

**« Production d'HOCl et polyangéite microscopique »**

**« OXY-MPO : Valeur prédictive de la mesure  
de la production d'acide hypochloreux (HOCl)  
sur l'évolution de la polyangéite microscopique (MPA) »**

Etude multicentrique, collection biologique.

Code projet : CRC 07020

Numéro ID RCB: 2008-A01147-48

Protocole version n°3.0 du 04/06/2010

**Investigateur coordonnateur**

**Dr GUILPAIN Philippe**

Hôpital Hôtel Dieu

Service de Médecine Interne

1, place du parvis de Notre-Dame, 75 004 PARIS

Tél. : 01 42 34 83 46 Fax : 01 42 34 85 88 Mail : philippe.guilpain@htd.aphp.fr

**Gestionnaire**

Assistance Publique – Hôpitaux de Paris

Département de la Recherche Clinique et du Développement

Carré historique de Hôpital St Louis

1 avenue Claude Vellefaux - 75010 Paris

Chef de projet : **Aurélie GUIMFACK**

Chef de projet Assistant : **Christine LANAU**

Tél : 01 44 84 17 98 / 17 89 Fax : 01 44 84 17 99 Mail : aurelie.guimfack@sls.aphp.fr  
christine.lanau@sls.aphp.fr

**Unité de Recherche Clinique**

**URC Paris Centre**

Hôpital Tarnier

89, rue d'Assas

75006 Paris

Responsable : **Pr J. M. TRELUYER**

Chef de Projet : **Séverine POIGNANT**

**ARC : Célestin OMBOLO**

Tel: 01 58 41 12 11 / 01 58 41 38 82 Fax: 01 58 41 11 83  
Mail : severine.poignant@cch.aphp.fr / celestin.ombolo@cch.aphp.fr

**Directeurs scientifiques**

**Directeur scientifique médical :**

**Pr Luc Mouthon**

Hôpital Cochin

Service de Médecine Interne

27 rue du Faubourg St-Jacques, 75014 Paris

Tel : 01.58.41.20.31

Fax : 01.58.41.15.79

Mail : luc.mouthon@cch.aphp.fr

**Directeur scientifique biologique :**

**Dr Frédéric Batteux**

Hôpital Cochin

Service d'Immunologie Biologique

27 rue du Faubourg St-Jacques, 75014 Paris

Tel : 01.58.41.20.07

Fax : 01.58.41.20.08

Mail : frederic.batteux@cch.aphp.fr

**Analyse biologique**

**Dr Batteux Frédéric et Dr Bernard Weill**

Hôpital Cochin

Service d'Immunologie Biologique

27 rue du Faubourg St-Jacques, 75014 Paris

Tel : 01.58.41.20.07

Fax : 01.58.41.20.08

Mail : frederic.batteux@cch.aphp.fr

Mail : bernard.weill@cch.aphp.fr

**Statistiques :**

**Pr Joël Coste**

Hôpital Cochin

Service d'Informatique Médicale

27 rue du Faubourg St-Jacques, 75014 Paris

Tel : 01.58.41.31.54

Fax : 01.58.41.19.61

Mail : coste@cochin.univ-paris5.fr

**Liste des centres :**

<b>N° centre</b>	<b>Centre</b>	<b>Investigateur principal</b>	<b>Collaborateurs</b>
<b>1</b>	<b>Médecine Interne Cochin</b>	<b>Pr Loïc Guillevin</b>	<b>Dr Christian Pagnoux</b>
<b>2</b>	<b>Médecine Interne Lille</b>	<b>Pr Hachulla Eric</b>	<b>Pr Hatron Pierre-Yves Dr David Launay Dr Marc Lambert Dr Sandrine Morell-Dubois Dr Hilaire Charlanne</b>
<b>3</b>	<b>Rhumatologie CH Le Mans</b>	<b>Dr Puéchal Xavier</b>	
<b>4</b>	<b>EFS St Vincent de Paul</b>	<b>Dr Woimant Geneviève</b>	<b>Dr Puydupin Daniel</b>
	<b>ImmunoBiologie</b>	<b>Dr Weill Bernard</b>	<b>Dr Batteux Frédéric Dr Claire Goulvestre</b>
<b>5</b>	<b>Médecine Interne Hôtel-Dieu</b>	<b>Dr Philippe Guilpain</b>	
<b>6</b>	<b>Néphrologie HEGP</b>	<b>Dr Alexandre Karras</b>	<b>Pr Christian Jacquot</b>
<b>7</b>	<b>Médecine interne – Néphrologie CH Valenciennes</b>	<b>Dr Xavier Kyndt</b>	<b>Dr Philippe Vanhille</b>
<b>8</b>	<b>Néphrologie Hôtel Dieu Nantes</b>	<b>Dr Fadi Fakhouri</b>	
<b>9</b>	<b>Médecine Interne Hôtel Dieu Nantes</b>	<b>Pr Hamidou</b>	

## Résumé du protocole

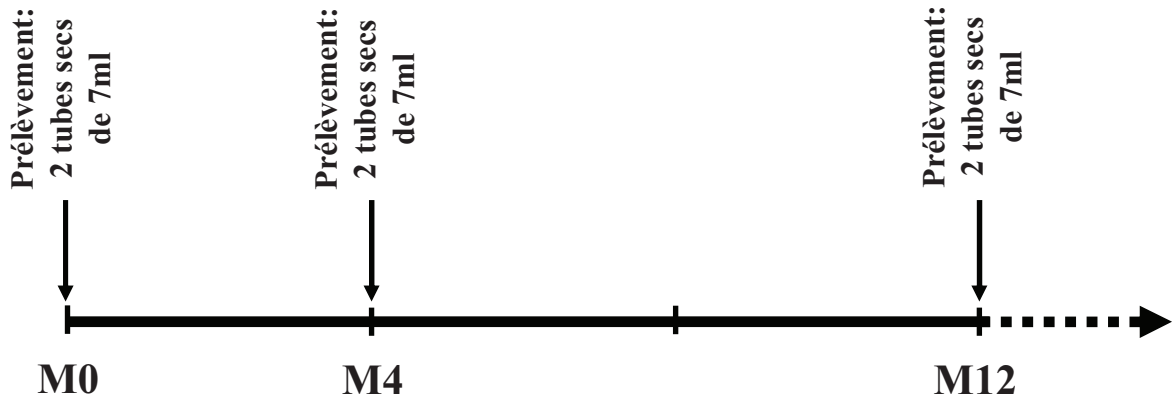
<b>Titre de l'étude</b>	<p style="text-align: center;"><b>OXY-MPO</b></p> <b>Valeur prédictive de la mesure de la production d'acide hypochloreux (HOCl) sur l'évolution de la polyangéite microscopique (MPA)</b>
<b>Etat de la question</b>	<p>Les vascularites systémiques sont définies histologiquement par la mise en évidence d'une inflammation de la paroi vasculaire. Au sein des vascularites systémiques, les vascularites ANCA-positives constituent un groupe d'affections qui touchent préférentiellement les vaisseaux de petit calibre et qui sont associées à la présence dans le sérum des malades d'autoanticorps anti-cytoplasme de polynucléaire neutrophile (ANCA). Le groupe des vascularites ANCA-positives comprend la granulomatose de Wegener (GW), le syndrome de Churg et Strauss (SCS) et la polyangéite microscopique (MPA). La protéinase 3 (PR3) et la myéloperoxydase (MPO) sont les cibles antigéniques des ANCA. Toutes deux sont présentes dans les granules des polynucléaires neutrophiles (PNN), et sont à l'origine d'une fluorescence cytoplasmique (cANCA) et périnucléaires (pANCA), respectivement. Les ANCA anti-PR3 ont été observés chez 90 % des malades atteints de GW systémique en poussée. Les ANCA anti-MPO sont principalement observés au cours de deux maladies : la MPA (chez 75 % des malades atteints de MPA) et le SCS (chez 38 % des patients atteints de SCS).</p> <p>La MPA se manifeste typiquement par une vascularite rénale et pulmonaire. Au cours de cette affection, tous les organes peuvent être touchés. Il existe des formes sévères et l'évolution spontanée peut conduire au décès du malade. Le traitement de la MPA repose sur une corticothérapie systémique à laquelle on adjoint un traitement immunosuppresseur (le plus souvent par cyclophosphamide) dans les formes les plus sévères. Cependant, dans un certain nombre de cas, la maladie est difficilement contrôlée par ces traitements. En particulier, certains malades sont corticodépendants, ce qui impose d'associer un traitement immunosuppresseur ou de renforcer celui-ci.</p> <p>La MPA est une maladie inflammatoire systémique, dont la nature autoimmune a été récemment mise en évidence. On sait en effet que les ANCA anti-MPO sont pathogènes et peuvent déclencher une vascularite. L'effet pathogène des ANCA anti-MPO est lié en partie à une activation du PNN. Cependant, nous avons très récemment mis en évidence <i>in vitro</i>, un effet original des ANCA anti-MPO sur la MPO. Cet effet est une activation de la fonction enzymatique de la MPO par les ANCA anti-MPO, ce qui conduit à une augmentation de la production d'acide hypochloreux (HOCl) par l'enzyme (7). Nous avons aussi montré que cette production d'oxydants était toxique pour la cellule endothéliale et qu'elle était corrélée à l'activité de la maladie. Cette corrélation nous semble d'autant plus intéressante qu'il n'existe pas à ce jour de marqueur biologique d'activité de la MPA, utilisable en pratique clinique.</p>
<b>Objectif principal</b>	Evaluer, au cours de la MPA avec ANCA anti-MPO, la valeur pronostique de la mesure de la production d'HOCl par la MPO en présence de sérum.
<b>Objectifs secondaires</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- étude de la relation entre la production d'oxydants par la MPO (HOCl et activité enzymatique de la MPO) et le statut clinique, l'activité et la sévérité de la maladie</li> <li>- étude des paramètres pouvant moduler l'activité de la MPO (taux sériques de MPO, céruléoplasmine, CRP)</li> </ul>

