

DAP12-Wegener :
Récepteurs activateurs et protéine DAP12
au cours de la vascularite de Wegener

P 081238

Promoteur

Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP) représentée par le DRCD
Département de la Recherche Clinique et du Développement
Carré Historique de l'Hôpital Saint Louis, porte 23
1, avenue Claude Vellefaux
75 010 Paris
Chef de Projet : Myriem Carrier / Assistante : Julie Tequi
Fax : 01 44 84 17 99

Investigateur coordonnateur

Dr Mathilde De Menthon
Pôle de Médecine Interne
Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris
27, rue du Faubourg Saint-Jacques, Paris, France
Tel: 01 58 41 / Fax: 33 1 58 41
Email : mathilde.de-menthon@cch.aphp.fr

Responsable scientifique

Dr Sophie Caillat-Zucman
INSERM U986
Hôpital Saint-Vincent de Paul
82 Avenue Denfert-Rochereau. 75014 Paris
Tel : 01 40 48 81 11 / Fax : 01 40 48 83 52
Email : sophie.caillat@inserm.fr

Monitoring

URC Paris-Centre
Hôpital Tarnier
89, rue d'Assas - 75 006 Paris
Responsable : Professeur Jean-Marc Treluyer
Chef de Projet : Séverine Poignant
Tél. : 01.58.41.12.11 / Fax : 01 58 41 11 83
Email : severine.poignant@cch.aphp.fr

Centre investigateur

Dr Alexandre Karras
Service de Néphrologie
Hôpital Européen Georges Pompidou
20, rue Leblanc
75 015 Paris

Centre collecteur de sang correspondant aux sujets sains

Docteur Geneviève WOIMANT
Responsable de site EFS Ile de France
Site Saint Vincent de Paul
82 av Denfert Rochereau
75014 PARIS
Tél: 01.53.91.29.60 /Fax: 01.53.91.29.57
Email: genevieve.woimant@efs.sante.fr

Analyse de la fonction de DAP12

Dr Sophie Caillat-Zucman
INSERM U986 (Ex U561)
Hôpital Saint-Vincent de Paul
82 Avenue Denfert-Rochereau. 75014 Paris

Analyse pan-transcriptionnelle sur sang total

Eric Vivier
Directeur du Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy (CIML)
CNRS-INSERM-Université de la Méditerranée
Campus de Luminy, Case 906
13 288 Marseille Cedex 09

Etude de la spécificité des T CD4 pour la PR3

Docteur Roberto Mallone
Equipe AVENIR dans l'unité INSERM U986
Hôpital Saint-Vincent de Paul
82 Avenue Denfert-Rochereau. 75014 Paris

Transporteur de l'HEGP à St Vincent de Paul

Société 360° Services
15, rue du vieux pont
92 000 Nanterre
Tel : / Fax
Email:

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

Code de la Recherche biomédicale **P 081238**

Titre : « DAP12-WEGENER : Récepteurs activateurs et protéine DAP12 au cours de la vascularite de Wegener »

Version n°1.0 du 17/02/2010

L'investigateur coordonnateur :
Dr Mathilde De Menthon

Pôle de Médecine Interne
Hôpital Cochin
Assistance Publique-Hôpitaux de Paris
27, rue du Faubourg Saint-Jacques, Paris, France

L'investigateur coordonnateur autorise la diffusion de son identité et de ses coordonnées dans le répertoire des recherches biomédicales.

Date :/...../.....

Signature :

Le promoteur :
Christophe MISSE

Assistance publique – hôpitaux de Paris
Délégation Interrégionale à la Recherche Clinique Hôpital Saint Louis
75 010 PARIS

Date :/...../.....

Signature :

Plan

	<i>page</i>
1- Résumé du protocole	3
2- Introduction et justification de la recherche, résultats attendus et perspectives	
2.1 : Introduction générale	4
2.2 : Hypothèses de travail	5
2.3 : Résultats attendus	5
2.4 : Perspectives	5
3- Données de la littérature et pré-requis	
3.1 : La physiopathologie	6
3.2 : Données acquises par le laboratoire	8
4- Objectifs de la recherche	
4.1 : Objectifs primaires	11
4.2 : Objectifs secondaires	11
4.3 : Originalité de l'étude	11
5- Plan expérimental	
5.1 : Populations étudiées: critères de selection	12
5.2 : Mode de recrutement	13
5.3 : Nature des prélèvements	13
5.4 : Analyses réalisées	14
5.5 : Faisabilité et limites de l'étude	15
6- Critères d'analyse	
6.1 : Variables mesurées	16
6.2 : Calendrier des réalisations dans les différents groupes	16
6.3 Gestion des données et statistique	17
7- Gestion des événements indésirables graves et monitoring des effets secondaires	17
8- Aspects légaux et éthiques	17
9- Justification de la demande financière	18
10- Références	19

Résumé du protocole

La maladie de Wegener (MW) est une vascularite nécrosante sévère, caractérisée par une inflammation de la paroi des vaisseaux de petit et moyen calibre, et une granulomatose péri et extravasculaire touchant essentiellement la sphère ORL, les poumons et les reins. Il s'agit d'une pathologie rare (prévalence 5/100,000 habitants), touchant également les 2 sexes à un âge moyen de 45 ans. La MW se présente sous deux formes cliniques: une forme localisée avec atteinte granulomateuse des voies aériennes, et une forme généralisée avec vascularite diffuse. Des anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) dirigés contre la protéinase 3 (PR3), une enzyme des granules des neutrophiles et des monocytes, sont retrouvés chez plus de 90% des patients présentant une forme généralisée. Sans traitement, la survie moyenne est d'environ 5 mois. Sous traitement immunosuppresseur non spécifique, le taux de rémission se situe autour de 80%, mais les rechutes surviennent dans plus de la moitié des cas. La physiopathologie de la MW n'est toujours pas claire, mais 2 éléments suscitent un intérêt particulier ; 1/ le granulome: il s'agit d'une structure immunologique complexe composée de macrophages différenciés qui fusionnent pour constituer des cellules géantes multinucléées, associées à des lymphocytes T et B et des neutrophiles, en présence de cytokines et de chémokines pro-inflammatoires. Aucun des facteurs classiquement associé au développement d'un granulome (corps étranger, agent pathogène mycobactérien ou parasitaire) n'a été mis en évidence dans la MW. 2/ les ANCA: ils reconnaissent la protéinase 3 exprimée à la surface des neutrophiles activés, et peuvent conduire à la dégranulation des neutrophiles et à la libération de radicaux libres oxygénés et de cytokines proinflammatoires.

Le lien entre granulome, PR3 et lésions vasculaires n'est pas clair à l'heure actuelle.

Nous avons récemment mis en évidence au cours de la MW diffuse avec vascularite une expansion importante de lymphocytes T circulants CD4+CD28- exprimant de façon aberrante les récepteurs activateurs NKG2D, 2B4, CD161 et CD158bj. Ces cellules ont un phénotype effecteur mémoire et un répertoire TCR V β oligo/monoclonal témoignant de possibles stimulations antigéniques répétées. De plus, elles ont un fort potentiel cytotoxique (perforine+) et expriment DAP12, une protéine adaptatrice à motif ITAM associée à certains récepteurs activateurs, et normalement absente dans les lymphocytes T CD4. Elles expriment également CX3CR1, le récepteur pour la fractalkine, impliqué dans l'adhésion et le recrutement des cellules mononucléées de la circulation vers les sites inflammatoires. Les tests fonctionnels de dégranulation et de production d'IFN γ montrent que ces cellules CD4 sont capables de lyser des cellules endothéliales vasculaires de manière indépendante du CMH, et ont donc un rôle potentiel dans les lésions de vascularite. L'expansion de ces cellules CD4 est sous le contrôle de l'IL-15, dont les taux sériques sont anormalement élevés chez les patients WG, et qui agit d'une part grâce à l'expression accrue de l'IL-15R β à la surface des CD4 des patients, et d'autre part grâce à l'expression accrue de l'IL-15R α à la surface de leurs monocytes.

