont été mis en évidence au cours de la ScS: il s'agit d'autoanticorps spécifiques comme les Ac anti-fibrilline I (22) (composant principal des microfibrilles de la matrice extracellulaire) ou non spécifiques, comme les Ac anti-CE. Des Ac anti-CE ont par ailleurs été mis en évidence au cours de la ScS, du LES ou de la maladie de Behçet, et des Ac anti-fibroblastes ont été identifiés au cours de la ScS et de l'HTAP idiopathique. Ces Ac sont retrouvés dans environ 50% des cas au cours de la ScS (23 , 24).

Les Ac anti-CE semblent jouer un rôle dans la physiopathologie de la ScS. En effet, ces Ac peuvent activer les CE, induire l'expression de molécules d'adhésion et provoquer une apoptose en présence de cellules NK (25). Dans les extraits de CE, une réactivité des IgG envers un antigène de 100kDa correspondant à la topoisomérase 1 a été mise en évidence chez les patients sclérodermiques ayant des Ac anti-topoisomérase I et chez 50% des patients avec une forme diffuse sans anticorps spécifique (24). Les patients ayant une ScS cutanée limitée avec anti-centromère reconnaissent spécifiquement une bande à 80-kDa dans des extraits de CE microvasculaires identifiée comme étant la protéine centromérique B (CENPB) (26). Des profils différents ont également été retrouvés dans les cibles antigéniques de ces Ac anti-CE entre l'HTAP idiopathique et l'HTAP associée à la ScS (27).

Des AC ANTI-FIBROBLASTES peuvent être identifiés chez les patients sclérodermiques. Ces Ac sont capables d'activer les fibroblastes et d'induire un phénotype pro-adhésif et pro-inflammatoire (28). Il a récemment été mis en évidence que les AC ANTI-FIBROBLASTES pouvaient se fixer sur la topoisomérase I à la surface des fibroblastes (29, 30). En ELISA, des AC ANTI-FIBROBLASTES ont été retrouvés chez 30% des patients présentant une HTAP associée à une ScS (31).

Des Ac dirigés contre le récepteur du 'platelet derived growth factor' (PDGF), capables d'induire la production accrue des formes réactives de l'oxygène par les fibroblastes ont été retrouvés dans le sérum de patients sclérodermiques (32). Ces Ac induisent la phosphorylation de tyrosine-kinases intra-cytoplasmiques et stimulent l'expression du gène du collagène de type I par les fibroblastes et une conversion du phénotype de ces cellules en myofibroblastes.

De nombreuses hypothèses ont été formulées sur l'origine des auto-Ac au cours de la ScS : mimétisme moléculaire entre la topoisomérase I et des antigènes de cytomégalo-virus (33), activation polyclonale par excès d'IL-4, fragmentation d'auto-antigènes par des métalloprotéases à l'origine d'une immunogénicité accrue. Bien que le rôle pathogène des auto-Ac anti-nucléaires dans la pathogénie de la ScS n'ait pas été démontré, leur détection est utile pour aider au diagnostic précoce de la maladie et en déterminer le pronostic.

Au total, des progrès ont donc été réalisés dans la compréhension des phénomènes biologiques secondaires à l'activation des fibroblastes et des CE, et aux interactions entre le fibroblaste, la CE et les cellules mononucléées, au cours de la ScS. Cependant, la pathogénie de cette maladie reste globalement mal comprise.

I - 1 - 3 - Stress oxydatif et hypertension artérielle pulmonaire

I - 1 - 3 - a - Définitions des formes réactives de l'oxygène (FRO)

Stricto sensu, un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) contenant un électron non apparié. L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le monoxyde d'azote ($NO\bullet$), le radical hydroxyle ($OH\bullet$) sont ainsi des radicaux libres. Cet état est cependant transitoire et prend fin soit par l'acceptation d'un autre électron par la molécule radicalaire soit par le transfert de l'électron libre sur une autre molécule. La probabilité de chacune de ces deux possibilités dépend essentiellement de l'instabilité du radical libre considéré. Si cette instabilité est modérée, la probabilité d'accepter un second électron est grande et, dans ce cas, le radical libre ne représente qu'une étape transitoire dans une réaction d'oxydo-réduction classique. Si au contraire cette instabilité est importante, l'électron libre est rapidement transféré sur une autre molécule. L'électron libre peut ensuite passer sur d'autres molécules, entraînant des phénomènes d'oxydation en chaîne. Toutefois, si la nouvelle espèce radicalaire formée est relativement stable, elle va avoir le temps de compléter sa réaction d'oxydo-réduction, soit en se régénérant (en regagnant un électron) soit en s'oxydant (en perdant un deuxième électron). En impliquant un électron libre dans une réaction d'oxydo-réduction classique, ces molécules diminuent les phénomènes d'oxydation en chaîne et sont qualifiées de piègeurs de radicaux libres (*scavenger*).

Alternativement, deux radicaux libres peuvent réagir entre eux pour mettre fin au processus radicalaire et formés ainsi des molécules oxydantes mais non radicalaires. Contrairement aux réac-

tions impliquant des piègeurs de radicaux libres, ces réactions produisent des molécules toxiques au même titre que les radicaux libres dont elles dérivent et participent au stress oxydatif.

L'appellation " dérivés ou formes réactives de l'oxygène (FRO)" n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit (radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), radical hydroxyle ($OH\cdot$), monoxyde d'azote ($NO\cdot$), ...), mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante (peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), peroxynitrite ($ONOO^-$)).

I - 1 - 3 - b - Origine et conséquences des dérivés réactifs de l'oxygène

Les FRO peuvent interagir entre eux, mais aussi avec tous les types de composants cellulaires : protéines, lipides, glucides, ADN. Ces effets dépendent de leur réactivité propre, de leur affinité préférentielle pour tel ou tel substrat, de leur quantité et de leur capacité de diffusion. A l'échelle cellulaire les FRO sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques.

i. Action sur les protéines :

Les formes radicalaires peuvent agir au niveau de la chaîne principale de la protéine conduisant à une fragmentation ou à un pontage intra- ou inter-moléculaire. L'interaction peut aussi se situer au niveau de la chaîne latérale avec des acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane, phénylalanine) conduisant à la formation par exemple de dityrosine ou de nitrotyrosine. Les résidus soufrés méthionine et cystéine sont particulièrement sensibles. Les acides aminés aliphatiques sont moins sensibles et seuls les FRO puissants comme HOCl peuvent interagir avec la lysine ou l'arginine et aboutir dans ce cas à la formation de groupements carbonyles (60, 61). Ces modifications entraînent des modifications conformationnelles, des fragmentations ou des liaisons entre protéines et sont ainsi susceptibles de modifier l'activité des protéines.

ii. Action sur les lipides

L'interaction des FRO avec les lipides conduit à la peroxydation lipidique. Les implications biologiques sont majeures puisque toutes les membranes cellulaires sont constituées de lipides. Ainsi, la peroxydation de la membrane mitochondriale peut aboutir à l'apoptose (62). La peroxydation lipidique entraîne en outre la formation de dérivés toxiques tels que le malone-dialdéhyde (MDA).

iii. Action sur l'ADN

Les FRO entraînent l'oxydation de bases, avec pour conséquence une modification de bases ou un site abasique, l'oxydation de sucre avec cassure d'une chaîne simple ou double brin. Les modifications peuvent également entraîner des liaisons ADN-lipides ou ADN-protéines.

iv. Rôles et conséquences des FRO dans le métabolisme cellulaire

Les polynucléaires neutrophiles et les macrophages génèrent de grandes quantités de $O_2^{\bullet -}$ et de H_2O_2 via l'activation du complexe NADPH oxydase (63, 64). Cette enzyme est une des clés de l'arsenal antimicrobien. Le déficit en NADPH oxydase est responsable d'un déficit immunitaire chez l'homme, la granulomatose septique chronique.

Les FRO, en particulier l' H_2O_2 , sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (65, 66). Ainsi, de faibles concentrations de FRO favorisent la prolifération cellulaire via l'activation du système ERK (67). A un niveau de FRO supérieur, d'autres mitogen-activated protein kinases (MAP kinases), les stress activating protein kinases (SAPK), sont activées et favorisent l'apoptose (68). La prolifération des cellules tumorales est également régulée par l' H_2O_2 (65).

Depuis quelques années, le concept de FRO comme messenger du signal intracellulaire se développe. Le NO peut en effet activer la guanylate cyclase, les modifications oxydatives des protéines intracellulaires (modification des tyrosines et des cystéines notamment) participent également à la transduction du signal. Les FRO peuvent également directement activer certains facteurs de transcription comme le nuclear factor-kB et c-fos (69).

Les FRO semblent également impliqués dans le processus d'angiogénèse dépendant du VEGF. La transduction du signal du VEGF dépend de la formation de ROS via la NADPH oxydase endothéliale (70). Enfin, à côté des FRO classiques, le NO exerce en plus des fonctions particulières au niveau des vaisseaux : vasodilatation, activité anti-thrombotique et cytoprotectrice (71).

v. Systèmes anti-oxydants physiologiques

Bien que, même dans les conditions physiologiques, une fraction non négligeable de l' O_2 soit converti en FRO, la concentration en $O_2^{\bullet -}$ dans les cellules n'excède pas 10^{-10} – 10^{-11} M, et celle de H_2O_2 10^{-7} – 10^{-9} M. Cette limitation du stress oxydatif est liée aux systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.

I - 1 - 3 - c - Stress oxydatif au cours de la sclérodermie systémique

Plusieurs facteurs plaident en faveur d'un rôle des FRO dans le développement de la ScS, et en premier le phénomène d'hyperréactivité vasculaire responsable du phénomène de Raynaud. En effet, ce symptôme, présent chez plus de 90% des malades, précède en général de plusieurs années les autres signes de la maladie. Il peut être présent chez certains sujets sains (moins de 15%) mais est alors souvent familial et peu sévère, présent uniquement lors d'exposition au froid. Ce phénomène correspond à une ischémie suivie d'une reperfusion. Or la succession de ces deux

conditions entraîne la formation d' $O_2^{\bullet -}$: Pendant la phase ischémique, la xanthine déshydrogénase se transforme en xanthine oxydase et l'ATP en hypoxanthine (72). Lors de la reperfusion, l'oxygène est disponible localement et devient le substrat de la xanthine oxydase pour former des anions superoxydes toxiques (73).

Un deuxième argument est apporté par les études sur les différents toxiques qui pourraient déclencher ou favoriser la survenue d'une ScS. Nombre de ces toxiques exercent leurs effets en partie via un stress oxydatif. C'est le cas de la silice qui induit directement la formation de FRO à sa surface, notamment par réaction de Fenton, et indirectement par le biais d'une activation des cellules phagocytaires (74). De plus, chez la souris, plusieurs travaux soulignent le lien entre fibrose pulmonaire induite par l'inhalation de silice et stress oxydatif (75 , 76). La bléomycine est responsable de fibrose pulmonaire chez l'homme et a été utilisée en injections sous-cutanées chez la souris pour induire une fibrose cutanée proche de la ScS (77). L'étude de ce modèle murin a montré l'implication de FRO dans le développement de la fibrose cutanée entraînant des lésions proches des lésions observées chez l'homme (78). Le syndrome de l'huile frelatée, qui partage des similitudes avec la ScS semble également médié par des radicaux libres (79).

Enfin, des études soulignent chez les sujets développant une ScS des différences dans les systèmes antioxydants par rapport aux sujets sains, suggérant un possible défaut à éliminer l'excès de radicaux libres chez les sujets enclins à développer une ScS (80 , 81). Ces observations renforcent l'hypothèse de l'implication du stress oxydatif dans la ScS.

Au cours des dix dernières années, de nombreux travaux font état d'un stress oxydatif excessif chez les malades atteints de ScS. La grande majorité de ces travaux apporte en fait des preuves indirectes d'une implication des FRO en se focalisant non pas sur les FRO eux-mêmes mais sur leurs conséquences. Il a ainsi été montré que les sérums des malades contenaient de plus grandes quantités de protéines oxydées (groupements carbonyles et advanced oxidation protein products, AOPP) (82), et de marqueurs de peroxydation lipidique (83). Cette oxydation lipidique a été également directement observée au niveau des membranes d'érythrocytes de malades (84). Ce phénomène diminue la plasticité des érythrocytes, et pourrait ainsi aggraver les anomalies microcirculatoires. Il a également été montré que les protéines nucléolaires cibles des Ac de patients atteints de ScS sont des cibles privilégiées des FRO par rapport à des antigènes reconnus dans d'autres maladies, insensible à l'oxydation. Ceci suggère que l'auto-immunité observée dans la ScS pourrait être la conséquence du stress oxydatif (85).