	- comparaison des différents groupes d'individus
<b>Population concernée</b>	50 patients ayant une MPA répondant aux critères de Chapel Hill et ayant des ANCA anti-MPO et 50 sujets sains donneurs de sang réguliers
<b>Critères d'inclusion des patients</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Malades âgés de plus de 18 ans</li> <li>-Présentant une polyangéite microscopique répondant aux critères de classification de Chapel Hill</li> <li>-Présentant une maladie de Wegener, avec des anticorps anti-MPO</li> <li>-Associée à la détection d'ANCA de spécificité anti-MPO dans le sérum</li> <li>-En phase active de la maladie (BVAS &gt; 3)</li> <li>-au moment du diagnostic (première poussée) en l'absence de traitement ou à l'occasion d'une rechute survenant sous traitement.</li> <li>-Signature du consentement éclairé</li> <li>-Affiliation à un régime de sécurité sociale (bénéficiaire ou ayant droit)</li> <li>-Réalisation d'un examen médical préalable à la recherche</li> </ul> <p>Il est possible d'inclure des patients de manière rétrospective, pour lesquels des prélèvements de sérum auraient été effectués et conservés au moment du diagnostic de leur maladie, puis entre 3 et 4 mois plus tard et enfin un an après le diagnostic.</p>
<b>Critères de non-inclusion des patients</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Mineurs</li> <li>-Femmes enceintes</li> <li>-Vascularites autres que la polyangéite microscopique</li> <li>-Absence d'anticorps anti-MPO au moment de l'inclusion</li> <li>-MPA avec BVAS &lt; ou = 3.</li> <li>-Absence de signature du consentement éclairé.</li> </ul>
<b>Critères d'inclusion des sujets sains</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Donneur âgé de 18 à 65 ans.</li> <li>-Donneur de sang apte au don, selon les Bonnes Pratiques de Prélèvements.</li> <li>-Pour permettre un appariement avec les malades ayant plus de 65 ans, seront prélevés des donneurs autologues pris en charge à l'EFS pour une autotransfusion dans le cadre d'une intervention orthopédique froide programmée.</li> <li>-Donneurs ne présentant pas de maladie auto-immune et/ou inflammatoire, ni de diabète.</li> <li>-Donneurs ne présentant pas de thyroïdite active, ni de maladie de Basedow active.</li> <li>-Donneurs ne présentant pas d'antécédent de thyroïdite, ni de maladie de Basedow.</li> <li>-Donneurs ayant été informé et ayant signé un consentement.</li> <li>-Affiliation à un régime de sécurité sociale (bénéficiaire ou ayant droit).</li> <li>-Les donneurs traités par anti-inflammatoires ou hormones thyroïdiennes peuvent être inclus (peuvent être inclus les donneurs ayant été opérés d'un nodule ou plusieurs thyroïdiens).</li> </ul>
<b>Critères de non-inclusion des sujets sains</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Donneurs ayant moins de 18 ans.</li> <li>-Sujets exclus du don de sang selon les textes en vigueur.</li> <li>-Donneurs sous corticothérapie ou corticothérapie arrêtée depuis moins de 15 jours avant le prélèvement.</li> <li>-Donneurs prenant de l'allopurinol.</li> </ul> <p>L'entretien médical pré-don jugeant de l'aptitude au don du sang sera proposé au donneur, s'il rentre dans les critères de sélection de l'étude.</p>
<b>Méthode d'observation ou d'investigation retenue</b>	Etude non-interventionnelle avec collection biologique et recueil de données associées. Etude prospective, multicentrique (4 centres), nationale.

<p><b>Mode de circulation des données</b></p>	<p>Les données de santé seront recueillies dans un cahier de recueil de données papier, qui comprendra trois pages par visite, pour chaque malade.</p> <p>Pour les sujets sains, seuls les données concernant l'âge et le sexe seront recueillies, car elles sont nécessaires pour appairer les témoins et les malades.</p> <p>Les données retranscrites sur les cahiers d'observation pour les malades seront collectées par l'Attaché de Recherche clinique en charge de la recherche lors de ses visites de monitoring sur site et conservées à l'URC Paris Centre, avant d'être transmises à la société prestataire de services, qui sera chargée de la saisie.</p> <p>Elles seront ensuite transmises au responsable du service de Bio statistique en charge de l'analyse des données.</p> <p>Les données concernant les témoins (âge et sexe) seront transmises à l'URC Paris Centre, qui assure la gestion et le monitoring de l'essai afin de pouvoir vérifier l'appariement entre les sujets sains et les malades.</p>
<p><b>Durée et modalités d'organisation de la recherche</b></p>	<p>La recherche est programmée pour 3 ans : 2 ans d'inclusion + 1 an de suivi.</p> <p>La participation d'un patient se limitera à 3 visites réparties sur un an. (inclusion, une visite au 4<sup>ème</sup> mois (M4 +/- 1 mois), 12<sup>ème</sup> mois). A chaque visite, un prélèvement sanguin sera effectué et des données cliniques seront recueillies.</p>
<p><b>Méthode d'analyse des données</b></p>	<p>La comparaison des variables quantitatives utilisera les tests de Student ou de Wilcoxon-Mann-Whitney, si nécessaire. Des ANOVA (après transformation des variables non gaussiennes) seront également envisagés.</p> <p>La comparaison des variables quantitatives utilisera les tests du Chi-deux ou de Fischer, si nécessaire.</p> <p>En présence de données censurées, des courbes de Kaplan-Meier et des tests du log-rank seront utilisés.</p> <p>Des ajustements seront également envisagés (sur l'âge, le sexe, les concentrations sériques de MPO, etc...): des modèles linéaires, logistiques ou de Cox seront employés.</p> <p>La détermination de seuils optimaux (notamment pour la production d'HOCl à l'inclusion au regard du devenir des patients) utilisera la courbe ROC et l'indice de Youden.</p> <p>La corrélation entre des variables quantitatives sera mesurée par le coefficient de corrélation de Pearson.</p>
<p><b>Justification du nombre de sujets ou analyse de puissance</b></p>	<p>Le protocole prévoit l'inclusion de 50 cas (assortis à 50 témoins). Partant de l'hypothèse selon laquelle un tiers des cas présenteront un rechute au bout d'un an, l'inclusion des 50 cas assure une puissance de 80% (pour un test bilatéral à 5%), si le seuil optimal est la médiane et que le risque relatif de rechute à un an associé au groupe de patients présentant les plus fortes production d'HOCl à l'inclusion est 4. De même, ce nombre de sujets assure une puissance de 80% si le seuil optimal est le 2ème tertile et que le risque relatif associé au groupe de patients présentant les plus fortes productions d'HOCl à l'inclusion est 6. (Ces calculs sont valables pour un test du log-rank, avec au plus 10% de perdus de vue à un an).</p>
<p><b>Critères de jugement</b></p>	<p><u>Critère principal :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- valeur prédictive de la production d'HOCl sur le risque de rechute à un an, mesuré par un risque relatif.</li> </ul> <p><u>Critères secondaires :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- valeur prédictive de la production d'HOCl sur le risque de rechute à quatre mois, mesuré par un risque relatif.</li> <li>- relation entre la production d'HOCl et le statut clinique, l'activité et la sévérité de la MPA évaluées par le BVAS et le FFS.</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"><li>- relation entre le titre des ANCA anti-MPO et l'activité et la sévérité de la MPA évaluées par le BVAS et le FFS.</li><li>- valeur prédictive de l'activité enzymatique de la MPO sur le risque de rechute.</li><li>- relation entre l'activité enzymatique de la MPO et le statut clinique, l'activité et la sévérité de la MPA évaluées par le BVAS et le FFS.</li><li>- relations entre taux sériques de CRP, céruléoplasmine, MPO et activité et de la maladie.</li><li>- comparaison des productions d'HOCl entre les différents groupes d'individus</li></ul>
--	--

**Schéma de l'étude :**



**Poussée de MPA**  
(diagnostic ou rechute)

**A CHACUN DES 3 PRÉLÈVEMENTS**

- Dosage des ANCA anti-MPO
- Détermination de la production d'HOCl par la MPO
- Détermination de l'activité enzymatique de la MPO.
- Détermination des taux sériques de MPO.
- Mesure de la concentration sérique de céruléoplasmine et des taux sériques de CRP
- Recueil des données cliniques et calcul du BVAS et du FFS



**Page de SIGNATURE D'UN PROTOCOLE  
de recherche avec Collection biologique**

Code de la Recherche : CRC 07020

Numéro ID RCB : 2008-A01147-48

Titre : « **OXY-MPO : Valeur prédictive de la mesure de la production d'acide hypochloreux (HOCl) sur l'évolution de la polyangéite microscopique (MPA) »** »

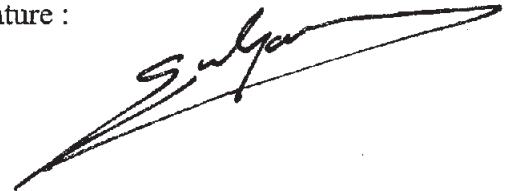
Version n°3.0 du 04/06/2010 suite à l'amendement n°2

L'investigateur coordonnateur :  
**Dr Philippe GUILPAIN**

Hôpital Hôtel-Dieu  
Service de Médecine Interne  
1, place du parvis Notre-Dame  
75 004 Paris

Date : ...30... / ...11... / ...2010...