Le projet que nous souhaitons développer constitue une étape préliminaire, mais essentielle, à la mise en place de marqueurs de la réponse immune au cours de la MW. Notre hypothèse physiopathologique est que la protéine adaptatrice DAP12 pourrait constituer le lien unificateur entre les différents composants cellulaires (neutrophiles, macrophages et T CD4) impliqués dans la maladie. Cette hypothèse repose sur les éléments connus suivants : dans les neutrophiles et les monocytes, DAP12 associé au récepteur TREM-1 permet la dégranulation et la libération du contenu des granules; dans les macrophages, DAP12 associé au récepteur TREM-2 est impliqué dans le processus de fusion en cellules géantes granulomateuses ; dans les lymphocytes enfin, DAP12 associé à certains récepteurs activateurs active les fonctions cytotoxiques. Une signalisation excessive via DAP12 dans les neutrophiles, les

monocytes/macrophages et les T CD4 pourrait fournir une explication physiopathologique à la vascularite granulomateuse. Cette hypothèse « gain de fonction DAP-12 » sera testée par une analyse quantitative (ARNm et protéine) et qualitative (modification de la signalisation et de l'activation cellulaire) de DAP12 dans ces différents types cellulaires chez les patients WG avec ou sans vascularite, par rapport à différents groupes contrôles. Parallèlement à cette hypothèse ciblée sur DAP12, nous réaliserons une analyse du profil d'expression génique du sang total selon une technologie récemment décrite qui permet d'identifier des « modules transcriptionnels » exprimés de manière coordonnée chez un ensemble de patients ayant une maladie donnée. L'étude sera essentiellement transversale et portera sur 120 patients analysables répartis de la manière suivante : patients avec MW localisée (n = 30) ou généralisée (n = 30), patients présentant une vascularite non granulomateuse (micropolyangéite, n = 30), patients présentant une granulomatose sans vascularite (sarcoïdose, n = 30), et 30 contrôles provenant de donateurs volontaires sains. Le nombre de sujets inclus permettra de s'affranchir des fluctuations d'échantillonnage. Les perspectives de ce travail concernent la recherche clinique et fondamentale sur la MW. Sur le plan clinique, les résultats pourraient permettre le développement de biomarqueurs de prédiction de l'évolution clinique de la MW (forme granulomateuse localisée ou vascularite diffuse). Sur un plan plus fondamental, les informations pourraient permettre de proposer une explication physiopathologique unificatrice à la MW permettant de relier granulome, ANCA et vascularite, et servir de base à des stratégies d'immunothérapie ciblant les voies de signalisation intracellulaires mises en évidence dans l'étude.

1 Introduction et justification de la recherche, résultats attendus et perspectives (bibliographie en annexe)

1.1 Introduction générale

La maladie de Wegener (MW) est une maladie rare touchant environ 1 personne sur 20 000, survenant à un âge moyen de 45 ans, aussi bien chez l'homme que chez la femme, mais préférentiellement chez les sujets d'origine caucasienne. La MW se caractérise par l'existence d'une inflammation granulomateuse des voies respiratoires, et une vascularite nécrosante des petites artères et des capillaires conduisant à des hémorragies intra-alvéolaires et à une insuffisance rénale liée à une glomérulonéphrite extra-capillaire pauci-immune. L'étiologie de la MW n'est pas déterminée, mais est vraisemblablement multifactorielle, associant des facteurs génétiques (origine caucasienne) et environnementaux (infectieux- rôle potentiel d'infections récidivantes à *Staphylococcus aureus*-, ou toxiques- rôle potentiel des pesticides). La MW se caractérise sur le plan physiopathologique par : a) le granulome, structure immunologique complexe composée de macrophages différenciés qui fusionnent pour constituer des cellules géantes multinucléées, associés à des lymphocytes T et B et des neutrophiles ; b) les cANCA, anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles dirigés contre la protéinase 3 (PR3), une enzyme présente dans les granules des neutrophiles et des monocytes ; c) la vascularite, liée aux lésions des cellules endothéliales des petits vaisseaux.

Le lien entre granulome, ANCA anti-PR3 et vascularite n'est pas clair. De plus, la distinction physiopathologique entre la forme localisée (atteinte granulomateuse des voies aériennes supérieures) et la forme diffuse (vascularite systémique avec atteinte rénale en particulier) n'est pas expliquée. Enfin, en l'absence d'hypothèse physiopathologique claire, le traitement de la MW est non spécifique, et repose essentiellement sur les immunosuppresseurs.

1.2 Hypothèse de travail

Nous avons mis en évidence au cours de la MW diffuse avec vascularite une expansion importante de lymphocytes T circulants CD4+CD28- exprimant de façon aberrante des récepteurs activateurs normalement présents sur les cellules cytotoxiques uniquement. De fait, ces cellules CD4 ont un fort potentiel cytotoxique vis-à-vis de cellules endothéliales vasculaires, et expriment DAP12, une protéine adaptatrice à motif ITAM normalement absente des lymphocytes T CD4 (de Menthon et al. Manuscrit en préparation).

Très récemment, le groupe d'Eric Vivier a mis en évidence le rôle essentiel de la signalisation par la protéine DAP12 dans la capacité des macrophages à fusionner en cellules géantes (1), suggérant la participation de DAP12 dans la constitution d'un granulome.

Ces données et nos résultats nous ont fait conduit à émettre l'hypothèse que la protéine DAP12 pourrait constituer un lien unificateur entre les différents composants cellulaires impliqués dans la maladie de WG : neutrophiles (source de PR3), macrophages (source des cellules géantes qui constituent le granulome) et T CD4 (cellules cytotoxiques vis-à-vis de l'endothélium vasculaire). Cette hypothèse repose sur le faisceau d'éléments suivants : dans les neutrophiles et les monocytes, DAP12 associé au récepteur TREM-1 permet la dégranulation et la libération du contenu des granules (2); dans les macrophages, DAP12 associé au récepteur TREM-2 est impliqué dans le processus de fusion en cellules géantes granulomateuses (1); dans les lymphocytes enfin, DAP12 associé à certains récepteurs activateurs active les fonctions cytotoxiques. Une signalisation excessive via DAP12 dans les neutrophiles, les monocytes/macrophages et les T CD4 pourrait fournir une explication physiopathologique à la vascularite granulomateuse. Cette hypothèse « gain de fonction DAP-12 » sera testée par une analyse quantitative (ARNm et protéine) et qualitative (modification de la signalisation et de la fonction induites par DAP12) dans les différents types cellulaires (neutrophiles, monocytes et T CD4) chez les patients WG avec ou sans vascularite, par rapport à différents groupes contrôles.

1.3 Résultats attendus

Notre étude se situe à la frontière entre une étude physiopathologique et l'identification de biomarqueurs dans une maladie rare. L'objectif de l'étude est d'identifier des marqueurs immuns associés à la survenue d'une vascularite dans le contexte d'une maladie granulomateuse. L'expression de DAP12 (ARNm et protéine) dans les différentes populations cellulaires sera corrélée au niveau d'activation des voies de signalisation en aval de DAP12 (phosphorylation de Syk) et à l'activation des fonctions effectrices médiées par la voie DAP12 (dégranulation, fusion en cellules géantes, cytotoxicité et production de cytokines). L'identification d'une anomalie « gain de fonction » de DAP12 pourrait fournir une explication moléculaire à la vascularite systémique.

L'approche pan-transcriptomique sur sang total que nous proposons de mener en parallèle permettra d'identifier un ou des « modules transcriptionnels » spécifiques à la MW, qui pourront ensuite servir de base pour la sélection de biomarqueurs et pour le développement d'indicateurs transcriptionnels multiples de la progression de la MW.

1.4 Perspectives

Sur le plan clinique, les résultats pourraient permettre le développement de marqueurs d'évolution clinique de la MW (maintien d'une forme granulomateuse localisée ou évolution vers une forme plus généralisée avec vascularite diffuse). Sur un plan plus fondamental, les informations pourraient permettre de proposer une explication physiopathologique unificatrice reliant granulome, ANCA et vascularite au cours de la MW, et servir de base à des stratégies d'immunothérapie ciblant les voies de signalisation intracellulaires mises en

évidence dans l'étude (inhibiteurs de Syk par exemple en cas d'activation excessive de la voie DAP12), ou les gènes mis en évidence par l'analyse des modules transcriptionnels spécifiquement modifiés.

2 Données de la littérature et pré-requis

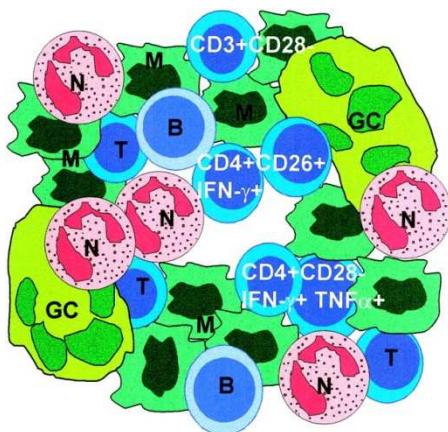
2.1 La physiopathologie

Trois éléments distincts caractérisent la MW : le granulome, les anticorps dirigés contre la protéinase 3 (ANCA-PR3), et la vascularite des petits vaisseaux. A l'heure actuelle, il n'existe pas de lien physiopathologique clair entre ces 3 éléments.