Une équipe italienne a mis en évidence une synthèse en grande quantité de $O_2^{\bullet -}$ par des monocytes et des fibroblastes de sujets atteints de ScS (86 , 87). Dans les deux types cellulaires, cette synthèse de FRO apparaît auto-entretenu et dépendante d'une NADPH oxydase. Le travail de cette équipe suggère également que la synthèse de collagène par les fibroblastes est dépendante

de cette synthèse de FRO (88). Concernant le NO, plusieurs études attestent de différences quantitatives dans le sérum entre patients et sujets sains, mais, comme cela a été dit précédemment, les résultats de ces études sont parfois contradictoires. Une étude immuno-histochimique à partir de peau de malades et de sujets sains a montré cependant un changement radical du métabolisme du NO dans les CE de patients sclérodermiques, puisque la NO synthase endothéliale, constitutive cesse d'être exprimée au profit de la NO synthase inductible (89). Parallèlement à ce changement, le NO formé devient toxique, comme en témoigne dans les tissus lésés la présence de nitrotyrosine.

Nous avons récemment mis en évidence dans un travail mené chez 56 patients sclérodermiques l'implication des différentes FRO dans la physiopathogénie de la ScS, en soulignant leur rôle dans le développement des complications vasculaires ou interstitielles fibrosantes. Trois propriétés caractérisaient les sérums de patients atteints de ScS par rapport aux sérums de sujets sains: (i) Ils induisaient une production majeure d' H_2O_2 par différents types cellulaires même si la production était significativement plus importante au niveau des CE; (ii) ces sérums stimulaient la prolifération des fibroblastes et (iii), ils inhibaient la croissance des CE sans modifier la croissance des cellules HEp-2, ce qui pourrait indiquer que ces cellules sont dépourvues de récepteur(s) au(x) facteur(s) sérique(s) induisant la prolifération, récepteur(s) présents au niveau des cellules endothéliales et des fibroblastes. Nous avons dans ce travail observé un lien entre le type et la quantité de ROS et les formes cliniques de la ScS. Ainsi, nous avons pu montrer que les ROS étaient impliqués dans le développement d'atteintes cliniques spécifiques. Les malades présentant une forme sévère de la maladie définie dans ce travail par une fibrose pulmonaire, une hypertension artérielle ou une ischémie digitale avec ulcérations avait un sérum plus toxique que les autres malades, capable d'induire une production d' H_2O_2 plus importante par les cellules. Les malades avec une fibrose pulmonaire avaient un sérum capable de stimuler les fibroblastes de manière beaucoup plus importante que les autres malades.

Dans ce travail, nous avons également effectué des expériences d'inhibition de la production de radicaux libres et de la prolifération cellulaire en présence de molécules utilisées dans le traitement de la ScS. Comme observé en clinique, aucune molécule n'était spectaculairement efficace. Le cyclophosphamide n'a pas été testé car il s'agit d'une prodrogue nécessitant d'être métabolisée pour être active. La N-acetyl-L-cystéine (NAC) et le GSH diminuaient la production d' H_2O_2 par les CE et la prolifération des fibroblastes induites par le sérum. De plus, la NAC avait un effet synergique avec le l'immunosuppresseur 5FU. Cela est en accord avec une étude récemment publiée montrant un effet bénéfique de la NAC en addition à des immunosuppresseurs dans la fibrose pulmonaire idiopathique dans sa forme commune (90). Concernant la production de NO, seul le bosentan était capable de réduire cette production. Le bosentan est un antagoniste

des récepteurs A et B de l'endothéline, qui améliore les symptômes chez les malades avec hypertension artérielle pulmonaire (91 , 92). Cette molécule diminue également la fréquence des nouveaux ulcères cutanés ischémiques chez les malades sclérodermiques ayant des antécédents d'ulcères digitaux (93). Ces observations soulignent l'intérêt du bosentan chez ces malades avec complications vasculaires en montrant mettant en évidence son rôle de limitation du stress oxydatif via le NO en plus de ses propriétés vasodilatatrices bien démontrées. Ainsi, plus globalement, cette approche met à jour de nouveaux tests réalisables simplement *in vitro* à partir du sérum de malades et qui pourraient être utile pour évaluer l'activité de la maladie et prédire la réponse à différents traitements.

I - 1 - 3- d- Stress oxydant et hypertension artérielle pulmonaire

L'HTAP est la conséquence de dysfonctionnements cellulaires et moléculaires. Les effets conjugués de la vasoconstriction, du remodelage de la paroi des vaisseaux pulmonaires et de la thrombose *in situ* contribuent à l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires. Les profils d'expression génique de tissus pulmonaires de patients souffrant d'HTAP analysés par « microarray » suggèrent que ces tissus subissent un stress oxydant (94). Il y a par exemple une surexpression de la thioredoxine qui joue un rôle dans la régulation redox de facteurs de transcription comme NF-kB (95 , 96). On retrouve en particulier une surexpression de métallothionéine dans les tissus pulmonaires de patients atteints d'HTPi, suggérant que ces tissus répondent au stress oxydant en augmentant les défenses anti-oxydantes. On retrouve également dans ces poumons une augmentation des produits de l'action de radicaux libres sur les protéines (nitrotyrosine) et sur les acides nucléiques (8-hydroxyguanosine). Les produits de l'attaque radicalaire sur l'acide arachidonique (acide hydroxyeicosatétranoïque (HETEs) et l'acide 5-oxo-eicosatétranoïque (5-oxo-ETE) sont présents dans les poumons d'HTAP sévères, et diminuées dans les poumons d'HTAP sévères traitées par injection continue de prostacycline (97). Ceci suggère que la prostacycline diminue l'inflammation, le stress oxydant, ou les deux dans les tissus pulmonaires d'HTAP traitées (98). Un déséquilibre croissant entre oxydants et anti-oxydants a également été démontré au cours du développement de l'HTAP induite chez le rat traité par la monocrotaline (99). L'HTAP induite chez le rat par l'hypoxie a aussi pu être améliorée par une molécule anti-oxydante, l'erdocystéine (100).

Le développement de l'HTAP induite chez l'agneau par une augmentation du débit artériel pulmonaire (shunt) a également été associé avec une augmentation du stress oxydant dû à une augmentation de la NADPH oxydase et du découplage de la NO synthase endothéliale (formation de ONOO- au lieu de NO) (101).

Au total, il existe actuellement dans la littérature des données importantes qui laissent envisager un intérêt à étudier le rôle du sérum de patients atteints d'HTAP sur la production de radicaux libres par les CE et les fibroblastes, ainsi que l'intérêt de la caractérisation de la modulation de la production de FRO et de la prolifération cellulaire *in vitro* par les différentes drogues vasodilatrices utilisées dans le traitement de l'HTAP, à l'image de ce que nous avons récemment mis en évidence au cours de la ScS (102).

I - 2 - JUSTIFICATION DE LA RECHERCHE

Des perturbations du système immunitaire semblent contribuer à la survenue d'une HTAP (34). Cela est particulièrement évident dans l'HTAP associée aux connectivites (34, 35). De plus, de longue date une association entre la survenue de maladies autoimmunes et d'une HTAP idiopathique a été mise en évidence. Cependant, les modalités selon lesquelles l'autoimmunité contribue à la pathogénie de l'HTAP n'ont jusqu'alors pas été précisément définies. Nicolls et collaborateurs ont récemment revu en détail les données disponibles sur l'association autoimmunité et HTAP et proposé que des dysfonctionnement du système immunitaire pourraient jouer un rôle dans la pathogénie de la maladie (36).

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'HTAP est une complication qui survient au cours de certaines maladies autoimmunes ou à composante autoimmune comme la ScS, les connectivites mixtes, le LES (35, 37) et le syndrome de Sjögren (38). Sur la base d'études récentes menées dans la ScS reposant sur des cathétérismes droits, il a été mis en évidence que 8 à 12% des patients sclérodermiques ont une HTAP (3, 4). Sur le plan histologique, il existe des similarités importantes entre les HTAP idiopathiques et celles associées aux connectivites (34, 39) même si des lésions de maladie veino-occlusive pulmonaire sont plus fréquentes chez ces dernières (40).

Ces ressemblances importantes suggèrent que des mécanismes similaires pourraient contribuer à la pathogénie de ces deux types d'affections. A côté de l'hypertrophie de la média, des lésions intimes en bulbe d'oignon et des lésions plexiformes caractéristiques, Cool et collaborateurs ont mis en évidence chez les patients ayant une HTAP associée à la ScS un infiltrat de cellules inflammatoires mononuclées au pourtour des lésions vasculaires plexiformes mais pas au niveau des vaisseaux non lésés ou des structures extra-vasculaires (41).

Comme nous l'avons mentionné plus haut, un nombre important d'autoanticorps a été identifié dans le sérum de patients sclérodermiques, comprenant des autoanticorps spécifiques de la maladie, comme les Ac anti-centromère, anti-topoisomérase 1 et anti-ARN-polymerase et des Ac non spécifiques comme les Ac anti-fibrillarin (U3 small nucleolar RNP), anti-fibrilline 1, anti-Th/To,

anti-PM/Scl, anti-mitochondrie, anti-fibroblastes et anti-CE (21). Ainsi, les Ac anti-CE pourraient jouer un rôle dans la pathogénie de la ScS en activant les CE, en induisant l'expression des molécules d'adhésion (42), et en entraînant l'apoptose en présence de cellules NK (25). De plus, dans des expériences *in-vitro* les autoanticorps de patients ayant une connectivite mixte (anti-U1-RNP, anti-AND double brin) induisent une expression accrue de molécules d'adhésion (ICAM-1, ELAM-1), ainsi que de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II à la surface des CE pulmonaires, suggérant qu'un processus inflammatoire de ce type puisse entraîner des lésions de prolifération et d'inflammation vasculaire (43). Enfin, certains patients ayant une HTAP sévère associée à un LES peuvent s'améliorer sous traitement corticoïde et immunosuppresseur, ce qui laisse supposer que des mécanismes inflammatoires et autoimmuns pourraient jouer un rôle prépondérant chez ce type de patients (44). Cependant, il existe des différences dans la pathogénie des HTAP idiopathiques ou associées aux connectivites. Ainsi, il n'a pas à ce jour été mis en évidence de mutation des gènes codant pour *BMPR2* chez les malades ayant une HTAP associée à la ScS (45) et la susceptibilité génétique de ces deux groupes de patients est probablement différente. De plus, d'autres investigateurs ont suspecté que des autoanticorps anti-*BMPR2* pourraient déclencher une HTAP chez des patients ayant une connectivite mixte. Cependant, ils n'ont pas retrouvé d'autoanticorps de ce type chez ces patients (46). Finalement, les Ac anti-centromère sont associés à la survenue d'une HTAP chez les maladies sclérodermiques, mais leur rôle pathogénique n'est pas clairement établi.

Nicolls et al. (36) ont récemment proposé que des mutations *BMPR2* pourraient être responsables d'un défaut de lymphocytes T régulateurs et pourrait prédisposer à la survenue d'une HTAP. Ainsi, de façon analogue à ce qui est observé chez des patients ayant une mutation sur le gène *AIRE* qui développent une HTAP (47), ils proposent que des mutations du gène codant pour *BMPR2* pourraient en partie au moins participer à la survenue d'une HTAP du fait qu'elles sont responsables de la survenue d'un défaut de tolérance immunitaire périphérique et de ce fait de l'émergence d'autoanticorps. Cela pourrait contribuer à expliquer pourquoi une partie des malades ayant une HTAP idiopathique sans déficit immunitaire ou autre pathologie associée ont en l'absence de toute maladie autoimmune détectable des autoanticorps circulants (48, 49). De la même façon, le rôle de mécanismes autoimmuns est supporté par les études mettant en évidence une association privilégiée entre l'HTAP idiopathique et la survenue de thyroïdites autoimmunes (50, 51).

Nous avons récemment rapporté à l'aide d'une technique d'immunoblot en une dimension la présence d'anticorps anti-CE chez les malades ayant une HTAP primitive (familiale, sporadique, associés à la prise d'anorexigènes), une HTAP associée à la ScS ou une ScS sans HTAP. Nous avons observé que les IgG sériques de malades atteints d'HTAP primitive reconnaissaient spéci-

fiquement 2 bandes protéiques de 36 et 60 kDa au sein d'extraits protéiques de CE de macrocirculation et que les IgG des malades ayant une ScS cutanée limitée avec ou sans HTAP reconnaissent spécifiquement deux bandes protéiques de 75 et 85 kDa au sein d'extraits de CE de microcirculation de poumon (27). Nous avons identifié la protéine centromérique B (CENP-B) comme étant une des cibles des IgG anti-CE chez les malades ayant une ScS cutanée limitée, qu'ils aient ou non une HTAP (26). Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence CENP-B à la surface de ces CE.