Signature :



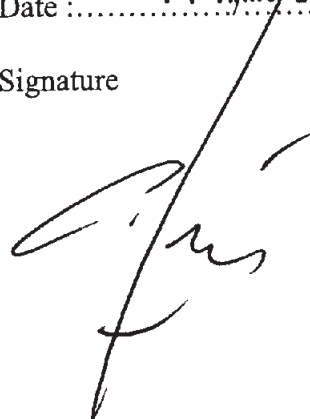
Directeur du DRCD

**Christophe MISSE**

Assistance Publique – Hôpitaux de Paris  
Département de la Recherche Clinique et du  
Développement

Date : ...17 MARS 2011...

Signature



La recherche a reçu un avis favorable du CPP Ile De France III en date du 07 avril 2009.

## **TABLE DES MATIERES**

Résumé et Schéma de l'étude.

Liste des centres : 3

### **1 Introduction et justification de la recherche, résultats attendus et perspectives 13**

1.1 Introduction générale 13

1.2 Résultats attendus 14

1.3 Perspectives 14

### **2 Données de la littérature et pré-requis 14**

2.1 Manifestations cliniques et biologiques de la polyangéite microscopique 14

2.1.1 Classification 14

2.1.2 Epidémiologie 15

2.1.3 Signes Cliniques 15

2.1.4 Examens Complémentaires 16

2.1.5 Evolution et Pronostic 17

2.1.6 Traitement 18

2.2 Aspects physiopathologiques de la MPA 18

2.2.1 Lésions endothéliales au cours de la MPA 18

2.2.2 Recrutement et activation des PNN par les ANCA 19

2.2.3 Rôle pathogène *in vivo* des ANCA anti-MPO 19

2.3 Résultats acquis au laboratoire : Activation de la fonction oxydative de la MPO par les ANCA anti-MPO 20

2.4 Nécessité d'un marqueur biologique pour le suivi des malades 21

### **3 Objectifs de la recherche 22**

3.1 Objectif principal 22

3.2 Objectif secondaires 22

### **4 Conception de la recherche 23**

4.1 Choix du plan expérimental et justification 23

4.2 Suivi des patients 24

4.2.1 Chronologie et contenu des visites 24

4.2.2 Actes, examens et prélèvements 25

4.2.3 Lieu de réalisation des examens, des prélèvements et des dosages 26

4.3 Durée totale prévisionnelle de la recherche 27

4.4 Règles d'arrêt 27

### **5 Sélection et exclusion des personnes de la recherche 27**

5.1 Critères de sélection (inclusion et non inclusion) 27

5.1.1 Critères d'inclusion des sujets malades 27

5.1.2 Critères de non inclusion des sujets malades 28

5.1.3 Critères d'inclusion des sujets sains 28

5.1.4 Critères de non-inclusion des sujets sains 29

5.2 Mode de recrutement 29

5.3 Nombre prévu de personnes et justification 30

5.4 Durée de participation de chaque personne ayant accepté de participer à la recherche et durée d'exclusion 30

## 6 Matériel ou procédures évalué(e)s 31

### 6.1 Description générale des techniques 31

6.1.1 Détection des anticorps anti-cytoplasme de polynucléaire neutrophile (ANCA). 31

6.1.2 Recherche d'ANCA anti-MPO et détermination de leur titre. 31

6.1.3 Détermination de la production d'HOCl par la MPO. 31

6.1.4 Détermination de l'activité enzymatique de la MPO. 32

6.1.5 Détermination des taux sériques de MPO. 32

6.1.6 Mesure de la concentration sérique de céruléoplasmine et mesure des taux sériques de Protéine C-Réactive (CRP). 32

6.1.7 Recueil des données cliniques. 33

6.1.8 Calcul des scores cliniques d'activité et de sévérité 33

### 6.2 Analyse bénéfico-risque de la technique 33

## 7 Critères d'évaluation 33

7.1 Critère principal : 33

7.2 Critères secondaires : 33

7.3 Variables mesurées 34

- paramètres biologiques : titre des ANCA anti-MPO ; production d'HOCl par la MPO ; activité enzymatique de la MPO ; concentration sérique de MPO ; concentration sérique de Protéine C-Réactive (CRP) ; concentration sérique de céruléoplasmine. 34

7.4 Calendriers des évaluations dans les différents groupes 34

7.5 Définitions du statut clinique 35

7.5.1 Activité de la MPA 35

7.5.2 Rémission 35

7.5.3 Réponse 35

Une réduction de 50% de l'activité de la maladie en l'absence de nouvelles manifestations définit une « réponse ». 35

7.5.4 Poussées et Rechutes 35

7.5.5 « Maladie Réfractaire » 36

7.5.6 L'état de « faible activité de la MPA » 36

7.5.7 Five factor Score 36

## 8 Evaluation de la sécurité 37

8.1 Description des paramètres d'évaluation de la sécurité **Erreur ! Signet non défini.**

8.2 Procédures mises en place en vue de l'enregistrement et de la notification des évènements indésirables **Erreur ! Signet non défini.**

8.2.1 Evènements indésirables non graves : **Erreur ! Signet non défini.**

8.2.2 Evènements indésirables graves (EIG) : **Erreur ! Signet non défini.**

## 9 Gestion des données et statistique 37

9.1 Stratégie d'analyse des données collectées 37

9.1.1 Description des méthodes statistiques prévues 38

9.1.2 Nombre prévu de personne à inclure dans la recherche avec sa justification statistique 38

9.1.3 Degré de signification prévu 38

9.1.4 Critères statistiques d'arrêt de la recherche 38

9.1.5 Méthode de prise en compte des données manquantes, inutilisées ou non valides 39

9.1.6 Gestion des modifications apportées au plan statistique initial 39

9.1.7 Choix des personnes à inclure dans les analyses 39

## 10 Considérations réglementaires 39

- 10.1. Textes en vigueur 39
- 10.2. Demande d'autorisation auprès du Comité de Protection des Personnes 39
- 10.3. Déclaration au ministère de la recherche et à l'Agence Régionale de l'Hospitalisation (ARH) 40
- 10.4. Modifications 40
- 10.5. Aspect légal 40
- 10.6. Demande d'autorisation auprès de la CNIL 40

**11 Droit d'accès aux données et documents source 41**

**12 Contrôle et assurance de la qualité 41**

- 12.1. Procédures de monitoring 42
- 12.2. Transcription des données dans le cahier d'observation 42

**13 Archivage dans les centres investigateurs 43**

**14 Rapports et publications 43**

- 14.1. Rapport final de la recherche 43
- 14.2. Publications et propriétés des données 43

**15 Références bibliographiques 45**

**Annexe 1 Définition de la MPA 49**

**Annexe 2. BVAS 2003 50**

**Annexe 3. Déclaration d'HELSINKI de l'Association Médicale Mondiale 51**

# 1 Introduction et justification de la recherche, résultats attendus et perspectives

## 1.1 Introduction générale

Les vascularites systémiques sont définies histologiquement par la mise en évidence d'une inflammation de la paroi vasculaire. Au sein des vascularites systémiques, les vascularites ANCA-positives constituent un groupe d'affections qui touchent préférentiellement les vaisseaux de petit calibre et qui sont associées à la présence dans le sérum des malades d'autoanticorps anti-cytoplasme de polynucléaire neutrophile (ANCA) (1, 2, 3, 4, 5). Le groupe des vascularites ANCA-positives comprend la granulomatose de Wegener (GW), le syndrome de Churg et Strauss (SCS) et la polyangéite microscopique (MPA). La protéinase 3 (PR3) et la myéloperoxydase (MPO) sont les cibles antigéniques des ANCA. Toutes deux sont présentes dans les granules des polynucléaires neutrophiles (PNN), et sont à l'origine d'une fluorescence cytoplasmique (cANCA) et périnucléaires (pANCA), respectivement. Les ANCA anti-PR3 ont été observés chez 90 % des malades atteints de GW systémique en poussée. Les ANCA anti-MPO sont principalement observés au cours de deux maladies : la MPA (chez 75 % des malades atteints de MPA) et le SCS (chez 38 % des patients atteints de SCS).

La MPA se manifeste typiquement par une vascularite rénale et pulmonaire. Au cours de cette affection, tous les organes peuvent être touchés. Il existe des formes sévères et l'évolution spontanée peut conduire au décès du malade. Le traitement de la MPA repose sur une corticothérapie systémique à laquelle on adjoint un traitement immunosuppresseur (le plus souvent par cyclophosphamide) dans les formes les plus sévères. Cependant, dans un certain nombre de cas, la maladie est difficilement contrôlée par ces traitements. En particulier, certains malades sont corticodépendants, ce qui impose d'associer un traitement immunosuppresseur ou de renforcer celui-ci.

La MPA est une maladie inflammatoire systémique, dont la nature autoimmune a été récemment mise en évidence. On sait en effet que les ANCA anti-MPO sont pathogènes et peuvent déclencher une vascularite (6). L'effet pathogène des ANCA anti-MPO est lié en partie à une activation du PNN. Cependant, nous avons très récemment mis en évidence *in vitro*, un effet original des ANCA anti-MPO sur la MPO. Cet effet est une activation de la fonction enzymatique de la MPO par les ANCA anti-MPO, ce qui conduit à une augmentation de la production d'acide hypochloreux (HOCl) par l'enzyme (7). Nous avons aussi montré que cette production d'oxydants était toxique pour la cellule endothéliale et qu'elle était corrélée à l'activité de la maladie. Cette

corrélation nous semble d'autant plus intéressante qu'il n'existe pas à ce jour de marqueur biologique d'activité de la MPA, utilisable en pratique clinique.

### **1.2 Résultats attendus**

Nous pensons que les malades dont le sérum induit la plus forte production d'HOCl par la MPO ont un pronostic plus sévère. Nous pensons également que la mesure de la production d'HOCl est un marqueur prédictif de rechute au cours de la MPA et un marqueur d'activité et de sévérité de la maladie.

### **1.3 Perspectives**

Ce projet devrait permettre de développer un marqueur biologique de « routine » permettant de déterminer le pronostic et l'activité de la vascularite et ainsi d'améliorer la prise en charge et le suivi des patients atteints de MPA.