Le granulome

Le granulome est une structure immunologique complexe, composée de macrophages différenciés interdigités ou cellules géantes épithélioïdes, auxquels se joignent d'autres cellules immunes, lymphocytes T, B et NK. Classiquement, le granulome se forme suite à la présence d'un stimulus persistant qui conduit à l'attraction des macrophages et lymphocytes en présence de chémokines et cytokines pro-inflammatoires. Aucun des facteurs classiquement associé au développement d'un granulome (corps étranger, agent pathogène mycobactérien ou parasitaire) n'a été mis en évidence dans la MW. La PR3 n'est pas détectable à l'état physiologique dans l'espace extra cellulaire, mais est retrouvée à taux élevé au sein des tissus cibles chez les patients, et pourrait donc constituer un antigène à l'origine de la formation des granulomes. La PR3 est capable d'induire *in vitro* la maturation des DC suite à sa fixation sur le récepteur PAR-2 exprimé à la surface des DC immatures (3). Les DC matures pourraient alors permettre l'activation de lymphocytes T CD4 spécifiques de la PR3 et leur différenciation vers un profil Th1. Au sein du granulome de MW, les T CD4+ sont essentiellement CD28-, mais expriment des marqueurs d'activation (CD57, HLA-DR), et sécrètent les cytokines pro-inflammatoires TNF α et de l'IFN γ (4). Ces cytokines ont un effet chimiotactique pour les macrophages et induisent leur maturation, ce qui peut donc conduire à la formation du granulome. La spécificité des T CD4 pour la PR3 au cours de la MW reste cependant à démontrer formellement.

Très récemment, le groupe d'Eric Vivier a mis en évidence le rôle essentiel de la signalisation par la protéine DAP12 (via l'engagement du récepteur membranaire TREM-1) dans la capacité des macrophages à fusionner en cellules géantes, suggérant la participation de DAP12 dans la constitution du granulome (1).



Représentation schématique d'un granulome géantocellulaire dans la MW.

La PR3 et les ANCA

L'origine et le rôle des ANCA dans la MW ne sont toujours pas clairs. Les ANCA sont en général des IgG de haute affinité, suggérant que des CD4 anti-PR3 générés selon l'hypothèse décrite ci-dessus pourraient fournir un « help » aux lymphocytes B pour la production d'anticorps anti-PR3.

La PR3 est une enzyme physiologiquement présente au niveau des granules des polynucléaires neutrophiles (PNN), des monocytes et des basophiles. La PR3 est une serine protéase dont la fonction est de dégrader les protéines extracellulaires au niveau des sites inflammatoires. Elle est normalement peu exprimée à la surface cellulaire, en dehors d'un contexte inflammatoire où elle est présente à la surface des PNN préactivés par le TNF α . Il n'existe pas de modèle murin de pathologie induite par les ANCA, et le rôle pathogène direct des ANCA anti-PR3 n'est pas clairement établi. L'efficacité des échanges plasmatiques et des anticorps monoclonaux anti-CD20 dans le traitement des formes graves de MW est cependant un argument indirect pour incriminer, au moins en partie, leur rôle pathogène. La fixation des ANCA sur la PR3 présente à la surface des PNN activés pourrait conduire à leur dégranulation, et à la libération de radicaux libres oxygénés et de cytokines pro-inflammatoires. De plus, la fixation des ANCA sur le récepteur Fc γ R exprimé à la surface des cellules cytotoxiques pourrait provoquer la destruction des cellules cibles PR3+ fixant le fragment F(ab')₂ des ANCA (mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps, ADCC) (5).

La PR3 peut aussi se fixer sur les cellules endothéliales par l'intermédiaire du récepteur PAR-2 (protease-activated receptor). Les ANCA reconnaissant la PR3 pourraient alors directement provoquer des lésions endothéliales par ce même mécanisme d'ADCC.

La vascularite

Il existe un certain nombre d'arguments *in vitro* pour incriminer la participation des ANCA dans l'initiation du processus de vascularite. L'activation des neutrophiles par les ANCA conduit à la libération de radicaux oxygénés, de cytokines, d'enzymes protéolytiques, et à la nécrose secondaire des PNN, tous éléments qui peuvent contribuer directement à la lésion de l'endothélium vasculaire (6). Par la suite, l'endothélium peut lui-même contribuer à la lésion en augmentant ses capacités prothrombotiques en réponse aux cytokines, et en servant de cible pour la fixation de la PR3 via l'expression de PAR-2. Le schéma cinétique serait donc le suivant :

- lors d'un épisode infectieux par exemple, la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α conduit à l'activation des PMN, qui expriment alors la PR3 à leur surface. Parallèlement, les cellules endothéliales s'activent.
- Les ANCA se fixent aux PMN via leur fragment (Fab)₂ et/ou Fc, conduisant à la libération de radicaux oxygénés et de médiateurs inflammatoires. Les PMN activés adhèrent aux cellules endothéliales activées via l'expression accrue de molécules d'adhésion, ce qui favorise des lésions endothéliales. Dans ce contexte inflammatoire, l'endothélium émet un ensemble de signaux (facteurs angiogéniques, chémokines, ..) qui participent aux lésions de vascularite, en régulant le recrutement et l'activation des cellules mononuclées au sein des lésions (monocytes, cellules T).

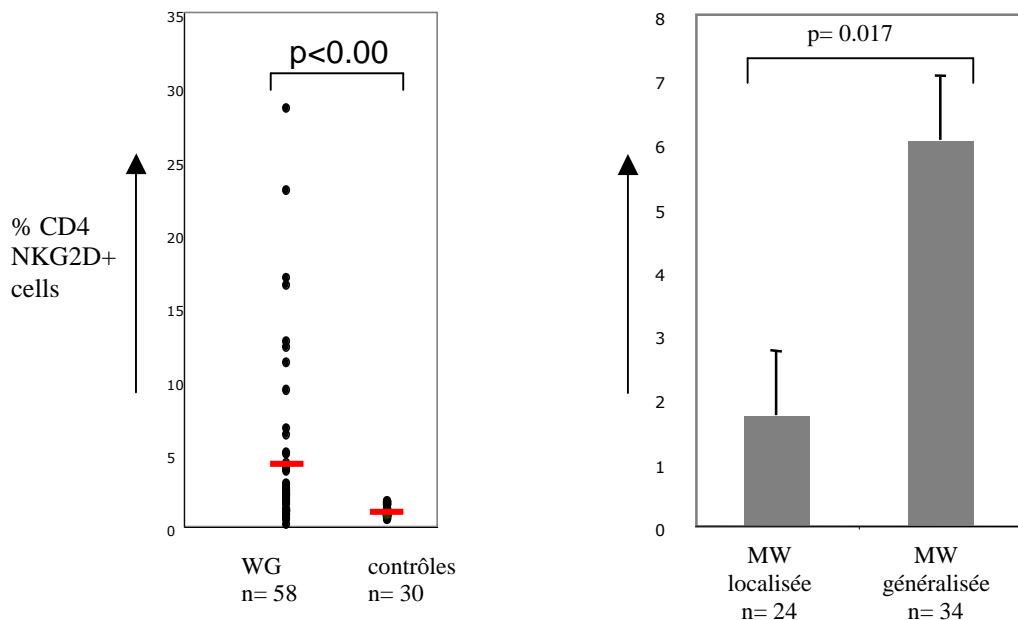
Ce schéma n'explique pas le lien entre granulome et vascularite.