Compte tenu de l'implication des fibroblastes dans la pathogénie de l'HTAP et de la ScS, et compte tenu du fait que des Ac anti-fibroblastes ont été mis en évidence dans le sérum de patients sclérodermiques (28, 52, 53, 54), nous avons entrepris d'étudier, avec la même approche, les anticorps anti-fibroblastes chez des malades ayant une HTAP idiopathique ou associée à la ScS. Nous avons également mis en évidence récemment des IgG anti-fibroblastes dans le sérum de patients atteints d'HTAP idiopathique ou associée à la ScS en ELISA et en immunoblot en une dimension (55). Les Ac anti-fibroblastes de patients ayant une HTAP idiopathique et une HTAP associée à une ScS ne reconnaissent pas les mêmes bandes protéiques au sein des extraits de fibroblastes humains normaux en immunoblot en une dimension, laissant penser que les cibles antigéniques pourraient être distinctes au cours de ces deux affections. Cependant, avec cette approche en immunoblot en une dimension associée à la réalisation de séquençage N-terminal, nous n'avons pas réussi à identifier les cibles antigéniques de ces Ac anti-fibroblastes. Afin de tenter d'identifier les cibles antigéniques des anticorps anti-CE et anti-fibroblastes, nous avons développé une approche d'immunoblot en deux dimensions utilisant comme source d'antigènes des HUVEC et des fibroblastes humains normaux associée à un spectromètre de masse (MALDI-TOFF). Les cartes protéiques réalisées à partir de HUVEC ont permis de séparer 1072 spots protéiques de façon reproductible. Les IgG des 12 sujets sains testés reconnaissent un nombre très variable de protéines d'HUVEC (51 ± 37 spots reconnus). Douze taches protéiques étaient reconnues par les IgG de l'ensemble des sujets sains, parmi lesquelles 11 ont pu être identifiées : elles correspondaient à des protéines du cytosquelette (actine et vimentine), à des enzymes impliquées dans la glycolyse (plusieurs isoformes de l'alpha-énolase et de la glyceraldéhyde 3-phospho-deshydrogénase) et à la prolyl-4-hydroxylase, enzyme jouant un rôle important dans la réponse à l'hypoxie cellulaire (56). Tous ces antigènes naturellement reconnus par les sujets sains correspondent à des protéines ubiquitaires, remplissant des fonctions clés dans la cellule et hautement conservées entre espèces.

Dans le cadre d'un contrat d'investigation et de recherche clinique (CIRC) obtenu en 2005, HTAP-Ig CRC 05066, nous avons entrepris d'identifier les cibles antigéniques des Ac anti-CE, anti-fibroblastes et anti-cellules musculaires lisses vasculaires de malades ayant une HTAP idio-

pathique, ou associée à la ScS comparativement à des patients ayant une ScS sans HTAP. Dans cette étude initiée en 2005, 50 malades atteints d'HTAP idiopathique, 30 malades ayant une HTAP de ScS et 100 malades ayant une ScS sans HTAP ont été inclus.

A l'aide de la technique d'immunoblot en deux dimensions, nous avons pu mettre en évidence que les IgG sériques de patients avec HTAP idiopathique (sporadique), familiale, associée à la prise d'anorexigènes ou à une ScS reconnaissent 103 ± 31 , 63 ± 20 , 78 ± 11 et 81 ± 12 tâches protéiques respectivement, alors que 43 ± 22 tâches protéiques étaient reconnues par les IgG sériques des sujets sains (57). Vingt-et-une tâches protéiques étaient reconnues spécifiquement par les IgG sériques des patients présentant une HTAP. Seize spots protéiques ont été identifiés par spectrométrie de masse, incluant la vimentine, la calumenine, la tropomyosine 1, HSP27 et HSP70, la glucose-6-phosphate déshydrogénase, la PI3-kinase et la DAP-kinase (57). Ainsi, nous avons pu montrer que les anticorps anti-fibroblastes détectés chez les patients présentant une HTAP reconnaissent des cibles antigéniques exerçant des rôles clés en biologie cellulaire et dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Dans un travail en cours de rédaction, nous avons également pu mettre en évidence que parmi les cibles antigéniques des Ac anti-fibroblaste chez les malades sclérodermiques figure l'alpha-énolase et que ces Ac identifiés en ELISA vis-à-vis d'alpha enolase humaine recombinante ou de l'alpha-énolase de *saccharomyces cerevisiae* étaient associés à la présence d'anticorps anti-topoisomérase 1, à la présence d'une fibrose pulmonaire et négativement associés à la survie (58).

Cependant, la détection des cibles antigéniques ne suffit pas pour démontrer l'implication d'autoanticorps dans la pathogénie de la maladie et le rôle pathogène potentiel de ces autoanticorps et leur valeur prédictive dans des groupes de patients à risque de développer une HTAP comme les patients sclérodermiques ou les collatéraux au premier degré de patients ayant une HTAP familiale devront être étudiés (59). De plus, les cibles antigéniques des Ac anti-CE et des Ac anti-fibroblastes devront être étudiées chez les malades atteints d'HTAP en dehors d'une forme idiopathique ou associée à la ScS comme les formes associées aux cardiopathies congénitales, à une infection VIH, à une hypertension portale, au LES, au syndrome Sharp et au syndrome de Sjögren.

Enfin, une meilleure compréhension du rôle exact que jouent l'autoimmunité et l'inflammation dans la pathogénie de l'HTAP devrait permettre de définir de nouvelles cibles thérapeutiques dans cette affection de pronostic péjoratif.

I - 3 - RESULTATS ATTENDUS ET PERSPECTIVES

I - 3 - 1 - Identification des cibles antigéniques des autoanticorps

I - 3 - 1 - a - Résultats attendus

- Identification des cibles antigéniques des Ac anti-cellules endothéliales, anti-fibroblastes et anti-cellules musculaires lisses vasculaires de patients atteints d'HTAP non idiopathique et non associée à la sclérodémie systémique et comparaison de ces cibles à celles identifiées chez les malades ayant une HTAP idiopathique ou associée à la sclérodémie systémique.
- Détection par ELISA utilisant des protéines recombinantes d'auto anticorps associés à l'HTAP spécifiques de chacun des groupes testés.
- Valider des marqueurs immunologiques d'intérêt pronostique au cours de l'HTAP idiopathique ou associée à la sclérodémie systémique

I - 3 - 1 - b - Perspectives

La caractérisation des cibles antigéniques Ac anti-CE, anti-fibroblastes et anti-cellules musculaires lisses vasculaires spécifiquement reconnues par les IgG sériques ou les IgG purifiées du sérum de malades ayant une HTAP ouvrirait des perspectives en terme de dépistage au sein d'une population à risque et pourrait ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques.

I - 3 - 2 - Etude de la production de radicaux libres *in vitro*

I - 3 - 2 - a - Résultats attendus

- Constitution de sous groupes de patients atteints d'HTAP dont le sérum entraîne *in vitro* la production de différents types de radicaux libres testés et/ou la prolifération cellulaire.
- Evaluation de l'intérêt pronostique de la mesure de la production de radicaux libres *in vitro* (corrélations avec les données cliniques et du cathétérisme droit).
- Evaluation *in vitro* chez les producteurs de FRO du pouvoir inhibiteur des différents traitements vasodilatateurs et corrélation des résultats obtenus *in vitro* à l'inclusion et à un an aux résultats obtenus *in vivo* sous traitement.

I - 3 - 2 - b - Perspectives

La quantification de la production de FRO par les cellules cibles *in vitro*, en présence du sérum des patients pourrait se révéler utile pour évaluer l'évolutivité de la maladie ; d'autre part, l'étude de l'inhibition de la production de FRO au cours des tests *in vitro* pourrait permettre de prédire, donc de sélectionner les molécules susceptibles d'être efficaces à des fins thérapeutiques.

II – OBJECTIF DE L'ETUDE

II - 1 - HYPOTHESES TESTEES

Il existe des auto anticorps anti-cellules endothéliales, anti-fibroblastes, anti-cellules musculaires lisses vasculaires au cours des autres formes d'HTAP que l'HTAP idiopathique et l'HTAP associée à la sclérodermie systémique.

Certaines sous populations de patients ayant une HTAP sont producteurs de FRO ou inducteurs de prolifération cellulaire en présence de sérum total.

II - 2 - OBJECTIF PRINCIPAL

Identifier des marqueurs immunologiques d'intérêt pronostique au cours de l'HTAP idiopathique ou associée à la sclérodermie systémique

II - 3 - OBJECTIFS SECONDAIRES

Identifier des marqueurs immunologiques d'intérêt pronostique au cours des autres formes d'HTAP.

Déterminer les valeurs pronostiques des marqueurs immunologiques et/ou de la synthèse des radicaux libres au cours de l'HTAP

Tester l'efficacité *in vitro* de différents traitements vasodilatateurs sur les différents radicaux libres.

Corréler les résultats d'identification de production de radicaux libres et l'effet biologique *in vitro* des différents vasodilatateurs à la réponse thérapeutique clinique *in vivo*.

III – METHODOLOGIE

III - 1 - TYPE D'ETUDE

Il s'agit d'une étude prospective multicentrique interventionnelle.

III - 2 - DUREE DE L'ETUDE

La durée totale de l'étude est de 36 mois. La période d'inclusion est de 24 mois. Pour chaque patient, la durée de participation à l'étude sera de 12 mois.

Aucune période d'exclusion pour les recherches biomédicales n'est prévue dans le cadre de cette recherche.

IV – POPULATION ETUDIEE

IV - 1 - CRITERES D'INCLUSION

- Les malades âgés de plus de 18 ans.
- Seuls les malades ayant une HTAP pré-capillaire seront inclus sur la base de la mise en évidence d'une HTAP par cathétérisme droit (pression artérielle pulmonaire moyenne au repos supérieure à 25 mm Hg, ou pression artérielle pulmonaire moyenne à l'effort de 30 mm Hg).
- Les malades ayant une HTAP idiopathique ne devront pas avoir de maladie systémique associée.
- Les malades infectés par le VIH1 ayant ou non à une HTAP (sur la base d'un test ELISA + western blot positifs).
- Les malades ayant une hypertension portale associée ou non à une HTAP devront répondre aux critères suivants : mise en évidence de varices oesophagiennes à l'endoscopie, analyse des flux portes à l'échographie Doppler et confirmation d'un gradient de plus de 5 mmHg au cathétérisme des veines sus-hépatiques libres et bloquées (104).
- Les malades ayant une cardiopathie congénitale associée ou non à une HTAP devront répondre aux critères suivants : mise en évidence d'une communication inter-auriculaire, inter-ventriculaire ou d'une persistance du canal artériel par imagerie (imagerie par résonance magnétique et/ou échocardiographie) confirmées par cathétérisme cardiaque (37).

- Les malades sclérodermiques répondront aux critères de l'American College of Rheumatology (ACR) (105) et/ou aux critères de Leroy et Medsger (106).
- Les malades ayant une connectivite mixte (syndrome SHARP) associée ou non à une HTAP devront répondre aux critères de Sharp (107).
- Les malades ayant un LES associé ou non à une HTAP devront répondre aux critères de l'ACR révisés et actualisés (108 , 109).
- Les malades ayant un syndrome de Sjögren associé ou non à une HTAP devront répondre aux critères Américano-Européens (110).
- Les malades ayant une HTAP post-embolique proximale opérable répondront aux critères suivants : défauts scintigraphiques segmentaires et matériel endo-vasculaire artériel pulmonaire chez un patient souffrant d'HTAP et confirmation du caractère obstructif et opérable à l'angiographie pulmonaire (111).
- Malades ayant reçu une information éclairée et acceptant de signer le consentement éclairé
- Les malades affiliés à ou bénéficiaire d'un régime d'assurance maladie.

IV - 2 - CRITERES DE NON INCLUSION

- Mineurs
- Femmes enceintes
- Absence de signature du consentement éclairé.
- Tumeur maligne associée

IV - 3 - NOMBRE DE SUJETS NECESSAIRES

La justification du nombre de sujets à inclure repose sur les comparaisons de moyenne des données résultantes de la technique ELISA. Cette technique sera utilisée pour les protéines détectées lors de la phase « préliminaire » d'immunoblot 2D. Sur la base des travaux menés à bien dans notre laboratoire à l'aide de la même approche, on peut s'attendre à ce qu'une dizaine de protéines soit sélectionnée lors de cette phase. Compte tenu du nombre relativement important de comparaisons qui en résultent, le nombre de patients à inclure prend en compte la correction dite du « rough false discovery rate ». Ainsi, pour un risque de première espèce global de 5% (et donc des tests « individuels » faits au niveau de confiance de $11/20 * 5\% = 2.75\%$) et pour une puissance de 80%, l'inclusion de 20 patients atteints de HTAP et 20 patients sans HTAP par sous-groupe (par exemple, le sous groupe des patients

ayant un syndrome de Sharp) permettra de mettre en évidence des différences de moyenne de l'ordre d'un écart-type.