## **2 Données de la littérature et pré-requis**

### **2.1 Manifestations cliniques et biologiques de la polyangéite microscopique**

La MPA est une vascularite nécrosante systémique touchant les vaisseaux de petit calibre et elle se caractérise dans sa forme typique par certaines manifestations cliniques comme la glomérulonéphrite extracapillaire et/ou les hémorragies pulmonaires intra-alvéolaires et la présence d'ANCA anti-MPO. Nous décrirons ici ses principales caractéristiques, son évolution et son traitement.

#### **2.1.1 Classification**

Ce n'est qu'en 1994 que la classification de Chapel Hill a réellement individualisée la MPA et l'a différenciée de la périartérite noueuse (PAN) (annexe 1). Précédemment, elle était en effet confondue avec la PAN et appelée, à tort, « PAN microscopique ». La classification de l'American College of Rheumatology (ACR), établie en 1990 (8), ne distingue pas ces deux maladies, du fait de très nombreux symptômes communs. Pourtant, l'atteinte rénale glomérulaire et les hémorragies pulmonaires alvéolaires de la MPA permettent de la différencier nettement de la PAN. De plus, leur pathogénie est très différente, la MPA étant associée à la présence d'auto-

anticorps pathogènes dirigés contre le cytoplasme des polynucléaires neutrophiles, les ANCA (3), alors que les ANCA sont absents au cours de la PAN et que des mécanismes rhéologiques et des complexes immuns circulants sont en cause.

### **2.1.2 Epidémiologie**

La MPA est une maladie rare, pouvant toucher des sujets de toutes races, même si dans les séries publiées 85 à 100% des patients sont de race blanche (9). Elle est ubiquitaire, mais sa répartition dans le monde n'est pas totalement homogène. Un gradient Nord-Sud a été constaté en Europe, la MPA étant plus fréquemment observée dans le sud que dans le nord. Elle survient habituellement chez des sujets âgés de plus de 50 ans, donc plus vieux que ceux atteints de PAN, de SCS ou de GW. En France, dans le département de la Seine-Saint-Denis, la prévalence de la MPA est de 25 cas/million d'habitants (10).

### **2.1.3 Signes Cliniques**

Des manifestations générales inaugurales, fièvre et/ou altération de l'état général, sont présentes chez la plupart des patients, parfois plusieurs semaines ou mois avant que ne s'installe une forme plus bruyante de la maladie. Des myalgies, des arthralgies et/ou plus rarement des arthrites sont constatées dans 56–76 % des cas au moment du diagnostic (9, 11).

L'atteinte rénale est caractérisée par une glomérulonéphrite nécrosante extracapillaire, dite aussi rapidement progressive ou pauci-immune. Une hématurie microscopique et/ou une protéinurie peuvent être présentes chez les malades ayant une fonction rénale normale et doivent donc être recherchées systématiquement. A l'inverse, l'insuffisance rénale peut être sévère d'emblée et nécessiter la dialyse. La biopsie rénale, lorsqu'elle est pratiquée, peut montrer la coexistence de lésions de glomérulonéphrite aiguë et de cicatrices glomérulaires témoignant de poussées antérieures. La présence et l'importance de ces dernières lésions cicatricielles et sclérosantes sont de moins bon pronostic quant aux capacités de récupération de la fonction rénale sous traitement (12, 13, 14).

Une hémorragie intra-alvéolaire est observée chez environ un tiers des patients atteints de MPA. Associée à l'atteinte rénale, elle définit le syndrome pneumo-rénal. Les hémorragies alvéolaires massives semblent être de mauvais pronostic, mais elles n'ont pas été reconnues comme telles dans les séries publiées pour le moment ou parmi les paramètres du score pronostique FFS (Five Factor Score) (15).

Une fibrose pulmonaire peut être parfois observée au cours des vascularites P-ANCA + avec anticorps anti-MPO. Dans la plupart des cas, la vascularite régresse rapidement sous traitement alors que la fibrose interstitielle peut continuer à s'aggraver, lentement en général. Leur pronostic semble comparable à celui des autres fibroses pulmonaires idiopathiques (16, 17).

Les manifestations cutanées sont présentes dans 30–60% des cas (9, 11). Le purpura vasculaire déclive des membres inférieurs est la manifestation la plus fréquente. Des ulcérations, des nécroses cutanées, des hémorragies sous-unguéales, des lésions vésiculeuses, peuvent aussi être observées. En général, l'ensemble de ces manifestations cutanées disparaît rapidement sous traitement.

Parmi les autres manifestations, il faut retenir les neuropathies périphériques, en particulier les tableaux de multinévrite, puis les atteintes digestives, avec des douleurs abdominales ou, à l'extrême, des perforations ischémiques, surtout de l'intestin grêle (9, 11). Les atteintes du système nerveux central ainsi que les manifestations cardio-vasculaires sont rares au cours de la MPA. Dans notre série, une insuffisance cardiaque, conséquence d'une vascularite des petits vaisseaux myocardiques, ou une péricardite n'étaient observées que dans 18% et 10% des cas, respectivement. L'oeil peut également être affecté de façon assez exceptionnelle, sous la forme d'une sclérite, d'une iridocyclite, ou d'une vascularite choroïdienne et/ou rétinienne (18). Les manifestations ORL sont peu fréquentes au cours de la MPA.

#### **2.1.4 Examens Complémentaires**

Comme dans les autres vascularites systémiques, il existe habituellement un syndrome inflammatoire biologique, mais non spécifique. Une anémie importante peut être constatée, inflammatoire mais parfois aussi liée à des saignements alvéolaires. L'altération de la fonction rénale est fréquente chez les patients présentant une glomérulonéphrite, précédée ou accompagnée d'une hématurie microscopique et d'une protéinurie.

Des ANCA, de type P-ANCA sont détectés chez 60–75 % des patients, de spécificité anti-MPO dans la majorité des cas (11, 19). Dans moins de 5% des cas, l'association de C-ANCA anti-PR3 et de P-ANCA anti-MPO peut être constatée, de même que la présence de C-ANCA uniquement. La biopsie rénale est quasi-indispensable, à visée diagnostique, en confirmant l'existence d'une glomérulonéphrite nécrosante extra-capillaire, mais aussi pour évaluer le pronostic rénal à moyen et à long terme. Un nombre de glomérules atteints de plus de 60% est de mauvais pronostic de même que lorsqu'il existe une inflammation majeure de l'interstitium rénal, une atteinte tubulaire et/ou une sclérose glomérulaire.



### 2.1.5 Evolution et Pronostic

L'activité de la maladie peut être évaluée par un score biologique prenant en compte chacune des atteintes d'organe spécifiques de la maladie. Ce score est le BVAS (Birmingham Vasculitis Activity Score) (7, 20-22). L'EULAR (EUropean League Against Rheumatism) a récemment publié des recommandations de méthodologie pour les essais dans le domaine des vascularites (21), et a notamment recommandé l'utilisation du BVAS pour préciser l'activité de la maladie. L'EULAR a aussi défini différents statuts cliniques (cf paragraphe 7.5), dont les rechutes.

L'évolution de la MPA est marquée par le risque de rechute. Environ un tiers des patients atteints de MPA feront une rechute, après avoir été mis une première fois en rémission complète (23, 24), donc moins souvent qu'au cours de la GW, mais beaucoup plus qu'au cours de la PAN. Il n'est malheureusement pas possible d'identifier ce sous-groupe de malades qui vont rechuter, ni d'évaluer leur pronostic à long terme. Celui-ci reste malgré tout généralement bon, car les patients en rechute, alertés par la réapparition des signes de leur maladie, consultent rapidement la plupart du temps. De ce fait, les rechutes sont souvent moins sévères que lors de la poussée initiale.

La mortalité globale des patients atteints de MPA est de l'ordre de 30% à 5 ans (11). Cependant, la plupart des décès surviennent chez ceux atteints des formes les plus sévères, ayant un ou plusieurs facteur(s) de mauvais pronostic selon le FFS (15) ou une hémorragie intra-alvéolaire (25). La mortalité des patients atteints de formes cutanées limitées est bien moindre, probablement inférieure à 10% à 5 ans (26).

Une partie des décès est attribuable à la vascularite elle-même, lorsqu'elle n'est pas bien contrôlée par le traitement. Les hémorragies intra-alvéolaires et l'insuffisance rénale contribuent pour beaucoup à ces décès, souvent dans un contexte de défaillance multi-viscérale.

Les décès liés aux effets secondaires des traitements sont également fréquents. Il surviennent durant les premiers mois la maladie et sont le plus souvent en rapport avec des infections. Celles-ci sont favorisées par l'association des corticoïdes et des immunosuppresseurs, et doivent donc être prévenues, quand cela est possible, par la prescription chez les patients lymphopéniques ( $T\ CD4+ < 250/mm^3$ ) de cotrimoxazole en prophylaxie de la pneumocystose pulmonaire notamment, et par l'adaptation du traitement et de ses doses en fonction de la forme de la maladie, l'âge, la fonction rénale et l'état général de chaque patient, tout au long de sa prise en charge.

### **2.1.6 Traitement**

Le traitement de la MPA est maintenant bien codifié et adapté selon la sévérité de la maladie, comme l'ont démontré les résultats des études thérapeutiques prospectives du Groupe Français d'Etude des Vascularites (27).

Lorsqu'il n'y a pas de signe de gravité (FFS =0) (15), le traitement de la MPA est identique à celui de la PAN « de bon pronostic », et consiste en une corticothérapie seule. Les immunosuppresseurs sont ainsi réservés aux formes résistantes, en cas de rechute ou d'aggravation de la maladie (FFS devenant  $\geq 1$ ).