2.2 Résultats acquis par le laboratoire.

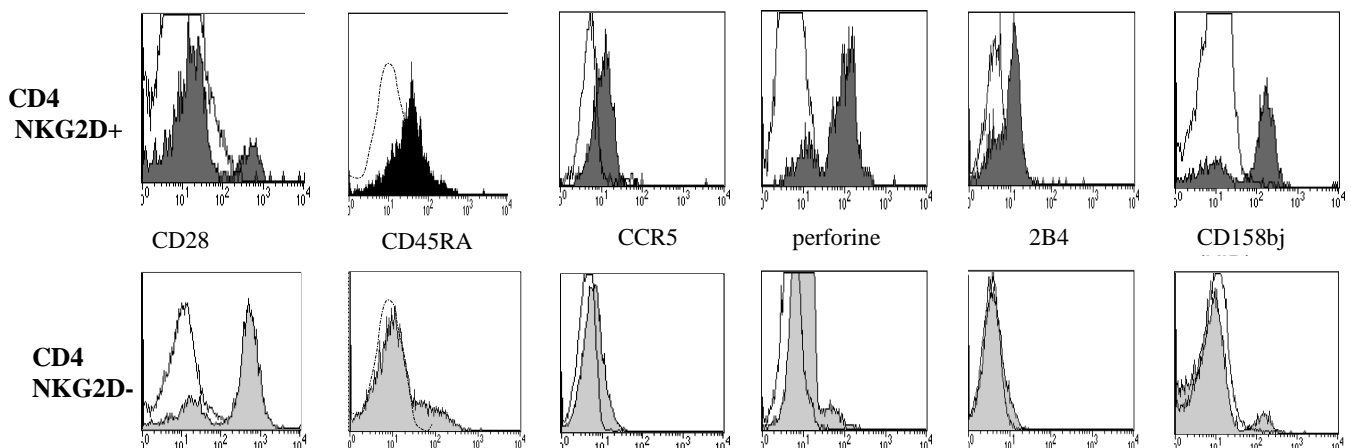
Des cellules T CD4 NKG2D+ ont été mises en évidence chez les patients présentant une polyarthrite rhumatoïde avec atteinte vasculaire (7), et chez les patients ayant un angor instable (8). Ces observations, associées au fait que des cellules T CD4 CD28- sont retrouvées en nombre important au cours de la MW, nous ont fait suggérer qu'elles pourraient être impliquées dans la vascularite de la MW.

De fait, nous avons récemment mis en évidence au cours de la MW une expansion importante de lymphocytes T circulants CD4+CD28- exprimant de façon aberrante les récepteurs activateurs NKG2D, 2B4, CD161 et CD158bj, en principe absents des T CD4 (*de Menthon et al. Manuscrit en préparation*). La présence de ces cellules n'est pas corrélée avec l'âge, le traitement, l'activité de la maladie ou l'existence de rechutes, mais uniquement avec l'existence d'une forme diffuse de la MW avec vascularite.

Expansions de cellules T CD4 NKG2D+ circulantes au cours de la MW avec vascularite



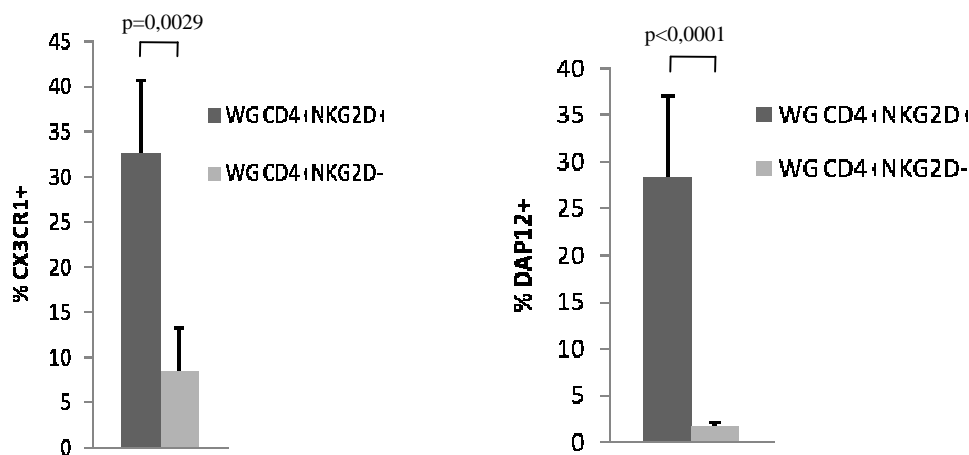
Les cellules T CD4 NKG2D+ de la MW expriment différents récepteurs NK et ont une capacité cytotoxique perforine intracellulaire)



Par ailleurs, les cellules CD4 NKG2D⁺ de la MW ont un phénotype effecteur mémoire et un répertoire TCR V β oligo/monoclonal témoignant de possibles stimulations antigéniques répétées. Jusqu'à présent, nous n'avons pas pu déterminer si ces cellules sont spécifiques de la PR3 ou non

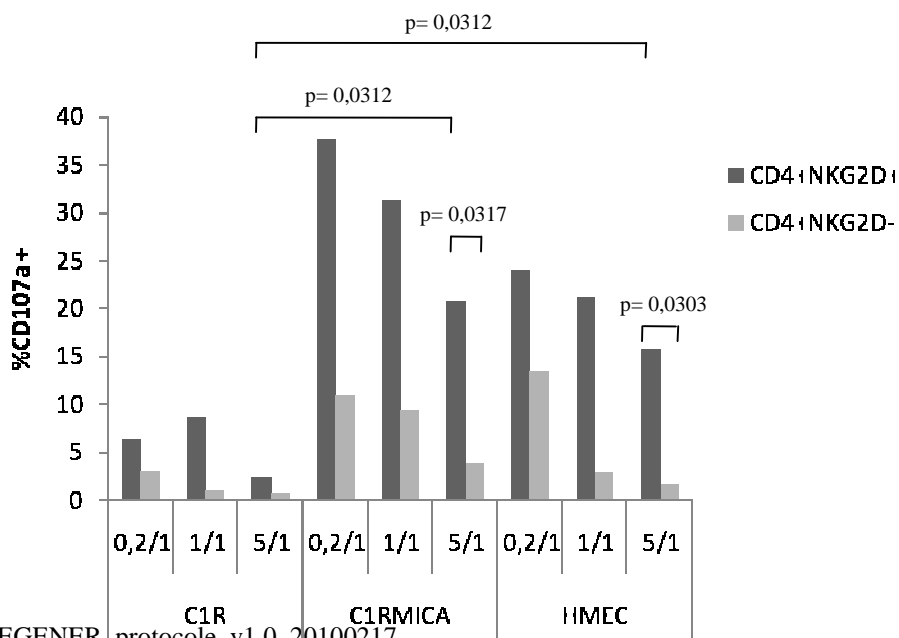
Enfin, les cellules CD4 NKG2D⁺ ont un fort potentiel cytotoxique (perforine intra-cellulaire) et expriment DAP12, une protéine adaptatrice à motif ITAM associée à certains récepteurs activateurs, mais normalement absente dans les lymphocytes T CD4. Elles expriment également CX3CR1, le récepteur pour la fractalkine, impliqué dans l'adhésion et le recrutement des cellules mononucléées de la circulation vers les sites inflammatoires.

Expression de CX3CR1 (membranaire) et de DAP12 (intra-cellulaire) dans les cellules CD4 NKG2D⁺ de MW