En prenant de plus en compte les possibilités d'inclusion du fait de la rareté de la maladie, le protocole prévoit l'inclusion de 360 patients au total (plus 180 sujets sains), répartis comme suit.

Cent quatre vingt patients atteints d'HTAP seront inclus dans l'étude :

- 50 patients atteints d'HTAP idiopathique,
- 20 ayant une HTAP associée à une infection par le VIH,
- 20 ayant une HTAP associée à une hypertension portale,
- 20 ayant une HTAP associée à une cardiopathie congénitale,
- 20 ayant une HTAP associée à une ScS,
- 20 ayant une HTAP associée à un LES
- 20 ayant une HTAP associée à un syndrome de Sharp
- 10 ayant une HTAP associée à un syndrome de Sjögren.

Cent soixante patients n'ayant pas d'HTAP seront également inclus :

- 40 ayant une ScS,
- 20 ayant une infection par le VIH,
- 20 ayant une hypertension portale,
- 20 ayant une cardiopathie congénitale,
- 20 ayant un LES
- 20 ayant un syndrome de Sharp
- 20 ayant un syndrome de Sjögren.

Vingt patients ayant une hypertension portale post-embolique proximale opérable seront inclus dans un groupe contrôle.

Chaque patient atteint d'HTAP sera apparié pour le sexe et l'âge à un volontaire sain (groupe contrôle).

Au total de 360 patients et 180 sujets sains, soit 540 personnes seront incluses dans l'étude

IV - 4 - MODE DE RECRUTEMENT

Les patients seront recrutés dans le service de Médecine Interne de l'hôpital Cochin à Paris, Centre de référence pour les maladies autoimmunes systémiques rares vascularites nécrosantes et sclérodémie systémique, dans le service de Médecine Interne du CHRU de Lille, Centre de référence pour les maladies autoimmunes systémiques rares sclérodémie systémique et dans le service de pneumologie de l'hôpital Antoine Béchère à Clamart, Centre de référence national pour les maladies vasculaires pulmonaires.

Plus précisément :

- les patients ayant une HTAP idiopathique ou associée à une infection VIH, une hypertension portale, une cardiopathie congénitale, et les patients ayant une hypertension pulmonaire post embolique proximale opérable seront recrutés dans le service de pneumologie, hôpital Antoine Béchère à Clamart ;
- les patients ayant une HTAP associée à une ScS, un lupus érythémateux systémique (LES), un syndrome Sharp, un syndrome de Sjögren associé dans les 3 centres.
- les patients ayant une ScS, une infection VIH, une hypertension portale, un LES, un syndrome Sharp, un syndrome de Sjögren non associés à une HTAP seront recrutés dans le Pôle de Médecine Interne de l'hôpital Cochin à Paris et le service de Médecine Interne du CH-RU de Lille.

Tous devront répondre aux critères d'inclusion et signer un consentement éclairé.

Chaque patient atteint d'HTAP sera apparié pour le sexe et l'âge à un volontaire sain.

Cent quatre vingt sujets sains seront recrutés parmi les donneurs de sang réguliers à l'Etablissement Français du Sang (EFS) sous la responsabilité du Dr Geneviève Woimant. Ce centre a une capacité d'inclusion de 150 donneurs sains par mois. Dans un premier temps, les patients seront inclus. Les sujets sains seront inclus dans un deuxième temps, de façon à connaître l'âge des patients et choisir des sujets sains appariés pour le sexe et l'âge. Des sujets sains de plus de 65 ans seront recrutés en fonction des besoins parmi les patients pris en charge à l'EFS pour une autotransfusion dans le cadre d'une intervention orthopédique froide programmée.

V – CRITERES D'EVALUATION

V - 1 - CRITERE DE JUGEMENT PRINCIPAL

Identification des cibles antigéniques des Ac anti-cellules endothéliales, anti-fibroblastes et anti-cellules musculaires lisses vasculaires de patients atteints d'HTAP non idiopathique et non associée à la sclérodémie systémique et comparaison de ces cibles à celles identifiées chez les malades ayant une HTAP idiopathique ou associée à la sclérodémie systémique.

V - 2 - CRITERE DE JUGEMENT SECONDAIRE

1. Détection par ELISA utilisant des protéines recombinantes d'autoanticorps associés à l'HTAP spécifiques de chacun des groupes testés. Calcul de la valeur prédictive positive (VPP) et de la valeur prédictive négative de chacun de ces tests pour chaque groupe de patients testé.
2. Constitution de sous groupes de patients atteints d'HTAP dont le sérum entraîne *in vitro* la production de différents types de radicaux libres testés et/ou la prolifération cellulaire.
3. Evaluation de l'intérêt pronostique de la mesure de la production de radicaux libres *in vitro* (corrélations avec les données cliniques et du cathétérisme droit).
4. Evaluation *in vitro* chez les producteurs de FRO du pouvoir inhibiteur des différents traitements vasodilatateurs et corrélation des résultats obtenus *in vitro* à l'inclusion et à un an aux résultats obtenus *in vivo* sous traitement.

V - 3 - CALENDRIER DES EVALUATIONS DANS LES DIFFERENTS GROUPES

L'évaluation des critères de jugement se fera à V1 (visite d'inclusion) et 12 mois plus tard (V2 – M12).

VI – DEROULEMENT DE L'ETUDE POUR UN PATIENT

Une visite d'inclusion et une visite à 1 an sont prévues.

VI - 1 - VISITE V1 - VISITE D'INCLUSION

L'investigateur informera les patients potentiellement éligibles sur l'étude et leur proposera de signer un formulaire de consentement éclairé.

Après signature du consentement éclairé, l'investigateur vérifiera les critères d'éligibilité et recueillera les données démographiques ainsi que les paramètres habituellement pris en compte dans le cadre de la prise en charge de l'HTAP et/ou de la pathologie de fond.

Deux tubes secs de 7 ml seront prélevés à l'occasion du bilan de l'HTAP et/ou de la pathologie potentiellement associée à une HTAP (infection VIH, hypertension portale, cardiopathie congénitale, sclérodermie systémique, LES, syndrome Sharp, syndrome de Sjögren) ou d'une hypertension pulmonaire post-embolique proximale opérable. Ces tubes seront prélevés dans chacun des trois centres investigateurs prenant en charge des patients. Ils seront centrifugés sur place et les surnageants (sérums) seront conservés à -80°C sur place jusqu'à la fin de l'étude. Le transport vers le laboratoire du Pr Mouthon se fera secondairement de façon sécurisée par un des membres de l'équipe du Pr Mouthon.

Les patients sclérodermiques, en plus des deux prélèvements de sérum, auront une biopsie cutanée réalisée le jour de l'inclusion pour mise en culture de fibroblastes. La biopsie sera réalisée à l'aide d'un punch 3 mm. La douleur sera prévenue par la réalisation d'une anesthésie locale. Un point de suture sera effectué après la biopsie. La biopsie sera déposée dans une compresse stérile imprégnée de sérum physiologique et acheminée à température ambiante au laboratoire du Pr Mouthon, UPRES EA 4058.

En fin de visite, une déclaration d'inclusion sera envoyée à l'Unité de Recherche clinique Paris Centre - Tarnier (fax : 01 58 41 11 83) qui attribuera en retour un numéro de patient.

Les volontaires sains appariés pour le sexe et l'âge aux patients atteints d'HTAP seront recrutés à l'occasion d'un don du sang à l'EFS, après signature d'un consentement éclairé. L'URC sera informée par Fax de l'inclusion des volontaires sains par l'EFS.

VI - 2 - VISITE V2 - VISITE A M12

A M12, les paramètres habituellement pris en compte dans le cadre de la prise en charge de l'HTAP et/ou de la pathologie de fond seront colligés

Deux tubes secs de 7 ml seront prélevés à l'occasion du bilan de l'HTAP et/ou de la pathologie potentiellement associée à une HTAP (infection VIH, hypertension portale, cardiopathie congénitale, sclérodémie systémique, LES, syndrome Sharp, syndrome de Sjögren).

VI - 3 - SORTIE DE L'ESSAI ET SORTIE PREMATUREE

Les participants sortiront de l'étude après 12 mois de suivi.

S'il le désire un participant peut, à tout moment, arrêter sa participation, cela ne changera rien à la qualité des soins, ni à ses relations avec son médecin.

En cas de sortie prématurée, l'investigateur doit en documenter les raisons de façon aussi complète que possible. Les sorties d'essai devront être rapportées notamment aux raisons suivantes :

- Refus du sujet à poursuivre sa participation à l'essai
- Erreur diagnostique
- Perdu de vue

Si un participant ne se présente pas aux visites de contrôle, l'investigateur en ayant la charge devra le contacter afin d'établir son état lors de cette sortie d'étude. S'il est impossible de contacter le patient, il sera considéré comme perdu de vue à la date de la dernière consultation.

VI - 4 - ARRET DE L'ETUDE

Un arrêt anticipé de l'ensemble de l'étude peut être décidé par le promoteur pour

- recrutement insuffisant
- problèmes techniques non résolus
- désir exprimé par les investigateurs
- violations répétées et non justifiées du protocole

VI - 5 - EXPERIENCES REALISEES SUR LES PRELEVEMENTS

Les expériences seront réalisées dans trois laboratoires :

- UPRES EA 1833, hôpital Cochin et Université Paris-Descartes : expériences de production de FRO et tests de prolifération cellulaire, expériences d'inhibition ;
- UPRES EA 4058, hôpital Cochin et Université Paris-Descartes : expériences d'immunoblot en deux dimensions ;
- Laboratoire d'Immunologie, CHRU de Lille : expériences d'immunoblot en deux dimensions ;

La spectrométrie de masse sera réalisée sur deux sites :

- CNRS (UMR 8104), Dr Patrick Mayeux, Laboratoire de protéomique de l'Université Paris Descartes, Institut Cochin, 22 rue Mechain, Paris ;
- Centre d'Analyse Protéomique de l'Artois (CAPA) (Dr. Christophe Flahaut Laboratoire de physiopathologie de la barrière hémato-encéphalique - Université d'Artois –Lens)

L'ensemble des expériences d'immunoblot en 2D sera réalisé vis-à-vis d'extraits cellulaires totaux de CE (HUVEC et CE de microcirculation de poumon), de fibroblastes et de cellules musculaires lisses vasculaires avec l'ensemble des sérums de patients ayant une HTAP et des groupes contrôles correspondants sera réalisé au sein de l'EA 4058. Les extraits de membranes de CE, de fibroblastes et de cellules musculaires lisses vasculaires en vue d'effectuer des immunoblots en une dimension seront réalisés au sein de l'U4058.

Les expériences d'immunoblot en 2D seront réalisées vis-à-vis d'extraits cellulaires totaux de CE (HUVEC et cellules endothéliales de microcirculation de poumon), de fibroblastes et de cellules musculaires lisses vasculaires avec les sérums de patients ayant un LES, syndrome Sharp ou syndrome de Sjögren avec ou sans HTAP pour confirmation au CHRU de Lille. Les expériences d'immunoblot à partir de grands gels en une dimension à partir d'extraits de membranes de CE, de fibroblastes et de cellules musculaires lisses vasculaires seront réalisés au sein du laboratoire d'immunologie du CHRU de Lille.

VI - 5 - 1 - Etude du stress oxydant

VI - 5 - 1 - a - Mesures des taux de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et d'oxyde nitrique (NO) produits par les cellules exposées aux sérums de patients et de sujets sains.

Des HUVEC, des fibroblastes NIH 3T3, des fibroblastes humains normaux et des fibroblastes autologues (dans le cas des patients sclérodermiques) (8×10^3 par puits) seront ensemencés dans des plaques de 96 puits (Costar, Corning, Inc, NY) et cultivés avec leur milieu de croissance respectif pendant 12 heures à 37°C dans une atmosphère avec 5% de CO₂. Après 12 heures, les milieux de cultures seront jetés et les cellules seront pré-incubées avec 50 µl de diacétate de 2',7'-dichlorodihydrofluoresceine (H2-DCFDA) dilué 1:1000 dans du PBS pour mesurer la production d'H₂O₂ production ou avec 50 µl diacétate de 4,5-diaminofluoresceine (DAF2-DA) dilué 1:375 dans du PBS pour mesurer le NO libéré. Après 30 minutes, 50 µl d'une dilution au ¼ du sérum de patient ou de sujet sain seront déposés dans chaque puits. Les concentrations de H₂O₂ et de NO seront mesurées par spectrofluorométrie. Les résultats seront exprimés en unités arbitraires (U. A.) par minutes et par million de cellules.