Dans les formes avec atteinte viscérale sévère (FFS  $\geq 1$ ), le traitement repose sur une immunosuppression forte, mais la plus courte possible, durant la phase d'attaque, par cyclophosphamide (CYC), puis plus légère (par azathioprine, méthotrexate ou mycophénolate mofétil), mais prolongée, durant la phase d'entretien, en association d'emblée à une corticothérapie, rapidement décroissante (28).

Les formes fulminantes pneumo-rénales de MPA nécessitent une prise en charge multidisciplinaire et réanimatoire spécialisée, avec notamment mise en place de séances d'hémodialyse ou d'une assistance respiratoire si nécessaire. La prescription d'échanges plasmatiques améliore la survie rénale sans dialyse, mais pas la survie globale. Les échanges plasmatiques doivent facilement être prescrits en cas d'atteinte rénale, de même qu'en cas d'hémorragies intra-alvéolaires (29). Les immunoglobulines polyvalentes gardent quelques indications dans les MPA à rechutes ou réfractaires aux traitements classiques lorsque la clairance de la créatinine permet leur utilisation (30). Des traitements immunosuppresseurs de développement plus récent peuvent également être proposés dans les formes les plus sévères.

## **2.2 Aspects physiopathologiques de la MPA**

La pathogénie de la MPA fait intervenir les cellules endothéliales (CE), les PNN, la MPO et les ANCA anti-MPO. De nombreuses données expérimentales sont en faveur du rôle de ces autoanticorps dans la survenue de la vascularite (1, 7).

### **2.2.1 Lésions endothéliales au cours de la MPA**

Les vascularites ANCA-positives se caractérisent par des lésions des CE. La détection de formes solubles du récepteur de la thrombine, la thrombomoduline, une glycoprotéine transmembranaire exclusivement exprimée par les CE, est considérée comme un marqueur de lésion endothéliale au cours de la GW (31). Dans une étude récente, des CE circulantes ont été

prises en évidence au cours des vascularites ANCA-positives (5). Des quantités importantes de CE circulantes étaient détectées chez les malades ayant une vascularite évolutive, tandis que le nombre des CE circulantes était beaucoup plus faible en phase de rémission de la maladie, et que seules quelques CE circulantes étaient détectées chez des malades ayant une glomérulonéphrite sans ANCA ou chez des sujets sains. Les CE détectées chez les malades ayant une vascularite active avaient un phénotype nécrotique et ces cellules n'ont pu être cultivées (5). Ces données ont notamment été obtenues au cours de la MPA et soulignent l'importance des lésions endothéliales. Celles-ci sont habituellement attribuées à la libération de substances oxydantes et cytotoxiques par les PNN. Nous allons désormais nous efforcer de décrire ces phénomènes oxydatifs.

### **2.2.2 Recrutement et activation des PNN par les ANCA**

Les ANCA sont capables d'activer des PNN en présence de TNF- $\alpha$  et d'IL-8. L'activation des PNN conduit à la production de radicaux libres et à la dégranulation des PNN (32). Il s'agit du « burst oxydatif ». Les enzymes libérés par les PNN activés, en particulier la PR3 et la MPO, peuvent agir sur les cellules endothéliales selon différents mécanismes. Contrairement à la PR3, la MPO n'induit pas l'apoptose de ces cellules *in vitro* mais provoque la production d'oxydants intracellulaires (33, 34). Les PNN circulants pénètrent dans les tissus aux sites de l'inflammation en interagissant avec l'endothélium vasculaire. Ces interactions sont facilitées par les ANCA qui augmentent l'expression membranaire des  $\beta$ 2 intégrines à la surface des PNN et de l'endothelial-leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1), du vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) et des inter-cellular adhesion molecule-1 et 2 (ICAM-1 et ICAM-2) à la surface des cellules endothéliales. De plus, les ANCA favorisent la libération de nombreuses cytokines comme l'IL-1 et l'IL-8 (qui contribuent au recrutement des leucocytes) et facilitent l'adhésion des PNN à la surface des CE (35). Ces différentes étapes, de l'adhésion des PNN aux cellules endothéliales à leur activation par les ANCA, conduisent à un « burst oxydatif », qui conduit à une agression et à un dysfonctionnement des cellules endothéliales.

### **2.2.3 Rôle pathogène *in vivo* des ANCA anti-MPO**

Si les ANCA ont été décrits pour la première fois en 1982, c'est seulement en 2002 que leur rôle pathogène a été démontré *in vivo* dans un modèle expérimental grâce à des expériences d'immunotransfert dans un modèle murin (6). Dans ce modèle, des ANCA anti-MPO ont été induits en immunisant des souris invalidées pour le gène de la MPO et ont été secondairement

injectés à des souris dépourvues de lymphocytes B et de lymphocytes T (invalidées pour le gène Rag). Chez ces souris, l'injection d'ANCA anti-MPO entraîne des lésions de glomérulonéphrite extracapillaire et apporte la preuve que les ANCA anti-MPO peuvent à eux seuls induire une vascularite nécrosante (6). Dans ce modèle, il a été récemment mis en évidence que les PNN infiltrent les lésions glomérulaires et sont indispensables au développement des lésions de vascularite. Ainsi, la déplétion des PNN circulants par des Ac monoclonaux protège de l'apparition des lésions rénales (36), tandis que l'injection de lipopolysaccharide (LPS) bactérien est suivie d'un afflux de PNN, qui est suivie d'une augmentation transitoire du TNF- $\alpha$  circulants et de MPO et d'une aggravation des lésions de vascularite (37). Dans ce modèle, l'administration d'un Ac monoclonal anti-TNF- $\alpha$  préalablement à l'injection d'ANCA anti-MPO diminue l'intensité des lésions glomérulaires médiées par le LPS, sans toutefois les prévenir.

Jusqu'à très récemment aucune preuve définitive du caractère autoimmun des vascularites ANCA-positives n'était disponible chez l'homme. Le rôle pathogène des ANCA anti-MPO chez l'homme a été illustré par la survenue d'un syndrome pneumo-rénal chez un nouveau-né dont la mère avait une MPA diagnostiquée en cours de grossesse (38). La vascularite systémique observée chez le nouveau-né était la conséquence du passage transplacentaire des ANCA anti-MPO de sa mère. Cela atteste de la nature auto-immune de la MPA, qui peut donc être transférée directement d'un individu à l'autre au sein de l'espèce humaine par l'intermédiaire des autoanticorps pathogènes ou des lymphocytes T autoréactifs (39).

### ***2.3 Résultats acquis au laboratoire : Activation de la fonction oxydative de la MPO par les ANCA anti-MPO***

Alors qu'il n'existait pas, jusqu'à présent, de données précises concernant une éventuelle fonction des ANCA anti-MPO sur la MPO, notre équipe vient de mettre en évidence une activation de la fonction enzymatique de la MPO par ces autoanticorps (7).

La MPO est une protéine cationique de 118 kDa. Il s'agit d'une enzyme qui transforme le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en espèces dérivées de l'oxygène en présence d'halides, et notamment en acide hypochloreux (HOCl), en présence d'ions chlorides. L'HOCl est essentiel dans la défense anti-microbienne (40) et très toxique pour les cellules.

Nous avons étudié 32 patients qui présentaient une MPA correspondant à la définition de la classification de Chapel Hill (annexe 1) (4), avec une confirmation histologique chez 29 patients. Dix-huit sérums provenant de 13 patients avec ANCA anti-MPO prélevés en poussée, dix-huit sérums provenant de 10 patients avec ANCA anti-MPO prélevés en rémission et 15 sérums

provenant de 13 patients sans ANCA anti-MPO ont été testés. Les sérums de cinquante sujets sains ont été utilisés comme contrôles.

Nous avons mis en évidence qu'au cours de la MPA, le sérum des patients avec ANCA anti-MPO activent la MPO *in vitro* ( $P < 0.0001$  versus sérums de sujets sains) et induit une production d'HOCl supérieure à celle induite par les sérums de sujets sains ( $P < 0.01$ ) (7). Les IgG purifiées de ces patients produisent les mêmes effets activateurs sur la MPO ( $P < 0.05$ ). En revanche, les patients ayant une MPA sans ANCA anti-MPO n'activent pas la MPO. L'activation de la fonction enzymatique de la MPO par les ANCA anti-MPO joue probablement un rôle très important dans la survenue des lésions endothéliales. En effet, les oxydants (notamment l'HOCl) produits par la MPO dans notre système expérimental ont une activité cytolytique plus importante sur les CE lorsque la MPO a été préalablement incubée en présence en présence d'ANCA anti-MPO ( $P < 0.01$ ). La toxicité de l'HOCl pour les CE pourrait participer au développement des lésions endothéliales, et à l'apparition de CE circulantes, notamment de phénotype nécrotique, qui sont observées au cours des vascularites ANCA-positives (5).

De plus, l'activité enzymatique de la MPO et la production d'HOCl dans notre système expérimental (7) sont plus élevées lors des phases actives de la maladie que lors des phases de rémission ( $p < 0.05$ ) et elle sont corrélées au score d'activité clinique des vascularites, le BVAS (20, 22) (Spearman  $r = 0.8062$ ;  $p < 0.0001$ ). Ces éléments suggèrent très fortement qu'un des mécanismes pathogéniques des ANCA anti-MPO est l'augmentation de la production d'HOCl et de l'activité enzymatique de la MPO. Nous avons aussi mis en évidence que la céruléoplasmine qui est un des inhibiteurs de la MPO était capable de diminuer de façon dose-dépendante la production d'oxydants et en particulier d'HOCl par la MPO.

#### ***2.4 Nécessité d'un marqueur biologique pour le suivi des malades***

Bien qu'ils aient été obtenus dans une étude rétrospective (7), les résultats indiqués ci-dessus sont prometteurs et pourraient répondre à l'attente du clinicien, qui ne dispose pas à ce jour de marqueur biologique lui permettant de prédire l'évolution des malades atteints de MPA et d'adapter la prise en charge thérapeutique.