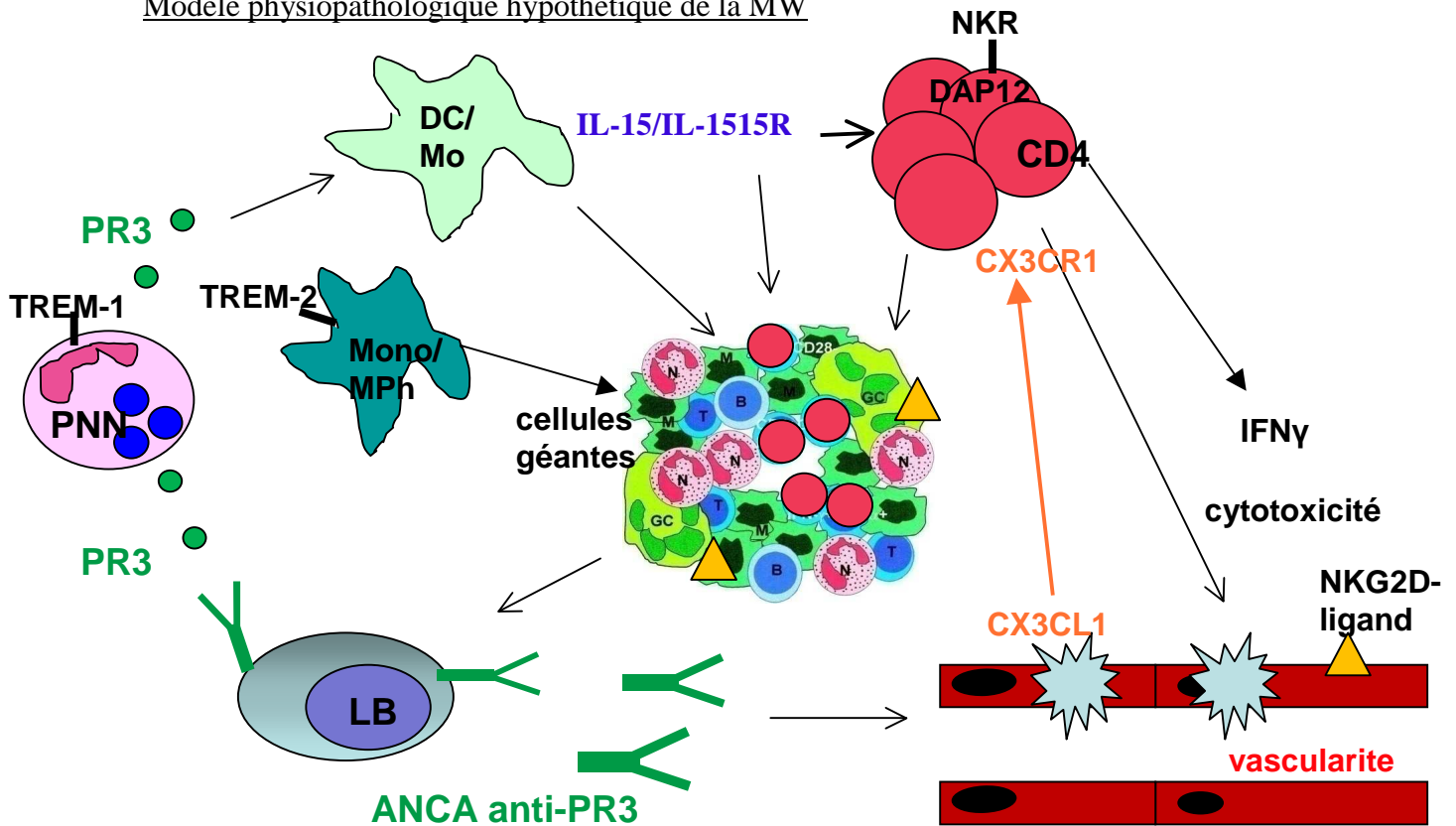
Les tests fonctionnels de dégranulation et de production d'IFN γ montrent que ces cellules CD4 NKG2D⁺ sont capables de lyser des cellules cibles exprimant les ligands de NKG2D (C1R-MICA) et des cellules endothéliales vasculaires (HMEC) de manière indépendante du CMH, et ont donc un rôle potentiel dans les lésions de vascularite.

Test de cytotoxicité (sCD107a) directe des cellules CD4 NKG2D⁺ sur des cibles exprimant les ligands de NKG2D (C1R-MICA) ou des cellules endothéliales vasculaires (HMEC)



3 Objectifs de la recherche

Modèle physiopathologique hypothétique de la MW



Notre hypothèse est que la protéine DAP12 pourrait constituer le lien unificateur entre les différents composants cellulaires impliqués dans la maladie : neutrophiles (source de PR3), macrophages (source des cellules géantes qui constituent le granulome) et T CD4 (cellules cytotoxiques vis-à-vis de l'endothélium vasculaire). DAP12 (DNAX activation protein of 12kDa), initialement identifiée par Eric Vivier sous le nom de KARAP, est une protéine adaptatrice portant un motif d'activation ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif), qui s'associe à différents récepteurs exprimés sur les neutrophiles (TREM-1), les monocytes (TREM-2), et les cellules NK (KIRs activateurs, NKp44). Dans les neutrophiles, la stimulation via TREM-1 résulte en la production de cytokines pro-inflammatoires, de chémokines, de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), et conduit à la dégranulation rapide des granules neutrophiliques, et à la phagocytose; dans les macrophages, la stimulation via TREM-2 permet le processus de fusion en cellules géantes granulomateuses ; dans les cellules NK enfin, la stimulation via les récepteurs activateurs induit la cytotoxicité et la production d'IFN γ . Notre hypothèse est donc qu'une signalisation excessive via DAP12 dans les neutrophiles, les monocytes/macrophages et les T CD4 exprimant des récepteurs NK pourrait fournir une explication physiopathologique à l'ensemble des caractéristiques de la MW : granulome, ANCA anti-PR3 et vascularite.

Le projet qui sera développé constitue l'étape préliminaire, mais essentielle, à la mise en place de marqueurs des réponses immunes spécifiques de la MW. Sur le plan clinique, les résultats pourraient permettre le développement de biomarqueurs de prédiction de l'évolution clinique de la MW (forme localisée ou généralisée). Sur un plan plus fondamental, les informations pourraient permettre de proposer une explication physiopathologique unificatrice à la MW et de servir de base à des stratégies d'immunothérapie ciblant les voies de signalisation intracellulaires mises en évidence dans l'étude.

3.1 Objectifs primaires

L'objectif principal de notre étude sera de vérifier notre hypothèse selon laquelle la MW est une maladie par « gain de fonction » de la molécule adaptatrice DAP12. Cette hypothèse sera vérifiée par une approche quantitative (ARNm et protéine) et qualitative (modification de la signalisation et de la fonction induites par DAP12) dans les différents types cellulaires (neutrophiles, monocytes et T CD4) chez les patients WG avec ou sans vascularite, par rapport à différents groupes contrôles. Dans le cas où des biopsies aient été faites au cours du suivi de la maladie (essentiellement biopsies rénales, cutanées ou broncho-pulmonaires), et soient disponibles dans le laboratoire d'anatomopathologie de l'hôpital, une étude immunohistochimique sera réalisée pour étudier le phénotype des cellules CD4 au sein des lésions. En outre, la spécificité des lymphocytes T CD4 pour la PR3 (point de controverse à l'heure actuelle) sera analysée par une approche ELISPOT. Ces tests nous permettront de déterminer si la signalisation excessive via DAP12 est à l'origine d'une activation pathologique des neutrophiles, des monocytes et des lymphocytes T CD4, et a un lien physiopathologique avec la constitution du granulome et des lésions endothéliales vasculaires de la MW.

3.2 Objectifs secondaires

Parallèlement à notre hypothèse principale ciblée sur la molécule DAP12 candidate, une approche pan-transcriptomique sur sang total sera réalisée. Selon une technique récemment décrite d'analyse du profil d'expression génique du sang total (9), il est possible d'identifier des « modules transcriptionnels » formés par des gènes exprimés de manière coordonnée chez un ensemble de patients ayant une maladie donnée. La caractérisation des modifications d'expression à l'échelon de ces modules (et non à l'échelon de gènes individuels) définit une « signature transcriptionnelle » spécifique de la maladie considérée, et fournit un canevas pour l'interprétation fonctionnelle des données. Par la suite, ces modules transcriptionnels vont permettre de définir des biomarqueurs de progression de la maladie. Cette approche a été utilisée avec succès pour prédire l'évolutivité de l'arthrite systémique juvénile (Chaussabel Immunity 2008).

3.3 Originalité de l'étude

La caractérisation précoce des critères d'évolutivité de la MW vers une forme avec vascularite diffuse, est un enjeu majeur, car elle pourrait permettre d'adapter le traitement qui, à l'heure actuelle, consiste en une immunosuppression large et non spécifique.

Le caractère innovant de notre étude repose sur l'interdisciplinarité des compétences des partenaires, qui associent :

- le recrutement unique de patients ayant différentes formes de vascularite (maladie de Wegener, microangiopolyangéite) dans le Centre de référence des vascularites à l'hôpital Cochin

- l'expertise clinique de l'investigateur coordonnateur (Dr Mathilde de Menthon) dans le Centre de référence des vascularites à l'hôpital Cochin, et du Dr Alexandre Karras dans le Service de Néphrologie de l'HEGP où les patients ayant une MW avec suspicion de glomérulonéphrite extra-capillaire ont une biopsie rénale.
- la synergie des groupes de recherche, associant l'expertise combinée de l'exploration de la voie d'activation DAP12 dans les lymphocytes (Dr Sophie Caillat-Zucman), l'expertise du développement de technique miniaturisée d'Elispot CD4 (DcSpot) (Dr Roberto Mallone), et l'expertise d'analyse pan-transcriptionnelle sur sang total (Pr Eric Vivier).

5 Plan expérimental

Il s'agit à ce stade d'une étude essentiellement transversale exploratoire, destinée à déterminer l'implication de la voie d'activation DAP12 au cours de la maladie de Wegener.

Cette étude est comparative, non randomisée, de type cas-témoins. Il s'agit d'une étude pilote, les données de la littérature ne permettent donc pas de calculer un effectif de sujets.