VI - 5 - 1 - b - Mesure de la prolifération des cellules exposées aux sérums de patients et de sujets sains.

Des fibroblastes NIH 3T3 (4×10^3 par puit), des fibroblastes humains normaux et des fibroblastes autologues (pour les patients sclérodermiques) seront ensemencés dans des plaques de 96 puits (Costar) et incubées avec 50 μ l d'une dilution au $\frac{1}{4}$ de sérum de patient ou de sujet sain à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 48 heures. Le taux de prolifération des cellules sera déterminé par l'incorporation de [³H]thymidine (1 μ Ci/puit) pendant les 16 dernières heures de culture. Les résultats seront exprimés en nombre absolu de coups par minute.

VI - 5 - 1 - c - Mesure de la concentration en produits issus de l'oxydation des protéines (advanced oxidation protein products (AOPP)) dans le sérum

Les AOPP seront quantifiés par spectrophotométrie (lecteur de plaques Fusion, PerkinElmer, Wellesley, MA, USA). La calibration sera effectuée avec de la chloramine T (concentrations de 0 à 100 μ mol/l). Les concentrations en AOPP seront exprimées en μ mol/l d'équivalents de chloramine-T.

VI - 5 - 1 - d - Effets de médicaments et de molécules anti-oxydantes sur la production de formes réactives de l'oxygène induite par le sérum de patients atteints de sclérodermie systémique et/ou d'HTAP

Les sérums de sujets ayant une ScS et/ou une HTAP seront incubés avec chaque molécule pendant 90 minutes à 37°C. Tous les produits chimiques seront préparés extemporanément dans du PBS, immédiatement avant leur utilisation. Le contrôle sera représenté par du PBS seul. Les HUVEC (8×10^3 par puit) cultivées dans des plaques de 96 puits seront pré-incubées avec 50 μ l d'H₂-DCFDA ou de DAF2-DA. Après 30 minutes, 50 μ l d'une dilution au $\frac{1}{4}$ de sérum mélangé aux traitements sera déposé sur les cellules et la production d'H₂O₂ et de NO sera mesurée comme précédemment décrit. Dans d'autres expériences, les HUVEC seront incubées avec 1600 μ M de N-acetyl-L-cysteine (NAC), ou 400 μ M de glutathion réduite (GSH), ou 10 U PEG-catalase pendant 18 heures à 37°C dans une atmosphère avec 5% de CO₂. Le surnageant sera ensuite jeté et 50 μ l de fluorochrome dilué dans du PBS puis 25 μ l d'une dilution au $\frac{1}{4}$ de sérum de sujets atteints de ScS et/ou d'HTAP seront ajoutés. Les productions d'H₂O₂ et de NO seront mesurées comme décrit précédemment. Les résultats seront exprimés en pourcentages de radicaux libres produits par rapport à la production induite par le sérum de malades sans traitement (100%).

VI - 5 - 1 - e - Effets de médicaments et de molécules anti-oxydantes sur la prolifération des fibroblastes induite par le sérum de patients atteints de sclérodémie systémique et/ou d'HTAP

Des fibroblastes NIH 3T3 (4×10^3 par puit) seront cultivés dans des plaques de 96 puits et incubés avec des sérums de sujets atteints de ScS et/ou d'HTAP dilués 1:4 comme décrit précédemment. Une des solutions contenant les molécules suivantes seront ajoutées: anti-oxydants (NAC, GSH réduite, PEG-catalase), anti-fibrosants (D-penicillamine), inhibiteurs calciques (nifedipine, nifedipine), dérivés de la prostacycline (epoprostenol, prostacycline IV), inhibiteurs des récepteurs de l'endothéline (bosentan, sitaxentan, ambrisentan), inhibiteurs de la phosphodiesterase de type 5 (sildenafil, taladafil), immunosuppresseurs (cyclophosphamide, azathioprine, mycophenolate mofetyl, methotrexate, 5FU) avec ou sans NAC. Les cellules seront incubées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ pendant 48 heures. La prolifération cellulaire sera mesurée comme précédemment décrite. Les résultats seront exprimés en pourcentages de prolifération par rapport à la prolifération fibroblastique induite par le sérum de patients sans adjonction de traitement (100%).

VI - 5 - 2 - Technique d'immunoblot monomensionnel

VI - 5 - 2 - a - Extraction des protéines

Les membranes des cellules (HUVEC, fibroblastes humains normaux) seront homogénéisées dans un tampon Tris contenant du sodium dodecyl sulfate (SDS) 5% à une concentration finale de 10 mg/ml and chauffé à 95°C pendant 10 minutes. Quarante vingt microlitres de ce lysat sera chargé sur un gel d'électrophorèse en gradient d'acrylamide 10/20 %, à côté d'un marqueur de masse moléculaire (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Juste avant l'électrophorèse, l'homogénat est réduit par du dithiothreitol 10 mM (Sigma, St Louis, MO).

VI - 5 - 2 - b - Technique de séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle

La migration est effectuée à 90 volts durant 14-16 heures dans un tampon Laemmli à 100 V. Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose ECL (Amersham Pharmacia Biotech) à 0,8 mA/cm² pendant 2 heures. La membrane sera ensuite saturée pendant une demi-heure dans une solution de PBS/Tween 0.1 % comprenant 5 % de lait délipidisé. Le tampon de transfert utilisé est constitué de TRIS 3,03 grade, de 14,4 g de glycine dilués dans 200 ml de méthanol et 750 ml d'eau distillée. La membrane saturée sera coupée en bandelettes de 4 mm de largeur. L'hybridation primaire sera effectuée sur une nuit à 4° C avec une dilution des sérums au 1/100ème dans la même solution saturée en lait. Après trois lavages de 10 minutes en

PBS/Tween 0,1 %, on effectue l'hybridation secondaire à température ambiante avec un Ac produit chez la chèvre dilué au 1/10 000ème dirigé contre le fragment de fixation du complément des IgG humaines et couplée à une activité peroxydase (sigma-Aldrich). On effectuera à nouveau 3 lavages de 10 minutes en PBS/Tween à 0.1 % puis on procédera à la révélation avec le kit et les films ECL (Amersham Pharmacia Biotech). Les films d'immuno-empreintes seront numérisés grâce au logiciel Quantity One (Bio-Rad Hercules CA). L'analyse des immuno-empreintes réalisée sera qualitative. On notera ainsi la présence ou l'absence de bandes antigéniques. L'intensité des bandes antigéniques ne sera pas prise en compte. Les films numérisés seront soumis à l'analyse de 2 observateurs indépendants pour la détection et l'alignement des bandes antigéniques grâce au logiciel Diversity Database 2.2 (Biorad). Afin de faciliter le travail difficile d'alignement des bandes antigéniques, des sérums de référence seront utilisés pour chaque immuno-empreinte.

VI - 5 - 3 - Technique d'immunoblot quantitatif bidimensionnelle

VI - 5 - 3 - a - Extraction des protéines

Les conditions d'extraction des protéines pour la réalisation d'une électrophorèse bidimensionnelle varient en fonction des protéines contenues dans les différents compartiments cellulaires et de leurs comportements au contact de différents détergents ou additifs. Nous utiliserons des extraits protéiques de CE (cellules endothéliales de veine ombilicale humaine normale (HUVEC)), de fibroblastes humains normaux, de fibroblastes de patients sclérodermiques ainsi que des extraits protéiques de cellules musculaires lisses vasculaires obtenues à partir de patients ayant subi un pontage aorto-coronaire immortalisées avec SV40 et la télomérase (collaboration avec le Docteur Babette B Weksler, Weill Medical College of Cornell University, New York, NY, USA) comme sources d'antigènes. Nous utiliserons des conditions expérimentales permettant d'analyser des réactivités vis-à-vis des Ag cibles des auto-Ac naturels (pH isoélectrique de 3 à 10 et gradient de poids moléculaire de 14 à 200 kDa) (56, 103).

VI - 5 - 3 - b - Technique de séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle permet de séparer les protéines selon leur pH isoélectrique et leur poids moléculaire (pH isoélectrique entre 3 et 10 et poids moléculaire entre 14 et 200kDa) grâce à une étape d'isoélectrofocalisation suivie d'une migration sur un gel d'acrylamide présentant un gradient de 7 à 18% d'acrylamide. Sur un gel d'électrophorèse 2-D, plus de mille protéines peuvent ainsi être séparées, visualisées et quantifiées. L'interprétation des résultats obtenus sur les gels ne peut être réalisée visuellement, mais nécessite une numérisation des gels (Power-

Look 2100XL, UMAX Data Systems Inc., Taipei, Taiwan), suivie d'une analyse des spots d'un point de vue qualitatif, quantitatif et statistique à l'aide du logiciel d'analyse d'images IMAGE MASTER™ 2D PLATINUM® (version 5.0, Amersham Biosciences) possédant en particulier des outils puissants d'analyse statistique particulièrement adaptés à la recherche biomédicale. Une adaptation à l'analyse de blots 2D des macros utilisées pour l'analyse des gels 1D a été effectuée dans notre laboratoire (56).

VI - 5 - 3 - c - Technique d'immunoblot quantitatif 2-D

Une fois la migration des protéines achevée, les protéines sont transférées sur des membranes de PVDF puis mises en contact avec les sérums. La quantification des réactivités est réalisée en densitométrie à l'aide d'un scanner haute résolution (Epson Perfection 1240S; Seiko Epson Corp., Nagano-Ken, Japon). Les membranes sont ensuite colorées à l'or colloïdal afin de révéler les bandes protéiques transférées (Protogold®, British BioCell International, Cardiff, R.U.).

VI - 5 - 3 - d - Spectrométrie de masse

Grâce à des progrès en instrumentation (gains très importants en sensibilité et résolution), la spectrométrie de masse permet aujourd'hui d'identifier rapidement une protéine repérée sur un gel. La spectrométrie de masse permet de transformer des molécules dans leur état naturel en ions à l'état gazeux et d'obtenir leur masse moléculaire en analysant leur rapport de masse/charge. Dans notre projet, une fois révélées, les taches protéiques reconnues par les IgG d'un groupe de patients donné mais pas par les autres groupes seront excisées à partir d'un gel identique à ceux qui sont utilisés pour le transfert. Ces protéines seront ensuite soumises à une digestion enzymatique par une endoprotéase, la trypsine. Les peptides obtenus sont caractéristiques de la protéine à identifier et seront analysés en spectrométrie de masse MALDI-TOF-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight-Time-of-Flight'). La spectrométrie de masse permet de mesurer l'empreinte peptidique massique de la protéine

Le point isoélectrique et le poids moléculaire expérimentaux associés à l'empreinte peptidique massique permettent l'identification des protéines en utilisant un moteur de recherche des banques de données protéiques. Le moteur de recherche MASCOT (Matrix Science London, GB) disponible en version 8 biprocesseurs sur la plate-forme protéomique Paris Descartes permet une identification rapide et un degré de confiance important des protéines candidates.

VI - 5 - 3 - e - Confirmation des cibles antigéniques identifiées

Nous confirmerons ensuite la pertinence des cibles des anticorps anti-CE, anti-fibroblastes et anti-cellules musculaires lisses vasculaires par des tests ELISA à partir de protéines recombinan-

tes ou purifiées et/ou des tests utilisant des lignées surexprimant la protéine cible ou transfectées avec le gène codant pour la protéine cible. Grâce à des tests ELISA et/ou des immunoblots en une dimension, nous étudierons l'expression des Ac dirigés contre les nouvelles cibles antigéniques chez un grand nombre de patients ayant une HTAP associée à différentes étiologies. Les fonctions des Ac et de leurs Ag cibles seront caractérisées en purifiant ces Ac à partir des sérums de patients atteints d'HTAP et nous étudierons la modulation de la fonction de la protéine cible par ces Ac, ainsi que la production de FRO. Nous déterminerons les caractéristiques phénotypiques des patients ayant des IgG spécifiques d'un Ag donné.

VI - 5 - 3 - f - Mise au point de tests ELISA

Mise au point de tests ELISA utilisant la protéine recombinante de manière à confirmer la pertinence des cibles identifier et à tester rapidement un nombre plus grand d'échantillons de sérums.

VII – CONTROLE ET ASSURANCE DE LA QUALITE

La recherche sera encadrée selon les procédures opératoires standard du promoteur.

Le déroulement de la recherche dans les centres investigateurs et la prise en charge des sujets sera faite conformément à la déclaration d'Helsinki et les Bonnes Pratiques en vigueur.