Si l'on connaît désormais la pathogénicité et les mécanismes d'action des ANCA anti-MPO (6, 7, 32), leur intérêt en pratique clinique est à ce jour imparfaitement défini. La présence d'ANCA anti-MPO constitue un élément diagnostique important, car il oriente vers une vascularite. Mais, une fois posé le diagnostic de MPA, le dosage des ANCA anti-MPO ne présente pas d'intérêt authentique, parce que ni la présence des ANCA anti-MPO ni leur titre ne sont corrélés à l'activité de la vascularite. L'intérêt du dosage des ANCA anti-MPO dans la

surveillance de la vascularite n'est donc pas établi (21). Les études disponibles concernant le titre des ANCA et leur persistance éventuelle en phase de rémission de la maladie concernent surtout la GW et les ANCA anti-PR3. Le peu de données disponibles dans la littérature concernant les ANCA anti-MPO laisserait penser que les malades qui ont des ANCA encore détectables en phase de rémission de la maladie sous traitement ont tendance à rechuter plus. La disparition des ANCA anti-MPO peut être observée en phase de rémission de la vascularite, mais dans un certain nombre de cas leur persistance ou leur réapparition n'est pas associée à une poussée de la maladie (41-44).

Il n'est donc pas possible d'utiliser le dosage des ANCA anti-MPO pour le suivi des malades atteints de MPA. Sur la base des données que nous avons très récemment rapportées (7), nous pensons que la mesure de la production d'HOCl par la MPO (*in vitro* en présence de sérum) peut être un marqueur biologique de l'évolution de la MPA. Nous envisageons donc d'étudier l'intérêt de mesurer la production d'HOCl par la MPO (*in vitro* en présence de sérum) pour prédire l'évolution de la MPA. Nous envisageons aussi d'étudier conjointement l'activité de la maladie.

### **3 Objectifs de la recherche**

Tout en appliquant les recommandations de la société savante européenne EULAR (European League Against Rheumatism) (21), les objectifs de l'étude sont les suivants au cours de la MPA avec ANCA anti-MPO :

#### **3.1 Objectif principal**

L'objectif principal de l'étude est d'évaluer, au cours de la MPA avec ANCA anti-MPO, la valeur pronostique de la mesure de la production d'HOCl par la MPO en présence de sérum.

#### **3.2 Objectif secondaires**

Les objectifs secondaires sont représentés par l'étude de la relation entre la production d'oxydants par la MPO (HOCl et activité enzymatique de la MPO) et le statut clinique, l'activité et la sévérité de la maladie, par l'étude des paramètres pouvant moduler l'activité de la MPO (taux sériques de MPO, céruléoplasmine, CRP) et par la comparaison des différents groupes d'individus. Ces objectifs secondaires sont détaillés ci-dessous :

- évaluer la valeur pronostique de l'activité enzymatique de la MPO en présence de sérum.
- déterminer la relation entre la production d'HOCl et l'activité et la sévérité de la MPA

- déterminer la relation entre la production d'HOCl et le statut clinique défini par l'EULAR
- déterminer la relation entre l'activité enzymatique de la MPO et l'activité et la sévérité de la MPA.
- déterminer la relation entre l'activité enzymatique de la MPO et le statut clinique défini par l'EULAR
- déterminer la relation entre le titre des ANCA anti-MPO et l'activité et la sévérité de la MPA.
- déterminer si les taux sériques de CRP, de céruléoplasmine, et de MPO sont corrélés à l'activité de la maladie.
- comparaison des productions d'HOCl entre les malades en poussée, en rémission et les sujets sains.

## **4 Conception de la recherche**

### ***4.1 Choix du plan expérimental et justification***

Nous ne disposons pas aujourd'hui de marqueur biologique qui puisse aider le clinicien à prédire l'évolution sous traitement des malades atteints de MPA. Les études disponibles concernant le titre des ANCA et leur persistance éventuelle en phase de rémission de la maladie concerne surtout la GW et les ANCA anti-PR3. Le peu de données disponibles dans la littérature concernant les ANCA anti-MPO laisse penser que les malades qui ont des ANCA encore détectables en phase de rémission de la maladie sous traitement ont tendance à rechuter plus.

Sur la base des données que nous avons rapportées récemment, nous envisageons d'étudier l'intérêt de la mesure de la production d'HOCl par la MPO in vitro en présence de sérum pour prédire l'évolution de la MPA. Nous étudierons également l'activité enzymatique de la MPO après exposition au sérum, cette activité et la production d'HOCl étant corrélées (7). D'autres paramètres biologiques seront étudiés. Seront mesurés les titres des ANCA anti-MPO, la concentration sérique de MPO, la concentration sérique de céruléoplasmine (inhibiteur sérique de la MPO), la concentration sérique de CRP (paramètre inflammatoire), afin d'optimiser l'interprétation des résultats.

L'évaluation sur un an à trois reprises (inclusion, 4<sup>ème</sup> mois et 12<sup>ème</sup> mois) est adaptée à l'évolution de la MPA, qui se complique de rechutes précoces. Les critères d'évaluation clinique sont définis selon les recommandations de l'EULAR (European League Against Rheumatism) (21) qui font autorité dans le domaine. Les malades, qui rechutent alors qu'ils sont déjà traités,

peuvent être inclus dans l'étude et ce quel que soit le(s) traitement(s) administré(s). De même, les patients peuvent être inclus dans notre étude quel que soit le(s) traitement(s) qu'ils vont recevoir. Notre étude est en effet une étude clinico-biologique prospective et non un essai thérapeutique. Son objectif principal est d'évaluer la valeur pronostique de la mesure de la production d'HOCl par la MPO. Toutes les données cliniques (y compris celles concernant le traitement qui est bien codifié dans la MPA) pourront être analysées.

L'inclusion de cinquante patients au diagnostic de MPA avec ANCA anti-MPO ou en poussée de la maladie est possible dans le cadre d'une étude multicentrique comprenant les trois services spécialisés suivants, compte tenu du recrutement spécifique de chaque service (nouveaux patients et patients en cours de suivi) :

- Pôle de Médecine Interne de l'hôpital Cochin (Pr Guillevin), AP-HP, Centre National de Référence pour les Vascularites Nécrosantes et la Sclérodémie Systémique
- Service de Médecine Interne - CHRU de Lille (Pr Hatron)
- Service de Rhumatologie - Hôpital du Mans (Dr Puéchal)
- Service de Médecine Interne - Hôtel Dieu - Paris (Dr Guilpain)
- Service de Néphrologie - HEGP - Paris (Dr Karras)
- Service de Médecine Interne/Néphrologie - Centre hospitalier - Valenciennes (Dr Kyndt)
- Service de Néphrologie - Hôtel Dieu - Nantes (Dr Fakhouri)
- Service de Médecine Interne - Hôtel Dieu - Nantes (Pr Hamidou)

Les laboratoires impliqués dans cette étude ont par ailleurs une expertise des dosages biologiques à réaliser (7) :

- Laboratoire de recherche du Dr B Weill, UPRES EA 1833, Hôpital Cochin et Université Paris Descartes.
- Laboratoire de recherche du Pr Luc Mouthon, INSERM U1016 Institut Cochin, Hôpital Cochin et Université Paris Descartes.

## ***4.2 Suivi des patients***

### **4.2.1 Chronologie et contenu des visites**

Trois visites auront lieu pour chaque patient :



- une première visite sera réalisée à l'inclusion pour chaque patient, avant la mise en route d'un traitement spécifique dans le cas d'une MPA au diagnostic et avant modification thérapeutique dans le cas d'une rechute. Les patients sont enregistrés le jour du prélèvement après avoir signé leur consentement.
- une deuxième visite sera réalisée, chez chaque patient, 4 mois (M4 +/- 1 mois) après l'inclusion, en cours de traitement.
- une troisième visite sera effectuée 12 mois après l'inclusion.

A chaque visite, seront réalisés :

- un examen clinique complet
- les examens nécessaires dans le suivi de la MPA
- le recueil des données cliniques permettant de calculer le score d'activité (annexe 2), (Birmingham Vasculitis Activity Score : BVAS (20 , 22)).
- Le score FFS sera calculé seulement au moment de l'inclusion dans l'étude (première visite M0).
- le prélèvement de 2 tubes secs de 7 ml (soit 14 ml) de sang périphérique

Cinquante sujets sains seront également inclus (cf ci-dessous)

#### **4.2.2 Actes, examens et prélèvements**

Trois prélèvements seront réalisés, pour chaque patient. Un premier prélèvement sanguin sera réalisé à l'inclusion chez l'ensemble des patients, avant la mise en route d'un traitement spécifique dans le cas d'une MPA au diagnostic et avant modification thérapeutique dans le cas d'une rechute. Un deuxième prélèvement sera réalisé chez chaque patient 4 mois après l'inclusion, en cours de traitement. Un troisième prélèvement sera effectué 12 mois après l'inclusion. A chaque prélèvement, 2 tubes secs de 7 ml (soit 14 ml) de sang périphérique seront prélevés.

Pour les sujets sains contrôles, un seul prélèvement de sang (2 tubes secs de 7 ml (soit 14 ml) de sang périphérique) sera effectué. Les sujets sains seront recrutés parmi les donneurs de sang réguliers à l'Etablissement Français du Sang (EFS)- Antenne St Vincent de Paul.

Lors de chaque visite, les paramètres habituellement pris en compte dans le cadre de la prise en charge d'une MPA seront colligés. Les données cliniques, qui sont à recueillir en date de chaque prélèvement, sont rassemblées dans la « fiche clinique » qui est indiquée en annexe

(annexe 2). Le statut clinique devra être précisé. Les scores cliniques suivants seront également calculés :

- score de sévérité : (Five Factor Score) FFS (15) : seulement au moment de l'inclusion
- score d'activité (Birmingham Vasculitis Activity Score :BVAS) (20 , 22).