Cependant, le choix du nombre de sujets dans chaque groupe (n = 30) permet de s'affranchir du risque de fluctuations liées à l'échantillonnage. L'étude portera sur 120 patients analysables répartis de la manière suivante : patients avec MW localisée (n = 30) ou généralisée (n = 30), patients présentant une vascularite non granulomateuse (micropolyangéite, n = 30), patients présentant une granulomatose sans vascularite (sarcoïdose, n = 30), et 30 témoins sains analysables (tubes collectés à l'EFS).

5.1 Populations étudiées : Critères de sélection

Critères d'inclusion

5.1.1 Patients ayant une MW dans sa forme localisée dite « granulomateuse »

- Atteinte granulomateuse de l'appareil respiratoire touchant un ou plusieurs sites (ORL, arbre trachéo-bronchique, nodules pulmonaires excavés ou non)
- +/- biopsie confirmant l'atteinte granulomateuse
- +/- ANCA positifs (majoritairement c-ANCA de spécificité anti-PR3)

5.1.2 Patients ayant une MW dans sa forme généralisée dite « vascularitique »

- Atteinte granulomateuse de l'appareil respiratoire (+/- prouvée histologiquement)
- et atteinte témoignant d'une vascularite des vaisseaux de petits et moyen calibre, soit :
 - * atteinte rénale prouvée histologiquement (glomérulonéphrite nécrosante extra-capillaire pauci-immune)
 - * ou atteinte rénale sans preuve histologique mais hautement probable, définie par une insuffisance rénale rapidement progressive sans anomalie pré ou post rénale, plus une protéinurie >1g/l, plus une hématurie significative (avec ou sans cylindres), en dehors de toute infection urinaire

* ou multinévrite

* ou atteinte pulmonaire à type de capillarite, se manifestant par une hémorragie intra alvéolaire (hémoptysie, aspect en erre dépoli au scanner et sidérophages dans le lavage broncho-alvéolaire)

* ou atteinte viscérale spécifique : cardiaque, digestive, musculaire

- +/- ANCA positifs (majoritairement c-ANCA de spécificité anti-PR3)

5.1.3 Patients ayant une micropolyangéite (vascularite non granulomateuse)

- Vascularite nécrosante avec peu ou pas de dépôts immuns touchant les vaisseaux de petit calibre (artérioles, capillaires, veinules) prouvée histologiquement touchant la peau, les muscles, les articulations...
- Absence d'atteinte granulomateuse de l'appareil respiratoire
- +/- atteinte rénale à type de glomérulonéphrite nécrosante extra capillaire
- +/- ANCA positifs (majoritairement p-ANCA anti-MPO)

5.1.4 Patients ayant une sarcoïdose (granulomatose sans vascularite)

- tableau clinique compatible avec la sarcoïdose (syndrome de Löfgren typique, uvéites, ganglions médiastinaux, atteinte viscérale...)
- biopsie montrant des lésions granulomateuses avec cellules géantes, sans nécrose caséuse
- anergie tuberculinique (+/- test quantiféron négatif)
- +/- enzyme de conversion augmentée

La participation des patients à cette recherche est d'une seule journée et implique que les patients pourront participer en même temps à un autre protocole de recherche biomédicale.

Critères de non-inclusion

- Patients ayant moins de 18 ans
- Grossesse, allaitement
- Absence de signature du consentement éclairé
- Non affiliation à un régime de sécurité sociale (bénéficiaire ou ayant droit)

5.1.5 Sujets contrôles

Les sujets contrôles adultes sont des donateurs volontaires de sang de l'Etablissement Français du Sang à l'hôpital St-Vincent de Paul. Ils seront donateurs de sang aptes au don, selon les Bonnes Pratiques de Prélèvements.

5.2 Mode de recrutement

Les patients seront recrutés dans le Centre de référence des vascularites à l'hôpital Cochin et dans le Service de Néphrologie de l'HEGP participant à l'étude.

Lors de la visite d'inclusion (à l'occasion d'une visite pour suivi thérapeutique), le formulaire d'information sera remis au patient. Un délai de réflexion (patient hospitalisé : 1 journée ; patient en consultation : formulaire remis en salle d'attente) sera donné au patient. Une fois le consentement obtenu, une quantité supplémentaire de 55 ml de sang sera prélevée (voir détail ci-dessous) à l'occasion d'un prélèvement sanguin réalisé pour suivi thérapeutique. En règle générale, la participation d'un patient se limitera à une visite (une journée). Dans un petit nombre de cas (étude de reproductibilité) il sera proposé au patient de refaire un prélèvement à l'occasion d'une visite de contrôle du traitement.

5.3 Nature des prélèvements

Les prélèvements sanguins sont de 3 types:

- 45 ml sur héparinate de lithium pour isolement des cellules mononuclées et des polynucléaires neutrophiles du sang périphérique (destinés au phénotypage et à l'analyse fonctionnelle des différentes sous-populations) ; le plasma correspondant sera congelé à -80°C pour dosage de cytokines et facteurs solubles.
- 1 tube de 7 ml sur EDTA destiné à l'analyse des transcrits de la voie DAP12
- 1 tube de 3 ml sur tube «TEMPUS Blood RNA» pour analyse pan-transcriptomique sur sang total, envoi groupé ultérieur à Marseille.

Les prélèvements sont acheminés dans la journée au laboratoire INSERM U986 (ex U561) à St Vincent de Paul où les analyses seront coordonnées par le Dr Sophie Caillat-Zucman

5.4 Analyses réalisées

5.4.1 Expression de DAP12

Les cellules du sang périphérique seront isolées par séparation sur Ficoll, permettant d'obtenir d'une part les cellules mononuclées (PBMC), et d'autre part les polynucléaires dans le culot. Une analyse en cytométrie de flux multiparamétrique (FacsAria) sera réalisée après marquage à l'aide d'une combinaison d'anticorps monoclonaux spécifiques des molécules de surface CD3, CD4, CD8, CD56, CD14, CD16b, NKG2D, TREM-1, TREM-2, CD158 suivi d'un marquage intra-cellulaire DAP12 après perméabilisation, permettant d'étudier l'expression de DAP12 (en pourcentage et en intensité de fluorescence) dans les sous-populations CD4, CD8, NK, monocytes, et neutrophiles.

DAP12 étant fortement exprimé de manière constitutive dans les monocytes, neutrophiles et NK, il est possible que l'analyse en cytométrie de flux ne permette pas de visualiser une augmentation d'expression de DAP12 dans les cellules de patients par rapport aux témoins. Dans ce cas, nous réaliserons en parallèle une mesure par PCR quantitative de l'expression de l'ARNm de DAP12 dans les cellules du sang périphérique.

Cette analyse quantitative sera couplée à une analyse qualitative de la modification de la signalisation induite par DAP12 par marquage intracellulaire de la protéine Syk phosphorylée dans les sous-populations CD4, CD8, NK, monocytes, et neutrophiles.

Dans le cas où des biopsies rénales, cutanées ou broncho-pulmonaires aient été faites au cours du suivi de la maladie, et après accord avec le laboratoire d'anatomopathologie correspondant pour nous fournir des coupes sériées de ces biopsies, une étude immunohistochimique sera

réalisée pour étudier le phénotype des cellules CD4 et des macrophages au sein des lésions après marquage avec des anticorps monoclonaux spécifiques des molécules CD4, CD68, NKG2D, IL-15 et DAP12.

5.4.2 Etude de la spécificité des T CD4 pour la PR3

L'équipe de Roberto Mallone a développé une stratégie dans laquelle les cellules dendritiques (DC) dérivées de monocytes sont directement induites dans le mélange de PBMC (sans séparation préalable des monocytes) en 48h en présence d'un cocktail optimisé de différentes cytokines. Les DC obtenues par cette technique, appelées « accelerated co-cultured DCs » (acDCs) sont des stimulateurs puissants des réponses T CD4. Cette technique de génération de DC a été utilisée pour développer un test ELISPOT induit par les DC (DC-Spot), qui permet non seulement de détecter des cellules T spécifiques d'épitopes antigéniques, mais également de les expandre pour générer des lignées et clones T (Martinuzzi et al., manuscript in preparation).