VII - 1 - PROCEDURES DE MONITORING

Les ARCs représentants du promoteur effectueront des visites des centres investigateurs au rythme correspondant au schéma de suivi des patients dans le protocole, aux inclusions dans les différents centres et au niveau de risque qui a été attribué à la recherche. Il s'agit d'une recherche de niveau de risque A.

- Visite d'ouverture de chaque centre : avant inclusion, pour une mise en place du protocole et prise de connaissance avec les différents intervenants de la recherche biomédicale.

- Lors des visites suivantes, les cahiers d'observation seront revus au fur et à mesure de l'état d'avancement de la recherche par les ARC. L'investigateur principal de chaque centre ainsi que les autres investigateurs qui incluent ou assurent le suivi des personnes participant à la recherche s'engagent à recevoir les ARC à intervalles réguliers.

Lors de ces visites sur site et en accord avec les Bonnes Pratiques Cliniques, les éléments suivants seront revus :

- Respect du protocole et des procédures définies pour la recherche,

- Vérification des consentements éclairés des patients
 - Examen des documents source et confrontation avec les données reportées dans le cahier d'observation quant à l'exactitude, les données manquantes, la cohérence des données selon les règles édictées par les procédures du DRCD.
- Visite de fermeture : récupération des cahiers d'observation, documents de la recherche biomédicale, archivage.

VII - 2 - TRANSCRIPTION DES DONNEES DANS LE CAHIER D'OBSERVATION

Les données de suivi de chaque patient seront recueillies dans un cahier d'observation sous forme de fiches papier de format A4 qui seront secondairement saisies dans une base de données.

Toutes les informations requises par le protocole doivent être fournies dans le cahier d'observation et une explication donnée par l'investigateur pour chaque donnée manquante.

Les données devront être transférées dans les cahiers d'observation au fur et à mesure qu'elles sont obtenues qu'il s'agisse de données cliniques ou para-cliniques. Les données devront être copiées de façon nette et lisible à l'encre noire dans ces cahiers (ceci afin de faciliter la duplication et la saisie informatique).

Les données erronées dépistées sur les cahiers d'observation seront clairement barrées et les nouvelles données seront copiées sur le cahier avec les initiales et la date par le membre de l'équipe de l'investigateur qui aura fait la correction.

L'anonymat des sujets sera assuré par un numéro de code et les initiales de la personne qui se prête à la recherche sur tous les documents nécessaires à la recherche, ou par effacement par les moyens appropriés des données nominatives sur les copies des documents source, destinés à la documentation de la recherche.

Les données informatisées sur un fichier seront déclarées à la CNIL selon la procédure adaptée au cas.

VIII – GESTION DES DONNEES STATISTIQUES

Toutes les données quantitatives seront exprimées en moyenne \pm écart type, ou médiane et range (selon le nombre d'observations et la distribution de la variable). Les données quantitatives seront comparées avec les tests appariés et non appariés t de Student, ou Wilcoxon si nécessaire. Lorsque l'analyse inclura plus de deux groupes, une analyse de variance, après transformation des variables si nécessaire (en cas d'écart à la normalité) sera réalisée (ou un test de Kruskal-Wallis). Des ajustements dans des analyses de covariance ou des modèles de régression linéaire

ou polynomiales seront également envisagés. Le calcul du coefficient de corrélation r de Pearson sera utilisé pour analyser la relation entre variables quantitatives.

Les données qualitatives seront exprimées en fréquence et pourcentage avec intervalle de confiance à 95%. Elles seront comparées avec des tests du chi-deux (appariés et non appariés), ou des tests exacts de Fisher si nécessaire. Des ajustements dans des modèles de régression logistique seront également envisagés.

Les tests utilisés seront bilatéraux, et une valeur de $p < 0,05$ sera considérée comme significative (après correction potentielle, par exemple en utilisant la notion de False Discovery Rate de Benjamini and Hochberg pour les tests multiples).

La sensibilité, spécificité, valeurs prédictive positive et négative (et des intervalles de confiance à 95%) des marqueurs immunologiques d'intérêt pronostique au cours de l'HTAP idiopathique ou associée à la sclérodermie systémique seront déterminées.

Enfin, des analyses de sensibilité des résultats aux données manquantes seront réalisées.

L'analyse statistique sera réalisée au sein du laboratoire d'Informatique médicale et Biostatistique de l'hôpital Cochin, sous la responsabilité du Pr. Joël Coste. Le logiciel utilisé sera le logiciel SAS, version 9.1.

IX – EVALUATION DE LA SECURITE

IX - 1 - DESCRIPTION DES PARAMETRES D'EVALUATION DE LA SECURITE

Evènement indésirable

Toute manifestation nocive survenant chez une personne qui se prête à une recherche biomédicale que cette manifestation soit liée ou non à la recherche.

Effet indésirable d'une recherche ne portant pas sur un produit mentionné à l'article L. 5311-1 (médicaments, biomatériaux et dispositifs médicaux, dispositifs médicaux de diagnostic in vitro, produits sanguins labiles, organes, tissus, cellules et produits d'origine humaine ou animale, produits cellulaires à finalité thérapeutique).

Tout événement indésirable dû à la recherche.

Evènement ou effet indésirable grave

Tout évènement ou effet indésirable qui entraîne la mort, met en danger la vie de la personne qui se prête à la recherche, nécessite une hospitalisation ou la prolongation de l'hospitalisation, provoque une incapacité ou un handicap importants ou durables, ou bien se traduit par une anomalie ou une malformation congénitale.

Fait nouveau

Toute nouvelle donnée de sécurité, pouvant conduire à une réévaluation du rapport des bénéfices et des risques de la recherche, ou qui pourrait être suffisant pour envisager des modifications dans la conduite de la recherche.

IX - 2 - PROCEDURE DE GESTION DES EVENEMENTS INDESIRABLES GRAVES

S'agissant d'une recherche biomédicale classée « risque A » c'est-à-dire dont le risque prévisible **ajouté par la recherche** est négligeable, aucun effet indésirable grave n'est attendu au cours de la recherche, car :

1. Pour tous les patients, il s'agit d'un changement de finalité de prélèvements du soin vers la recherche : produits du corps humain (2 fois 2 tubes supplémentaires de sang lors d'une prise de sang pratiquée dans le cadre du soin usuel) : strictement aucun risque ajouté
2. Pour les patients atteints de sclérodémie systémique une biopsie de peau : les risques liés à la biopsie sont rares (saignements, infection, malaise vagal)
3. Pour les témoins, un prélèvement de 14 ml lors d'un don de sang : strictement aucun risque ajouté

Par ailleurs, il ne peut y avoir aucun évènement indésirable grave attendu ou inattendu (SUSAR) lié à la recherche.

Dans ces conditions :

- Il n'y a pas lieu, pour l'investigateur, de déclarer au promoteur d'évènement indésirable grave survenant au cours de la recherche. Si de tels évènements surviennent, ils sont en lien avec la pathologie ou sa prise en charge thérapeutique dans le cadre du soin, et ne sont pas en lien avec la recherche,
- Il n'y a pas lieu d'annexer dans le protocole, un formulaire de déclaration d'évènements indésirables graves ni de grille de classification des évènements indésirables,
- Il n'y a pas lieu de créer un comité de surveillance indépendant

IX - 3 - COMITE DE PILOTAGE

Il sera constitué des initiateurs cliniciens du projet, du biostatisticien en charge du projet, des représentants du promoteur et de l'URC nommés pour cette recherche.

Il définira l'organisation générale et le déroulement de la recherche et coordonnera les informations. Il déterminera initialement la méthodologie et décidera en cours de recherche des conduites à tenir dans les cas imprévus, surveillera le déroulement de la recherche en particulier sur le plan de la tolérance et des événements indésirables.

X – DROIT D'ACCES AUX DONNEES ET DOCUMENTS SOURCE

Les personnes ayant un accès direct conformément aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur, notamment les articles L.1121-3 et R.5121-13 du code de la santé publique (par exemple, les investigateurs, les personnes chargées du contrôle de qualité, les moniteurs, les assistants de recherche clinique, les auditeurs et toutes personnes appelées à collaborer aux essais) prennent toutes les précautions nécessaires en vue d'assurer la confidentialité des informations relatives aux médicaments expérimentaux, aux essais, aux personnes qui s'y prêtent et notamment en ce qui concerne leur identité ainsi qu'aux résultats obtenus. Les données collectées par ces personnes au cours des contrôles de qualité ou des audits sont alors rendues anonymes.

XI – CONSIDERATIONS LEGALES ET ETHIQUES

Le promoteur est défini par la loi 2004-806 du 9 août 2004. Dans cette recherche, l'AP-HP est le promoteur et le Département de la Recherche Clinique et du Développement (DRCD) en assure les missions réglementaires.

Avant de démarrer la recherche, chaque investigateur fournira au représentant du promoteur de la recherche une copie de son curriculum vitae personnel daté et signé et comportant son numéro d'inscription à l'ordre des médecins.

XI - 1 - DEMANDE D'AUTORISATION AUPRES DE L'AFSSAPS

Pour pouvoir démarrer la recherche, l'AP-HP en tant que promoteur doit soumettre un dossier de demande d'autorisation auprès de l'autorité compétente l'Afssaps. L'autorité compétente, définie

à l'article L. 1123-12, se prononce au regard de la sécurité des personnes qui se prêtent à une recherche biomédicale, en considérant notamment la sécurité et la qualité des produits utilisés au cours de la recherche conformément, le cas échéant, aux référentiels en vigueur, leur condition d'utilisation et la sécurité des personnes au regard des actes pratiqués et des méthodes utilisées ainsi que les modalités prévues pour le suivi des personnes.

XI - 2 - DEMANDE D'AVIS AU COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES

En accord avec l'article L.1123-6 du Code de Santé Publique, le protocole de recherche doit être soumis par le promoteur à un Comité de Protection des Personnes L'avis de ce comité est notifié à l'autorité compétente par le promoteur avant le démarrage de la recherche.

XI - 3 - MODIFICATIONS

Le DRCDD doit être informé de tout projet de modification du protocole par l'investigateur coordonnateur.

Les modifications devront être qualifiées en substantielles ou non. Une modification substantielle est une modification susceptible, d'une manière ou d'une autre, de modifier les garanties apportées aux personnes qui se prêtent à la recherche biomédicale (modification d'un critère d'inclusion, prolongation d'une durée d'inclusion, participation de nouveaux centres,...).

Après le commencement de la recherche, toute modification substantielle de celle-ci à l'initiative du promoteur doit obtenir, préalablement à sa mise en oeuvre, un avis favorable du comité et une autorisation de l'autorité compétente. Dans ce cas, si cela est nécessaire, le comité s'assure qu'un nouveau consentement des personnes participant à la recherche est bien recueilli.

Par ailleurs, toute extension de la recherche (modification profonde du schéma thérapeutique ou des populations incluses, prolongation des traitements et ou des actes thérapeutiques non prévus initialement dans le protocole) devra être considérée comme une nouvelle recherche.

Toute modification substantielle devra faire l'objet par le promoteur après paiement d'une taxe d'une demande d'autorisation auprès de l'Afssaps et/ou d'une demande d'avis du CPP.

XI - 4 - DECLARATION CNIL

La loi prévoit que la déclaration du fichier informatisé des données personnelles collectées pour la recherche doit être faite avant le début effectif de la recherche.

Une méthodologie de référence spécifique au traitement de données personnelles opérée dans le cadre des recherches biomédicales définies par la loi 2004-806 du 9 août 2004 car entrant dans le champ des articles L.1121-1 et suivants du Code de Santé Publique a été établie par la CNIL en janvier 2006. Cette méthodologie permet une procédure de déclaration simplifiée lorsque la nature des données recueillies dans la recherche est compatible avec la liste prévue par la CNIL dans son document de référence. Lorsque le protocole bénéficie d'un contrôle qualité des données par un ARC représentant le promoteur et qu'il entre dans le champ d'application de la procédure simplifiée CNIL, le DRC en qualité de promoteur demandera au responsable du fichier informatique de s'engager par écrit sur le respect de la méthodologie de référence MR06001 simplifiée.

XI - 5 - RAPPORT FINAL DE LA RECHERCHE

Le rapport final de la recherche sera écrit en collaboration par le coordonnateur et le biostatisticien pour cette recherche. Ce rapport sera soumis à chacun des investigateurs pour avis. Une fois qu'un consensus aura été obtenu, la version finale devra être avalisée par la signature de chacun des investigateurs et adressée au promoteur dans les meilleurs délais après la fin effective de la recherche. Un rapport rédigé selon le plan de référence de l'autorité compétente doit être transmis à l'autorité compétente ainsi qu'au CPP dans un délai de un an, après la fin de la recherche, s'entendant comme la dernière visite de suivi du dernier sujet inclus. Ce délai est rapporté à 90 jours en cas d'arrêt prématuré de la recherche.