#### **4.2.3 Lieu de réalisation des examens, des prélèvements et des dosages**

Deux tubes secs de 7 ml seront prélevés à l'occasion d'un bilan de la MPA.

Les centres où auront lieu les prélèvements sont les suivants :

- Pôle de Médecine Interne de l'hôpital Cochin (Pr. Guillevin), AP-HP, Centre National de Référence pour les Vascularites Nécrosantes et la Sclérodémie Systémique
- Service de Médecine Interne du CHRU de Lille (Pr Hatron)
- Service de Rhumatologie de l'hôpital du Mans (Dr Puechal)
- Service de Médecine Interne - Hôtel Dieu - Paris (Dr Guilpain)
- Service de Néphrologie - HEGP - Paris (Dr Karras)
- Service de Médecine Interne/Néphrologie - Centre hospitalier - Valenciennes (Dr Kyndt)
- Service de Néphrologie - Hôtel Dieu - Nantes (Dr Fakhouri)
- Service de Médecine Interne - Hôtel Dieu - Nantes (Pr Hamidou)

Après centrifugation des 14 ml de sang prélevés, 4 aliquots de 1,5 ml seront obtenus. Ces aliquots seront conservés sur le site investigateur dans des congélateurs à – 80°C pendant un an, avant d'être acheminés vers le centre coordonnateur par un transporteur que l'URC Paris Centre se chargera de faire venir sur site. Le transport des cryotubes de fera à – 20 °C.

Les boîtes de stockage des cryotubes ainsi que les cryotubes seront fournis au début de l'étude par l'URC Paris centre.

Les dosages biologiques auront lieu au sein des laboratoires suivants :

- Laboratoire de recherche du Dr B Weill, UPRES EA 1833, Hôpital Cochin et Université Paris Descartes.
- Laboratoire de recherche du Pr Luc Mouthon, INSERM U1016 Institut Cochin, Hôpital Cochin et Université Paris Descartes.

Les dosages réalisés sur les prélèvements des sujets sains sont les mêmes que ceux qui seront réalisés sur les prélèvements des sujets malades.

Dans le cas où serait observée une anomalie biologique de l'un des tests des sujets sains, l'EFS en sera informé et une consultation médicale spécialisée dans le Pôle de Médecine interne de l'hôpital Cochin sera proposée au sujet concerné.

#### ***4.3 Durée totale prévisionnelle de la recherche***

La durée totale de l'étude est de 3 ans (deux an d'inclusion et un an de suivi). La participation d'un patient se limitera à 3 visites sur un an.

La participation d'un sujet sain se limitera à une journée.

#### ***4.4 Règles d'arrêt***

L'arrêt de la participation d'une personne à la recherche peut se faire :

- à tout moment à sa demande et entraînera immédiatement la destruction des échantillons de sérum correspondants.
- en cas d'erreur diagnostique (s'il ne s'agit pas d'une MPA).

L'arrêt de l'étude dans un centre peut être décidé en cas de :

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

## **5 Sélection et exclusion des personnes de la recherche**

### ***5.1 Critères de sélection (inclusion et non inclusion)***

Un examen médical préalable sera nécessaire avant l'inclusion d'un patient dans l'étude.

#### **5.1.1 Critères d'inclusion des sujets malades**

- Malades âgés de plus de 18 ans
- Présentant une MPA répondant aux critères de classification de Chapel Hill (annexe 1).
- Associée à la détection d'ANCA de spécificité anti-MPO dans le sérum
- Présentant une maladie de Wegener, avec des anticorps anti-MPO

- En phase active de la maladie (BVAS > 3)
- Au moment du diagnostic (première poussée) en l'absence de traitement ou à l'occasion d'une rechute survenant sous traitement
- Signature du consentement éclairé
- Affiliation à un régime de sécurité sociale (bénéficiaire ou ayant droit)
- Réalisation d'un examen médical préalable à la recherche

Il est possible d'inclure des patients de manière rétrospective, pour lesquels des prélèvements de sérum auraient été effectués et conservés au moment du diagnostic de leur maladie, puis entre 3 et 4 mois plus tard et enfin un an après le diagnostic.

Dans le cadre du suivi habituel des patients, des prélèvements de sérum sont régulièrement réalisés et conservés au sein des hôpitaux qui prennent en charge des malades. Ces prélèvements sont conservés dans le but d'effectuer des recherches ultérieures dans le domaine des vascularites. Les patients donnent leur accord préalablement à la constitution de cette collection, en signant un formulaire de consentement spécifique. Ces patients signeront également le consentement pour l'étude.

### **5.1.2 Critères de non inclusion des sujets malades**

- Mineurs
- Femmes enceintes
- Vascularites autres que la MPA
- Absence d'anticorps anti-MPO au moment de l'inclusion
- MPA avec BVAS < ou = 3
- Absence de signature du consentement éclairé

### **5.1.3 Critères d'inclusion des sujets sains**

- Donneur âgé de 18 à 65 ans.
- Donneur de sang apte au don, selon les Bonnes Pratiques de Prélèvements.
- Pour permettre un appariement avec les malades ayant plus de 65 ans, seront prélevés des donneurs autologues pris en charge à l'EFS pour une autotransfusion dans le cadre d'une intervention orthopédique froide programmée.
- Donneurs ne présentant pas de maladie auto-immune et/ou inflammatoire, ni de diabète.

- Donneurs ne présentant pas de thyroïdite active, ni de maladie de Basedow active.
- Donneurs ne présentant pas d'antécédent de thyroïdite, ni de maladie de Basedow.
- Donneurs ayant été informé et ayant signé un consentement.
- Affiliation à un régime de sécurité sociale (bénéficiaire ou ayant droit).
- Les donneurs traités par anti-inflammatoires ou hormones thyroïdiennes peuvent être inclus (peuvent être inclus les donneurs ayant été opérés d'un nodule ou plusieurs thyroïdiens).

#### **5.1.4 Critères de non-inclusion des sujets sains**

- Donneurs ayant moins de 18 ans.
- Sujets exclus du don de sang selon les textes en vigueur.
- Donneurs sous corticothérapie ou corticothérapie arrêtée depuis moins de 15 jours avant le prélèvement.
- Donneurs prenant de l'allopurinol.

L'entretien médical pré-don jugeant de l'aptitude au don du sang sera proposé au donneur, s'il rentre dans les critères de sélection de l'étude.

## **5.2 Mode de recrutement**

Cinquante patients consécutifs ayant une MPA répondant aux critères d'inclusion seront prospectivement inclus dans cette étude par les centres suivants :

- Pôle de Médecine Interne de l'hôpital Cochin (Pr. Guillevin), AP-HP, Centre National de Référence pour les Vascularites Nécrosantes et la Sclérodémie Systémique
- Service de Médecine Interne du CHRU de Lille (Pr Hatron)
- Service de Rhumatologie de l'hôpital du Mans (Dr Puéchal)
  - Service de Médecine Interne - Hôtel Dieu - Paris (Dr Guilpain)
  - Service de Néphrologie - HEGP - Paris (Dr Karras)
  - Service de Médecine Interne/Néphrologie - Centre hospitalier - Valenciennes (Dr Kyndt)
  - Service de Néphrologie - Hôtel Dieu - Nantes (Dr Fakhouri)
- Service de Médecine Interne - Hôtel Dieu - Nantes (Pr Hamidou)

Cinquante sujets sains appariés pour le sexe et l'âge seront recrutés parmi les donneurs de sang réguliers à l'Etablissement Français du Sang (EFS) - Antenne St Vincent de Paul, sous la responsabilité du Dr Geneviève Woimant.

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. Une marge de plus ou moins 5 ans par rapport à l'âge du malade est autorisée pour le recrutement et l'appariement des sujets sains aux sujets malades.

### ***5.3 Nombre prévu de personnes et justification***

Le protocole prévoit l'inclusion de 50 cas (assortis à 50 témoins). Partant de l'hypothèse selon laquelle un tiers des cas présenteront une rechute au bout d'un an, l'inclusion des 50 cas assure une puissance de 80% (pour un test bilatéral à 5%), si le seuil optimal est la médiane et que le risque relatif de rechute à un an associé au groupe de patients présentant les plus fortes production d'HOCl à l'inclusion est 4. De même, ce nombre de sujets assure une puissance de 80% si le seuil optimal est le 2ème tertile et que le risque relatif associé au groupe de patients présentant les plus fortes productions d'HOCl à l'inclusion est 6. Ces calculs sont valables pour un test du Log-rank, avec au plus 10% de perdus de vue à un an. Les 50 cas se répartissent comme suit : 26 cas à Cochin et 12 dans chacun des deux autres centres investigateurs recrutant les malades. Cinquante sujets sains (appariés pour l'âge et le sexe) seront également inclus.

### ***5.4 Durée de participation de chaque personne ayant accepté de participer à la recherche et durée d'exclusion***

La durée de participation des patients est d'une journée à trois reprises, réparties sur un an (à l'inclusion, à quatre mois puis à douze mois).

La durée de participation des sujets sains est d'une journée.

La participation des patients à cette recherche ne les empêche pas de participer à une autre recherche, qu'elle soit interventionnelle ou non interventionnelle (recueil de données, enquêtes ou une autre étude biologique indépendante de ce protocole).