La technique DC-Spot offre plusieurs avantages par rapport aux techniques conventionnelles d'analyse des T CD4 : 1) une meilleure sensibilité; 2) l'utilisation de PBMC totaux, frais ou congelés; il n'y a pas besoin de purification préalable des monocytes, ce qui rend cette technique plus facile et nécessite moins de sang prélevé; 3) un temps d'expansion beaucoup plus court que dans les techniques conventionnelles; 4) les mêmes PBMC peuvent ensuite être récupérés des puits DC-Spot pour générer des lignées et clones T CD4 permettant une caractérisation ultérieure plus fine de ces cellules.

5.4.3 Analyse pan-transcriptomique sur sang total

L'ARN est préparé à partir de 3 ml de sang total prélevé sur tube « Tempus Blood RNA ». Ces tubes contiennent un réactif qui permet la stabilisation de l'ARN, en inactivant les RNAses cellulaires et en précipitant sélectivement l'ARN. Une simple agitation après le prélèvement permet de conserver le tube pendant 5 jours à température ambiante, ou indéfiniment à -20°C. Ceci facilite grandement l'envoi groupé des tubes à Marseille dans le laboratoire où se feront les étapes suivantes : extraction de l'ARN, préparation d'ARNc antisens biotinylé, hybridation sur puces Affymetrix (HG-U133A et U133B GeneChips) analyse de l'expression génique à l'aide du logiciel GeneSpring (Agilent) .

Le profil pan-transcriptomique du sang total est ensuite analysé, non pas par la méthode classique selon laquelle la quantité de chaque transcrite est comparée selon un facteur d'augmentation ou de diminution entre les patients et les témoins, mais à l'aide d'un algorithme récemment décrit (9) grâce auquel des « modules transcriptionnels » spécifiques à la maladie sont identifiés. Dans notre étude, l'objectif est d'identifier une « signature » de la MW, composée de gènes non modifiés dans les autres groupes de patients étudiés.

5.5 Faisabilité et limites de l'étude

5.5.1 Faisabilité, rôle des co-investigateurs

Il s'agit d'une étude multidisciplinaire associant les Services cliniques de Médecine Interne de l'hôpital Cochin et de Néphrologie de l'hôpital Européen Georges Pompidou à l'AP-HP, l'Etablissement Français du Sang de l'hôpital St-Vincent de Paul, le Service d'Immunologie de Hôpital de la Conception à l'AP-HM, et les unités INSERM U986 (ex U561) et U631.

- Le recrutement clinique ne devrait pas poser de problème puisque le Service de Médecine Interne de l'hôpital Cochin est Centre de référence national pour les

vascularites nécrosantes. En outre, les patients atteints de vascularite avec atteinte rénale sont explorés dans le Service de Néphrologie de l'HEGP.

- L'analyse de la fonction de DAP12 sera réalisée dans l'unité INSERM U986 (ex U561) par l'équipe de Sophie Caillat-Zucman qui a déjà effectué toute la partie préliminaire de cette étude (de Menthon et al. manuscrit en préparation), et possède toutes les techniques nécessaires à sa poursuite
- Eric Vivier (PU-PH dans le Service d'Immunologie AP-HM, et directeur de l'unité INSERM U631 au CIML) a une connaissance approfondie de DAP12, puisque c'est lui-même qui a identifié et cloné cette molécule, et a récemment mis en évidence son rôle dans la fusion des macrophages en cellules géantes (1). Sa participation permet en outre de réaliser l'analyse pan-transcriptionnelle sur sang total avec laquelle il est familier, grâce à sa collaboration avec l'équipe de Jacques Banchereau (Baylor Institute, Dallas, US) qui a décrit cette approche (9).
- La participation du Docteur Roberto Mallonne (équipe AVENIR dans l'unité INSERM U986) permet de proposer l'analyse de la spécificité pour la PR3 des lymphocytes T CD4 par DC-Spot, technique qu'il a développée au cours des 3 dernières années.

5.5.2 Limites de l'étude

Les principales limites de l'étude nous semblent être :

- le problème de la détection dans le sang périphérique de populations lymphocytaires rares, dont l'action est localisée dans des organes profonds et peu accessibles (poumon, rein). La migration préférentielle dans ces organes des cellules effectrices peut perturber leur représentation dans le sang périphérique et gêner l'étude. Cependant, les résultats préliminaires obtenus nous semblent très encourageants.
- Les patients des différents groupes reçoivent différents traitements immunosuppresseurs, et ont une maladie d'activité variable, ce qui pose un problème d'hétérogénéité. Cependant, nos résultats préliminaires montrent que l'expansion des cellules CD4 NKG2D+ au cours de la MW est indépendante de l'activité de la maladie, du nombre de rechutes/rémissions, et du traitement en cours. Cette expansion est uniquement corrélée à l'existence d'une forme vascularitique de la MW, et est stable chez un patient donné. C'est pourquoi nous avons distingué 2 groupes de patients MW (avec ou sans vascularite).
- L'absence d'implication thérapeutique directe pour l'instant. Il est clair que cette étude se situe à la frontière entre l'analyse physiopathologique et l'identification de biomarqueurs. Cependant, les résultats accumulés jusqu'ici nous semblent suffisamment encourageants pour lancer une étude clinique sur une plus large échelle.
- L'approche « gène/protéine candidat » limitant l'étude à l'analyse de DAP12 « gain de fonction » dans la pathogenèse de la MW. Bien que nos résultats préliminaires nous encouragent à tester cette hypothèse dans une étude plus large, nous proposons simultanément une étude non ciblée du profil d'expression génique du sang total, permettant d'orienter les analyses vers des groupes de transcrits (identification de «modules transcriptionnels»)

6 Critères d'analyse, calendrier, gestion des données et statistique

6.1 Variables mesurées dans les différents groupes

- Expression de DAP12 : fréquence des cellules exprimant DAP12 parmi les lymphocytes T CD4; niveau d'expression intra-cellulaire de DAP12 (mesuré par la moyenne d'intensité de fluorescence MFI) dans les neutrophiles, monocytes et lymphocytes T CD4.
- Spécificité des lymphocytes T CD4 pour la PR3 : la fréquence (moyenne et écart type) du nombre de spots IFN γ est calculée pour chaque condition : contrôle négatif en milieu seul, contrôle positif par stimulation par la PMA, stimulation en présence de PR3, de MPO ou d'un antigène contrôle PPD. Le résultat est considéré comme positif quand le nombre moyen de spots d'une condition expérimentale dépasse la moyenne + 3 SD des valeurs obtenues dans les puits contrôles **et** le double de la moyenne des puits contrôles ; (contrôle de viabilité des cellules dans lesquelles on ne met que 3×10^4 cellules par puits).
- Analyse pan-transcriptomique : le profil pan-transcriptomique du sang total est analysé à l'aide d'un algorithme récemment décrit (9) grâce auquel des « modules transcriptionnels » spécifiques à la maladie sont identifiés. Dans notre étude, l'objectif est d'identifier une « signature » de la MW, composée de gènes non modifiés dans les autres groupes de patients étudiés.
- Autres données recueillies
 - Données cliniques concernant les patients recueillies dans les dossiers médicaux : âge, sexe, date de découverte de la maladie, traitements actuels ou antérieurs, nombre de rémissions/rechutes, nombre d'organes atteints.
 - La détection des anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles est systématiquement recherchée en cas de suspicion de MW et ne sera donc pas faite de manière supplémentaire dans le cadre de cette étude.

6.2 Calendriers des évaluations dans les différents groupes

Les différents groupes de patients seront recrutés en parallèle en 3 ans dans les centres participants. L'étude se déroulera selon le calendrier suivant :

Date	Action
2010	Préparation des cahiers d'observation Dépôt aux autorités compétentes (CPP et Afssaps-HPS) Début d'Inclusion des sujets et des analyses
2010-2012	Suite et fin des inclusions et des analyses
2012	Fin des analyses de recherche Saisie des données – Contrôle de qualité des données Analyse des données Exploitation pour valorisation publication

6.3 Gestion des données

Le recueil des données se fera à partir du registre des vascularites (Cleanweb). Il comportera les données relatives aux antécédents, à la pathologie, aux traitements et les données biologiques.

Toutes les données requises par le protocole seront saisies dans Cleanweb le jour du prélèvement.

L'ensemble de l'analyse sera conduit par Sophie Caillat-Zucman et Roberto Mallone. L'analyse statistique de l'analyse pan-transcriptomique sera réalisée par le biostatisticien de l'équipe d'Eric Vivier au CIML

6.4 Responsable de l'analyse des données (déclaration CNIL si nécessaire) et logiciels de travail.

Les données nominatives seront saisies et analysées dans une base de données de type Access. L'accès à la base sera protégé aux médecins et biologistes participant à l'étude et sera verrouillé par mot de passe. La base de données sera déclarée à la CNIL.