XII – TRAITEMENT DES DONNEES ET CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES RELATIVES A LA RECHERCHE

Les documents d'une recherche entrant dans le cadre de la loi sur les recherches biomédicales doivent être archivés par toutes les parties pendant une durée de 15 ans après la fin de la recherche (voir BPC, chapitre 8 : documents essentiels).

Cet archivage indexé comporte :

- Les copies de courrier d'autorisation de l'Afssaps et de l'avis obligatoire du CPP
- Les versions successives du protocole (identifiées par le n° de version et la date de version),

- Les courriers de correspondance avec le promoteur,
- Les consentements signés des sujets sous pli cacheté (dans le cas de sujets mineurs signés par les titulaires de l'autorité parentale) avec la liste ou registre d'inclusion en correspondance,
- Le cahier d'observation complété et validé de chaque sujet inclus,
- Toutes les annexes spécifiques à l'étude,
- Le rapport final de l'étude provenant de l'analyse statistique et du contrôle qualité de l'étude (double transmis au promoteur).
- Les certificats d'audit éventuels réalisés au cours de la recherche

La base de données ayant donné lieu à l'analyse statistique doit aussi faire l'objet d'archivage par le responsable de l'analyse (support papier ou informatique).

XIII – ASSURANCE ET ENGAGEMENT SCIENTIFIQUE

XIII - 1 - ASSURANCE

L'Assistance Publique- Hôpitaux de Paris est le promoteur de cette recherche. En accord avec la loi sur les recherches biomédicales, elle a pris une assurance auprès de la compagnie GERLING KonZern pour toute la durée de la recherche, garantissant sa propre responsabilité civile ainsi que celle de tout intervenant (médecin ou personnel impliqué dans la réalisation de la recherche) (loi n°2004-806, Art L.1121-10 du CSP).

L'Assistance Publique - Hôpitaux de Paris se réserve le droit d'interrompre la recherche à tout moment pour des raisons médicales ou administratives; dans cette éventualité, une notification sera fournie à l'investigateur.

XIII - 2 - ENGAGEMENT SCIENTIFIQUE

Chaque investigateur s'engagera à respecter les obligations de la loi et à mener la recherche selon les B.P.C., en respectant les termes de la déclaration d'Helsinki en vigueur. Pour ce faire, un exemplaire de l'engagement scientifique (document type DRCD) daté et signé par chaque investigateur de chaque service clinique d'un centre participant sera remis au représentant du promoteur.

XIV – REGLES RELATIVES A LA PUBLICATION

L'AP-HP est propriétaire des données et aucune utilisation ou transmission à un tiers ne peut être effectuée sans son accord préalable.

Seront premiers signataires des publications, les personnes ayant réellement participé à l'élaboration du protocole et son déroulement ainsi qu'à la rédaction des résultats. Par précaution, un comité d'écriture devrait être constitué et l'ordre des signataires pourra être défini par avance. L'Assistance Publique- Hôpitaux de Paris doit être mentionnée comme étant le promoteur de la recherche biomédicale et comme soutien financier le cas échéant. les termes « Assistance Publique- Hôpitaux de Paris » doivent apparaître dans l'adresse des auteurs.

XV – LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Investigateurs et Equipes Associées

Annexe 2 : Références bibliographiques

ANNEXE I – INVESTIGATEURS ET EQUIPES ASSOCIÉES

INVESTIGATEURS ASSOCIES	SERVICE ET HÔPITAL
Pr Luc MOUTHON, PU-PH	Service de Médecine Interne Hôpital Cochin – 27 rue du Faubourg Saint Jacques - 75014 PARIS
Pr Marc HUMBERT , PU-PH Pr Gérald SIMONNEAU, PU-PH	Service de Pneumologie, Hôpital Antoine Bécère – 157 rue de la porte de Trivaux, 92141 CLAMART.
Dr David LAUNAY, PHU Pr. Eric HACHULLA, PU-PH	Service de Médecine Interne, Hôpital Claude-Huriez – rue Michel Po- lonovski - 59037 LILLE.
Dr Didier LEFRANC, IR Pr Lionel PRIN, PU-PH	Laboratoire d’Immunologie, Hôpital Claude-Huriez – rue Michel Po- lonovski - 59037 LILLE.
Dr Frédéric BATTEUX, MCU- PH Dr Bernard WEILL, MCU-PH	Laboratoire d’Immunologie, Hôpital Cochin – 27 rue du Faubourg Saint Jacques - 75014 PARIS
Dr Luc CAMOIN, IR	Laboratoire de protéomique Université Paris Descartes, Institut Co- chin, CNRS UMR8104, INSERM U567, Paris, France.
Dr Geneviève WOIMANT, PH	Etablissement Français du Sang, Hôpital Saint Vincent de Paul – 89 ave- nue Denfert Rochereau - 75014 PARIS

ANNEXE II – REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Rubin LJ, Primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1997; 336: 111-7.
2. Nunes H, Humbert M, Sitbon O, Morse JH, Deng Z, Knowles JA, et al., Prognostic factors for survival in human immunodeficiency virus-associated pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 1433-9.
3. Mukerjee D, St George D, Coleiro B, Knight C, Denton CP, Davar J, et al., Prevalence and outcome in systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension: application of a registry approach. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 1088-93.
4. Hachulla E, Gressin V, Guillevin L, Carpentier P, Diot E, Sibilia J, et al., Early detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: A French nationwide prospective multicenter study. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3792-3800.
5. Fagan KA , Badesch DB, Pulmonary hypertension associated with connective tissue disease. *Prog Cardiovasc Dis* 2002; 45: 225-34.
6. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, et al., Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 13S-24S.
7. Voelkel N, Tudor R , Weir E, *Pathophysiology of primary pulmonary hypertension.*, S. Rich, Editor. 1997, Marcel Dekker: New York. p. 83-129.
8. Jeffery TK , Morrell NW, Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* 2002; 45: 173-202.
9. Yuan XJ, Wang J, Juhaszova M, Gaine SP , Rubin LJ, Attenuated K⁺ channel gene transcription in primary pulmonary hypertension. *Lancet* 1998; 351: 726-7.
10. Cool CD, Stewart JS, Werahera P, Miller GJ, Williams RL, Voelkel NF, et al., Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers. Evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth. *Am J Pathol* 1999; 155: 411-9.
11. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, et al., An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992; 327: 70-5.
12. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, et al., Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993; 328: 1732-9.
13. Deng Z, Morse JH, Slager SL, Cuervo N, Moore KJ, Venetos G, et al., Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by

- mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 737-44.
14. Lane KB, Machado RD, Pauciulo MW, Thomson JR, Phillips JA, 3rd, Loyd JE, et al., Heterozygous germline mutations in *BMPR2*, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. The International PPH Consortium. *Nat Genet* 2000; 26: 81-84.
 15. Thomson JR, Machado RD, Pauciulo MW, Morgan NV, Humbert M, Elliott GC, et al., Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding *BMPR-II*, a receptor member of the TGF-beta family. *J Med Genet* 2000; 37: 741-45.
 16. Trembath RC, Thomson JR, Machado RD, Morgan NV, Atkinson C, Winship I, et al., Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 2001; 345: 325-34.
 17. Chaouat A, Coulet F, Favre C, Simonneau G, Weitzenblum E, Soubrier F, et al., Endoglin germline mutation in a patient with hereditary haemorrhagic telangiectasia and dexfenfluramine associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax* 2004; 59: 446-48.
 18. Earnshaw W, Bordwell B, Marino C, Rothfield N, Three human chromosomal autoantigens are recognized by sera from patients with anti-centromere antibodies. *J Clin Invest* 1986; 77: 426-30.
 19. Weiner ES, Hildebrandt S, Sénécal JL, Daniels L, Noell S, Joyal F, et al., Prognostic significance of anti-centromère autoantibodies and antitopoisomerase I autoantibodies in Raynaud's phenomenon. *Arthr Rheum* 1991; 34: 68-77.
 20. Harvey GR, Butts S, Rands AL, Patel Y, McHugh NJ, Clinical and serological associations with anti-RNA polymerase antibodies in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1999; 117: 395-402.
 21. Tamby MC, Chanseaud Y, Guillevin L, Mouthon L, New insights into the pathogenesis of systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2003; 2: 152-7.
 22. Arnett FC, Tan F, Uziel Y, MLaxer R, Krafchik B, Anthni Sea, Autoantibodies to the extracellular matrix microfibrillar protein, fibrillin-1, in patients with localized scleroderma. *Arthr Rheum* 1999; 42: 2656-2659.
 23. Ihn H, Sato S, Fujimoto M, Igarashi A, Yazawa N, Kubo M, et al., Characterization of autoantibodies to endothelial cells in systemic sclerosis (SSc): association with pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol* 2000; 119: 203-9.
 24. Garcia de la Pena-Lefebvre P, Chanseaud Y, Tamby MC, Reinbolt J, Batteux F, Allanore Y, et al., IgG reactivity with a 100-kDa tissue and endothelial cell antigen identified as topoisomerase 1 distinguishes between limited and diffuse systemic sclerosis patients. *Clin Immunol* 2004; 111: 241-51.
 25. Bordron A, Dueymes M, Levy Y, Jamin C, Leroy JP, Piette JC, et al., The binding of some human antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* 1998; 101: 2029-35.

26. Servettaz A, Tamby MC, Guilpain P, Reinbolt J, Garcia de la Pena-Lefebvre P, Allanore Y, et al., Anti-endothelial cell antibodies from patients with limited cutaneous systemic sclerosis bind to centromeric protein B (CENP-B). *Clin Immunol* 2006; 120: 212-9.
27. Tamby MC, Chanseaud Y, Humbert M, Fermanian J, Guilpain P, Garcia-de-la-Pena-Lefebvre P, et al., Anti-endothelial cell antibodies in idiopathic and systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax* 2005; 60: 765-72.
28. Chizzolini C, Raschi E, Rezzonico R, Testoni C, Mallone R, Gabrielli A, et al., Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1602-13.
29. Henault J, Tremblay M, Clement I, Raymond Y, Senecal JL, Direct binding of anti-DNA topoisomerase I autoantibodies to the cell surface of fibroblasts in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3265-74.
30. Henault J, Robitaille G, Senecal JL, Raymond Y, DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 963-73.
31. Tamby MC, Humbert M, Guilpain P, Servettaz A, Dupin N, Christner JJ, et al., Antibodies to fibroblasts in idiopathic and scleroderma-associated pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2006; 28: 799-807.
32. Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M, et al., Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med* 2006; 354: 2667-76.
33. Casciola-Rosen L, Wigley F, Rosen A, Scleroderma autoantigens are uniquely fragmented by metal-catalyzed oxidation reactions: implications for pathogenesis. *J Exp Med* 1997; 185: 71-9.
34. Dorfmueller P, Perros F, Balabanian K, Humbert M, Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2003; 22: 358-63.
35. Hoeper MM, Pulmonary hypertension in collagen vascular disease. *Eur Respir J* 2002; 19: 571-6.
36. Nicolls MR, Taraseviciene-Stewart L, Rai PR, Badesch DB, Voelkel NF, Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective. *Eur Respir J* 2005; 26: 1110-8.
37. Simonneau G, Galie N, Rubin LJ, Langleben D, Seeger W, Domenighetti G, et al., Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 5S-12S.
38. Launay D, Hachulla E, Hatron PY, Jais X, Simonneau G, Humbert M, Pulmonary arterial hypertension: a rare complication of primary Sjogren syndrome: report of 9 new cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2007; 86: 299-315.
39. Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins IM, et al., Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 25S-32S.