7 Evaluation de la sécurité

7.1 Description des paramètres d'évaluation de la sécurité

Sans objet

7.2 Méthodes et calendrier

7.2.1 Comité scientifique

Le comité scientifique de l'étude DAP12-Wegener sera constitué au moins des investigateurs initiateurs du projet : Dr Mathilde de Menthon, Dr Caillat-Zucman et du Pr. Guillevin, du Dr Karras et des représentants du Promoteur et de l'URC nommés pour cette recherche.

Le Comité scientifique se réunira avant le démarrage de l'étude puis au minimum tous les 6 mois. La réunion du Comité scientifique sera l'occasion de réaliser un état des lieux de l'avancement de l'essai.

Il a pour mission de prendre toute décision importante à la demande de l'investigateur coordonnateur concernant la bonne marche de l'essai, le respect du protocole. Il vérifie le respect de l'éthique. Il s'informe auprès de l'URC Paris-Centre de l'état d'avancement de l'essai, des problèmes et des résultats. Il décide de toute modification pertinente du protocole nécessaire à la poursuite de l'essai, notamment :

- les mesures permettant de faciliter le recrutement dans l'essai,
- les amendements au protocole avant leur présentation au Comité de Protection des Personnes (CPP),
- les décisions d'ouvrir ou de fermer des sites participant à l'essai,
- les mesures qui assurent aux personnes participant à l'essai la meilleure sécurité,
- la discussion des résultats et la stratégie de publication de ces résultats.

Le Comité Scientifique peut proposer (après avis du Comité Indépendant de Surveillance) de prolonger ou d'interrompre l'essai en cas de rythme d'inclusions trop lent, d'un trop grand nombre de perdus de vue, de violations majeures du protocole ou bien pour des raisons médicales et/ou administratives.

S'il est proposé de réaliser de nouvelles études biologiques à partir du matériel de l'étude par les personnes y participant et lorsqu'elles n'ont pas été prévues par le protocole, le Conseil Scientifique les étudie et définit les conditions d'accès aux données et les règles de publication des résultats.

7.2.2 Comité de surveillance indépendant

Il ne sera pas constitué de comité de surveillance indépendant, car l'étude a un niveau de risque A.

8. Droit d'accès aux données 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.

9. Contrôle et assurance de la qualité

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.

9.1 Procédures de monitoring

L'étude DAP12-WEGENER a un niveau de risque A.

Le niveau de monitoring correspondant est le suivant :

- Monitoring de base : dossiers sources, critères d'inclusion, critères de non-inclusion, critère principal, événements indésirables, traitements
- vérifications des consentements éclairés

Les ARC représentants du promoteur effectueront des visites des centres investigateurs au rythme correspondant aux inclusions dans les différents centres et au niveau de risque qui a été attribué à la recherche.

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

- Lors des visites suivantes (au minimum, une visite de monitoring tous les 3 mois), le remplissage du registre des vascularites sera revu au fur et à mesure de l'état d'avancement de

la recherche par les ARCs. 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,
- 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 (à l'issue du gel des données) : récupération des cahiers d'observation, documents de la recherche biomédicale, archivage.

9.2 Transcription des données dans le cahier d'observation

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

L'anonymat des sujets sera assuré par un numéro de code à 6 digits, comprenant le code du centre (C pour Cochin et H pour l'HEGP), le numéro du groupe (1-Patients ayant une MW dans sa forme localisée dite « granulomateuse » ; 2-Patients ayant une MW dans sa forme généralisée dite « vascularitique » ; 3-Patients ayant une micropolyangéite; 4-Patients ayant une sarcoïdose), le numéro de patient dans le groupe (de 01 à 30) et de la première lettre du nom et la première lettre du prénom de la personne qui se prête à la recherche sur tous les documents nécessaires, 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.

L'accès au registre par les médecins investigateurs sera restreint par un code d'accès (identifiant et mot de passe) personnel et unique pour chaque utilisateur. Chaque investigateur disposera en outre d'un profil spécifique lui attribuant des droits ou non à certaines des fonctions du système (saisie ou visualisation simple des données du patient inclus ou de l'ensemble des données de l'étude, possibilité de modification et de validation par les ARC, etc...). Le stockage des données sera effectué sur un serveur sécurisé, avec cryptage des données lors des transmissions et copie de sauvegarde automatique interne sur le serveur qui hébergera la solution logicielle d'infogérance Cleanweb (à l'AP-HP, Bessières). La gestion et le contrôle de la qualité des données des patients seront effectués de façon conjointe par les Attachés de Recherche Clinique (ARC) de l'Unité de Recherche Clinique (URC) Paris Centre et le coordonnateur et le responsable scientifique de l'étude.

10. Considérations éthiques

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 aura fourni 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.

10.1 Demande d'autorisation auprès 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.

10.2 Demande d'avis au Comité 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.

10.3 Modifications

Le DRCD 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 sur 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.

10.4 Déclaration 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 DRCD 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.

10.5 Note d'information et Consentement éclairé

Le consentement écrit doit être recueilli auprès de toute personne se prêtant à la recherche avant la réalisation de tout acte nécessité par la recherche biomédicale.

Les malades inclus seront informés oralement et à l'aide d'un formulaire d'information, document écrit du déroulement protocole, et devront signer le formulaire de consentement s'ils acceptent d'y participer. Les patients auront un délai de réflexion.

Au préalable, ils auront reçu une information de la part de leur médecin sur le but de l'étude, la durée de leur participation, les procédures qui seront suivies, les bénéfices, risques prévisibles et désavantages qui pourraient résulter des traitements de l'étude, la confidentialité des données, la couverture par une assurance.

La participation à l'étude est volontaire.

Le formulaire de consentement sera paraphé et signé en 3 exemplaires par le patient et le médecin investigateur. Une copie de ce document sera remise au patient.

10.6 Rapport final de la recherche

Le rapport final de la recherche sera écrit en collaboration par le coordonnateur et le responsable scientifique 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.

11. Traitement des données et conservation des documents et des données 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).

12. Financement et assurance

12.1 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.

12.2 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.

13. Règles 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.

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.

Références

1. Helming L, Tomasello E, Kyriakides TR, et al. Essential role of DAP12 signaling in macrophage programming into a fusion-competent state. *Sci Signal*. 2008;**1**:ra11.
2. Tessarz AS, Cerwenka A. The TREM-1/DAP12 pathway. *Immunol Lett*. 2008;**116**:111-6.
3. Csernok E, Ai M, Gross WL, et al. Wegener autoantigen induces maturation of dendritic cells and licenses them for Th1 priming via the protease-activated receptor-2 pathway. *Blood*. 2006;**107**:4440-8.
4. Komocsi A, Lamprecht P, Csernok E, et al. Peripheral blood and granuloma CD4(+)CD28(-) T cells are a major source of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in Wegener's granulomatosis. *Am J Pathol*. 2002;**160**:1717-24.
5. Porges AJ, Redecha PB, Kimberly WT, Csernok E, Gross WL, Kimberly RP. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies engage and activate human neutrophils via Fc gamma RIIa. *J Immunol*. 1994;**153**:1271-80.
6. Savage CO, Pottinger BE, Gaskin G, Pusey CD, Pearson JD. Autoantibodies developing to myeloperoxidase and proteinase 3 in systemic vasculitis stimulate neutrophil cytotoxicity toward cultured endothelial cells. *Am J Pathol*. 1992;**141**:335-42.
7. Groh V, Bruhl A, El-Gabalawy H, Nelson JL, Spies T. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;**100**:9452-7.
8. Nakajima T, Goek O, Zhang X, et al. De novo expression of killer immunoglobulin-like receptors and signaling proteins regulates the cytotoxic function of CD4 T cells in acute coronary syndromes. *Circ Res*. 2003;**93**:106-13.
9. Chaussabel D, Quinn C, Shen J, et al. A modular analysis framework for blood genomics studies: application to systemic lupus erythematosus. *Immunity*. 2008;**29**:150-64.
10. Dubois-Laforgue D, Carel JC, Bougnères PF, Guillet JG, Boitard C. T cell response to proinsulin and insulin in type 1 and pretype 1 diabetes. *J Clin Immunol*. 1999;**19**:127-34.
11. Harrison LC, Honeyman MC, De Aizpurua HJ, et al. Inverse relation between humoral and cellular immunity to glutamic acid decarboxylase in subjects at risk of insulin-dependent diabetes. *Lancet*. 1993;**341**:1365-9.