40. Dorfmueller P, Humbert M, Perros F, Sanchez O, Simonneau G, Muller KM, et al., Fibrous remodeling of the pulmonary venous system in pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue diseases. *Hum Pathol* 2007; 38: 893-902.
41. Cool CD, Kennedy D, Voelkel NF, Tuder RM, Pathogenesis and evolution of plexiform lesions in pulmonary hypertension associated with scleroderma and human immunodeficiency virus infection. *Hum Pathol* 1997; 28: 434-42.
42. Carvalho D, Savage CO, Black CM, Pearson JD, IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. *J Clin Invest* 1996; 97: 111-9.
43. Okawa-Takatsuji M, Aotsuka S, Fujinami M, Uwatoko S, Kinoshita M, Sumiya M, Up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and class II MHC molecules on pulmonary artery endothelial cells by antibodies against U1-ribonucleoprotein. *Clin Exp Immunol* 1999; 116: 174-80.
44. Sanchez O, Humbert M, Sitbon O, Simonneau G, Treatment of pulmonary hypertension secondary to connective tissue diseases. *Thorax* 1999; 54: 273-7.
45. Morse J, Barst R, Horn E, Cuervo N, Deng Z, Knowles J, Pulmonary hypertension in scleroderma spectrum of disease: lack of bone morphogenetic protein receptor 2 mutations. *J Rheumatol* 2002; 29: 2379-81.
46. Satoh T, Kimura K, Okano Y, Hirakata M, Kawakami Y, Kuwana M, Lack of circulating autoantibodies to bone morphogenetic protein receptor-II or activin receptor-like kinase 1 in mixed connective tissue disease patients with pulmonary arterial hypertension. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44: 192-6.
47. Korniszewski L, Kurzyna M, Stolarski B, Torbicki A, Smerdel A, Ploski R, Fatal primary pulmonary hypertension in a 30-yr-old female with APECED syndrome. *Eur Respir J* 2003; 22: 709-11.
48. Isern RA, Yaneva M, Weiner E, Parke A, Rothfield N, Dantzker D, et al., Autoantibodies in patients with primary pulmonary hypertension: association with anti-Ku. *Am J Med* 1992; 93: 307-12.
49. Morse JH, Antohi S, Kasturi K, Saito S, Fotino M, Humbert M, et al., Fine specificity of anti-fibrillin-1 autoantibodies in primary pulmonary hypertension syndrome. *Scand J Immunol* 2000; 51: 607-11.
50. Chu JW, Kao PN, Faul JL, Doyle RL, High prevalence of autoimmune thyroid disease in pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2002; 122: 1668-73.
51. Badesch DB, Wynne KM, Bonvallet S, Voelkel NF, Ridgway C, Groves BM, Hypothyroidism and primary pulmonary hypertension: an autoimmune pathogenetic link? *Ann Intern Med* 1993; 119: 44-46.

52. Brentnall TJ, Kenneally D, Barnett AJ, de Aizpurua HJ, Lolait SJ, Ashcroft R, et al., Autoantibodies to fibroblasts in scleroderma. *J Clin Lab Immunol* 1982; 8: 9-12.
53. Alderuccio F, Barnett AJ, Campbell JH, Pedersen JS , Toh BH, Scl-95/100: doublet of endothelial marker autoantigens in progressive systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1986; 64: 94-100.
54. Ronda N, Gatti R, Giacosa R, Raschi E, Testoni C, Meroni PL, et al., Antifibroblast antibodies from systemic sclerosis patients are internalized by fibroblasts via a caveolin-linked pathway. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1595-601.
55. Tamby M, Chanseaud Y, Humbert M, Guilpain P, Servettaz A, Simonneau G, et al., IgG from patients with pulmonary arterial hypertension (PAH) associated with systemic sclerosis (SSc) and from patients with primary PAH express distinct reactivity profiles with normal human fibroblasts antigens. 5th European League Against Rheumatism (EULAR) annual congress. 2004; 10-12 June 2004, Berlin, Germany. Abstract FRI0335. *Ann Rheum Dis* ; 63 (sup 1): 346.
56. Servettaz A, Guilpain P, Camoin L, Mayeux P, Broussard C, Tamby M, et al., Identification of target antigens of anti-endothelial cell antibodies in healthy individuals: a proteomic approach. *Proteomics* 2008; Sous presse.
57. Terrier B, Tamby M, Camoin L, Bussone G, Ayici A, Simmoneau G, et al., Proteomic identification of target antigens of anti-fibroblast antibodies in patients with pulmonary arterial hypertension. *Am J Resp Crit Care Med* 2008; sous presse.
58. Terrier B, Tamby M, Camoin L, Broussard C, Barriot S, Humbert M, et al., L'alpha-enolase : une cible des anticorps anti-fibroblastes au cours de la sclérodémie systémique (abstract 56eme congrès de la SNFMI). *Rev Med Interne* 2007.
59. Rose NR , Bona C, Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today* 1993; 14: 426-30.
60. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Gagliano N, Lusini L, Milzani A, et al., Actin carbonylation: from a simple marker of protein oxidation to relevant signs of severe functional impairment. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1075-83.
61. Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I, Giannerini F, Giustarini D, Lusini L, et al., Different metabolizing ability of thiol reactants in human and rat blood: biochemical and pharmacological implications. *J Biol Chem* 2001; 276: 7004-10.
62. Mattson MP, Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. *Trends Neurosci* 1998; 21: 53-7.
63. Babior BM, Kipnes RS , Curnutte JT, Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 1973; 52: 741-4.

64. Grisham MB, Reactive oxygen species in immune responses. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 1479-80.
65. Laurent A, Nicco C, Chereau C, Goulvestre C, Alexandre J, Alves A, et al., Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Res* 2005; 65: 948-56.
66. Nicco C, Laurent A, Chereau C, Weill B , Batteux F, Differential modulation of normal and tumor cell proliferation by reactive oxygen species. *Biomed Pharmacother* 2005; 59: 169-74.
67. Robinson MJ , Cobb MH, Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 180-6.
68. Davis RJ, Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000; 103: 239-52.
69. Rao GN, Lassegue B, Griendling KK, Alexander RW , Berk BC, Hydrogen peroxide-induced c-fos expression is mediated by arachidonic acid release: role of protein kinase C. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 1259-63.
70. Ushio-Fukai M , Alexander RW, Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell Biochem* 2004; 264: 85-97.
71. Matucci Cerinic M , Kahaleh MB, Beauty and the beast. The nitric oxide paradox in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41: 843-7.
72. McCord JM, Roy RS , Schaffer SW, Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase. *Adv Myocardiol* 1985; 5: 183-9.
73. Herrick AL , Matucci Cerinic M, The emerging problem of oxidative stress and the role of antioxidants in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19: 4-8.
74. Fubini B , Hubbard A, Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 1507-16.
75. Gossart S, Cambon C, Orfila C, Seguelas MH, Lepert JC, Rami J, et al., Reactive oxygen intermediates as regulators of TNF-alpha production in rat lung inflammation induced by silica. *J Immunol* 1996; 156: 1540-8.
76. Srivastava KD, Rom WN, Jagirdar J, Yie TA, Gordon T , Tchou-Wong KM, Crucial role of interleukin-1beta and nitric oxide synthase in silica-induced inflammation and apoptosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 527-33.
77. Yamamoto T, Kuroda M , Nishioka K, Animal model of sclerotic skin. III: Histopathological comparison of bleomycin-induced scleroderma in various mice strains. *Arch Dermatol Res* 2000; 292: 535-41.
78. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Mizushima Y , Nishioka K, Effect of superoxide dismutase on bleomycin-induced dermal sclerosis: implications for the treatment of systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 843-7.
79. Cardenas A, Abian J, Bulbena O, Rosello J , Gelpi E, Determination of oxidation products of N-phenyllinoleamide: Spanish toxic oil syndrome studies. *J Chromatogr* 1988; 426: 83-91.

80. Herrick AL, Rieley F, Schofield D, Hollis S, Braganza JM , Jayson MI, Micronutrient antioxidant status in patients with primary Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1994; 21: 1477-83.
81. Tikly M, Marshall SE, Haldar NA, Gulumian M, Wordsworth P , Welsh KI, Oxygen free radical scavenger enzyme polymorphisms in systemic sclerosis. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 1403-7.
82. Allanore Y, Borderie D, Lemarechal H, Ekindjian OG , Kahan A, Acute and sustained effects of dihydropyridine-type calcium channel antagonists on oxidative stress in systemic sclerosis. *Am J Med* 2004; 116: 595-600.
83. Simonini G, Cerinic MM, Generini S, Zoppi M, Anichini M, Cesaretti C, et al., Oxidative stress in Systemic Sclerosis. *Mol Cell Biochem* 1999; 196: 85-91.
84. Solans R, Motta C, Sola R, La Ville AE, Lima J, Simeon P, et al., Abnormalities of erythrocyte membrane fluidity, lipid composition, and lipid peroxidation in systemic sclerosis: evidence of free radical-mediated injury. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 894-900.
85. Rosen A, Casciola-Rosen L , Wigley F, Role of metal-catalyzed oxidation reactions in the early pathogenesis of scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 1997; 9: 538-43.
86. Sambo P, Jannino L, Candela M, Salvi A, Donini M, Dusi S, et al., Monocytes of patients with systemic sclerosis (scleroderma) spontaneously release in vitro increased amounts of superoxide anion. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 78-84.
87. Sambo P, Baroni SS, Luchetti M, Paroncini P, Dusi S, Orlandini G, et al., Oxidative stress in scleroderma: maintenance of scleroderma fibroblast phenotype by the constitutive up-regulation of reactive oxygen species generation through the NADPH oxidase complex pathway. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2653-64.
88. Svegliati S, Canello R, Sambo P, Luchetti M, Paroncini P, Orlandini G, et al., Platelet-derived Growth Factor and Reactive Oxygen Species (ROS) Regulate Ras Protein Levels in Primary Human Fibroblasts via ERK1/2: AMPLIFICATION OF ROS AND Ras IN SYSTEMIC SCLEROSIS FIBROBLASTS. *J Biol Chem* 2005; 280: 36474-82.
89. Cotton SA, Herrick AL, Jayson MI , Freemont AJ, Endothelial expression of nitric oxide synthases and nitrotyrosine in systemic sclerosis skin. *J Pathol* 1999; 189: 273-8.
90. Demedts M, Behr J, Buhl R, Costabel U, Dekhuijzen R, Jansen HM, et al., High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2005; 353: 2229-42.
91. Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF, et al., Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 2001; 6: 1119-1123.

92. Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, et al., Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2002; 346: 896-903.
93. Korn JH, Mayes M, Matucci Cerinic M, Rainisio M, Pope J, Hachulla E, et al., Digital ulcers in systemic sclerosis: prevention by treatment with bosentan, an oral endothelin receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3985-93.
94. Geraci MW, Moore M, Gesell T, Yeager ME, Alger L, Golpon H, et al., Gene expression patterns in the lungs of patients with primary pulmonary hypertension: a gene microarray analysis. *Circ Res* 2001; 88: 555-62.
95. Schenk H, Klein M, Erdbrugger W, Droge W, Schulze-Osthoff K, Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 1672-6.
96. Arner ES, Holmgren A, Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6102-9.
97. Hall LM, Murphy RC, Activation of human polymorphonuclear leukocytes by products derived from the peroxidation of human red blood cell membranes. *Chem Res Toxicol* 1998; 11: 1024-31.
98. Bowers R, Cool C, Murphy RC, Tudor RM, Hopken MW, Flores SC, et al., Oxidative stress in severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 764-9.
99. Farahmand F, Hill MF, Singal PK, Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. *Mol Cell Biochem* 2004; 260: 21-9.
100. Uzun O, Balbay O, Comunoglu NU, Yavuz O, Nihat Annakkaya A, Guler S, et al., Hypobaric-hypoxia-induced pulmonary damage in rats ameliorated by antioxidant erdosteine. *Acta Histochem* 2006; 108: 59-68.
101. Grobe AC, Wells SM, Benavidez E, Oishi P, Azakie A, Fineman JR, et al., Increased oxidative stress in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension: role of NADPH oxidase and endothelial NO synthase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290: L1069-77.
102. Servettaz A, Guilpain P, Goulvestre C, Chereau C, Hercend C, Nicco C, et al., Radical oxygen species production induced by advanced oxidation protein products predicts clinical evolution and response to treatment in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2007.
103. Guilpain P, Servettaz A, Tamby M, Chanseaud Y, Tamas N, Garcia de la Pena-Lefebvre P, et al., A combined SDS-PAGE and proteomics approach to identify target autoantigens in healthy individuals and patients with autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; in press.
104. Herve P, Lebrec D, Brenot F, Simonneau G, Humbert M, Sitbon O, et al., Pulmonary vascular disorders in portal hypertension. *Eur Respir J* 1998; 11: 1153-66.
105. Masi AT, Rodnan GP, Medsger TA, Altman R, D'Angelo W, Fries J, et al., Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthr Rheum* 1980; 23: 581-90.

106. LeRoy EC , Medsger TA, Jr., Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2001; 28: 1573-76.
107. Sharp G, *Diagnostic criteria for classification of MCTD*, in *Mixed connective tissue disease and anti-nuclear antibodies*, R. Kasukawa, Editor. 1987, Elsevier Science: Amsterdam. p. 23-32.
108. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al., The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271-7.
109. Hochberg MC, Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1725.
110. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al., Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 554-8.
111. Dartevelle P, Fadel E, Mussot S, Chapelier A, Herve P, de Perrot M, et al., Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2004; 23: 637-48.