## **6 Matériel ou procédures évalué(e)s**

### **6.1 Description générale des techniques**

#### **6.1.1 Détection des anticorps anti-cytoplasme de polynucléaire neutrophile (ANCA).**

Les ANCA seront d'abord détectés par immunofluorescence indirecte sur des PNN étalés sur lame et fixés par l'éthanol. Après l'incubation des PNN avec le sérum de l'individu (dilué au 1/10), une série de 5 lavages au PBS a lieu et est suivie par une seconde incubation avec un anticorps secondaire anti-IgG couplé à un fluorochrome. Après une nouvelle série de lavages au PBS, la lame est lue au microscope à fluorescence. La présence d'ANCA dans le sérum se traduit par une fluorescence soit cytoplasmique, soit périnucléaire. Dans la quasi-totalité des cas, la présence d'ANCA anti-MPO dans le sérum s'associe à la détection d'ANCA de fluorescence périnucléaire (p-ANCA). Le titre des ANCA en immunofluorescence indirecte se détermine par dilutions successives.

#### **6.1.2 Recherche d'ANCA anti-MPO et détermination de leur titre.**

La recherche d'ANCA anti-MPO et la détermination de leur titre seront réalisées par technique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) grâce à des kits prévus à cet effet (Bio Advance, Emerainville, France). Les résultats seront interprétés en unités arbitraire (UA) /ml. Les concentrations inférieures à 20 AU/ml seront considérées comme négatives.

#### **6.1.3 Détermination de la production d'HOCl par la MPO.**

La production d'HOCl par la MPO sera déterminée selon la technique mise au point au laboratoire (7). La MPO purifiée (Calbiochem, San Diego, CA) qui présente une activité de 150-200 unités/mg de protéine sera diluée à la concentration de 2µg/ml de Dulbecco phosphate-buffered saline (PBS) (0.20 g/L KCl, 0.20 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 g/L NaCl, 1.15 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Elle sera ensuite coatée sur une plaque de microtitration de 96 puits (Data Packaging Corporation, MA, USA) la nuit à 4°C. Après 3 lavages au PBS, cent microlitres de sérums dilués au 1/10 seront déposés dans les puits de plaques de microtitration (Black Optiplat, Packard, Warrenville, Illinois, USA). La plaque sera ensuite incubée pendant 60 minutes à température ambiante. Après 5 lavages au PBS, 36 µM de luminol and 400 µM d'hydrogène peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Sigma) seront dilués dans le PBS et rajoutés dans chaque puits pour démarrer la réaction enzymatique. Après 5 minutes, la production d'HOCl est mesurée à 37°C par chemiluminescence grâce à un spectrofluorimètre / luminomètre

(Fusion, Packard, Warrenville, Illinois, USA) at 37°C. Des contrôles positifs et négatifs, les sérums de malades et de sujets sains sont testés par cette technique. La production d'HOCl est exprimée en UA.

#### **6.1.4 Détermination de l'activité enzymatique de la MPO.**

L'activité enzymatique de la MPO sera déterminée selon la technique mise au point au laboratoire (7). La MPO purifiée (Calbiochem, San Diego, CA) qui présente une activité de 150-200 unités/mg de protéine sera diluée à la concentration de 2µg/ml de Dulbecco phosphate-buffered saline (PBS) (0.20 g/L KCl, 0.20 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 g/L NaCl, 1.15 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Elle sera ensuite coâtée sur une plaque de microtitration de 96 puits (Data Packaging Corporation, MA, USA) la nuit à 4°C. Après 3 lavages au PBS, cent microlitres de sérums dilués au 1/10 seront déposés dans les puits de plaques de microtitration (Black Optiplat, Packard, Warrenville, Illinois, USA). La plaque sera ensuite incubée pendant 60 minutes à température ambiante. Après 5 lavages au PBS, 0.4 mg/l d'o-phenylenediamine (OPD) (Sigma Fast OPD, Sigma, St Louis, USA) et 11.7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) dilués dans 0.05 M citrate buffer (pH 5.0) seront rajoutés dans chaque puits pour démarrer la réaction enzymatique. A 60 minutes, la densité optique (DO) de chaque puits est lue à 450nm avec une longueur d'onde de référence de 620nm en utilisant un lecteur de plaque (Dynatec, Mountain View, CA). Des contrôles positifs et négatifs, les sérums de malades et de sujets sains sont testés par cette technique. L'activité enzymatique de la MPO est exprimée en UA.

#### **6.1.5 Détermination des taux sériques de MPO.**

Les concentrations sériques de MPO seront déterminées par technique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) grâce à des kits prévus à cet effet (Sigma) chez tous les individus testés et chez tous les sujets sains. Le seuil de sensibilité du dosage est supérieur à 1.5 ng/ml.

#### **6.1.6 Mesure de la concentration sérique de céruléoplasmine et mesure des taux sériques de Protéine C-Réactive (CRP).**

La concentration sérique de céruléoplasmine sera déterminée par immuno-néphélométrie (BNII, Dade-Behring, Paris La Défense, France). Les valeurs normales sont comprises entre 0.17 et 0.70 mg/l. Les taux sériques de CRP seront aussi déterminés par turbidimétrie (Roche)



### **6.1.7 Recueil des données cliniques.**

Les données cliniques des sujets malades (notamment le statut clinique de la MPA, selon les recommandations de l'EULAR (21)) qui sont à recueillir sont rassemblées dans la « fiche clinique » qui est indiquée en annexe 2. Les atteintes cliniques seront renseignées par les items du score BVAS (annexe 2).

### **6.1.8 Calcul des scores cliniques d'activité et de sévérité**

Les scores cliniques suivants seront également calculés (cf annexe 2):

- score de sévérité : (Five Factors Score) FFS (15)
- score d'activité (Birmingham Vasculitis Activity Score) : (20, 22 )

## **6.2 Analyse bénéfico-risque de la technique**

Il s'agit d'une étude qui vise à apporter de nouvelles connaissances scientifiques. Les risques sont négligeables et représentés seulement par ceux d'une ponction veineuse. Il n'y a pas de différence par rapport à la prise en charge habituelle du malade (2 tubes de sang « supplémentaires » à l'occasion d'un bilan biologique). La balance bénéfico/risque apparaît donc excellente.

## **7 Critères d'évaluation**

### **7.1 Critère principal :**

- valeur prédictive de la production d'HOCl sur le risque de rechute à un an, mesuré par un risque relatif.

### **7.2 Critères secondaires :**

- valeur prédictive de la production d'HOCl sur le risque de rechute à quatre mois, mesuré par un risque relatif.

- relation entre la production d'HOCl et le statut clinique (cf paragraphe 7.5), l'activité et la sévérité de la MPA évaluées par le BVAS et le FFS.

- relation entre le titre des ANCA anti-MPO et le statut clinique (cf paragraphe 7.5), l'activité et la sévérité de la MPA évaluées par le BVAS et le FFS.

- valeur prédictive de l'activité enzymatique de la MPO sur le risque de rechute.

- relation entre l'activité enzymatique de la MPO et le statut clinique (cf paragraphe 7.5), l'activité et la sévérité de la MPA évaluées par le BVAS et le FFS.

- relations entre les taux sériques de CRP, céruléoplasmine, MPO et l'activité et de la maladie.
- comparaison des productions d'HOCl entre les différents groupes d'individus (malades en poussée, malades en rémission, sujets sains).

### **7.3 Variables mesurées**

Les paramètres d'évaluation sont les suivants :

-paramètres cliniques (annexe 2): manifestations cliniques de la maladie, statut clinique de la MPA (selon les recommandations de l'EULAR (European League Against Rheumatism) (21); score de sévérité : (Five Factors Score) FFS (15) ; score d'activité BVAS (Birmingham Vasculitis Activity Score) (20, 22 ), pathologies associées et événements intercurrents, traitement(s) reçu(s).

- paramètres biologiques : titre des ANCA anti-MPO ; production d'HOCl par la MPO ; activité enzymatique de la MPO ; concentration sérique de MPO ; concentration sérique de Protéine C-Réactive (CRP) ; concentration sérique de céruléoplasmine.

Le recueil des paramètres cliniques se fera pendant la période de recueil (lors de chacune des trois visites) pour chaque patient alors que les dosages biologiques se feront après la période de recueil et les trois visites pour l'ensemble des individus. Ainsi, les résultats biologiques ne seront pas connus lorsque les données cliniques seront recueillies.

### **7.4 Calendriers des évaluations dans les différents groupes**

La méthodologie de l'étude est schématiquement représentée dans la Figure 1. Chez les malades, trois prélèvements sanguins successifs à l'occasion de trois visites successives (inclusion, 4<sup>ème</sup> mois (+/- 1 mois) puis 12<sup>ème</sup> mois) seront effectués. Une fois prélevés, les tubes de sang sont centrifugés (10 minutes à 1 800 tours / mn) puis le sérum obtenu par centrifugation du sang périphérique sera stocké à - 80 °C dans le service hospitalier qui a inclus les patients avant d'être acheminé et conservé à - 80°C dans la sérothèque du Pôle de Médecine Interne de l'Hôpital Cochin, sous la responsabilité du Dr-Philippe Guilpain. L'envoi vers l'hôpital Cochin se fera de façon différée (dans de la carboglace).

Deux transports sont prévus : le premier acheminement des prélèvements des centres vers l'hôpital Cochin aura lieu à la fin de la première année de suivi de l'étude et le second au bout des 2 ans d'étude, soit en fin d'étude.

Les dosages biologiques seront effectués lorsque l'ensemble des prélèvements prévus aura été réalisé pour l'ensemble des individus. Les données cliniques seront recueillies à chaque visite. Les résultats des dosages biologiques et les données cliniques seront analysés dans un dernier temps.

## **7.5 Définitions du statut clinique**

Les définitions suivantes sont les définitions de la société savante européenne EULAR (EUropean League Against Rheumatism) (21) et s'appliquent au statut clinique des patients et à la réponse au traitement.

### **7.5.1 Activité de la MPA**

L'activité de la maladie est définie par le score de BVAS (BVAS 2003) (20-22) (annexe 2). Une maladie est considérée comme « active » lorsque le BVAS >3.

### **7.5.2 Rémission**

Une « rémission » est définie par l'absence d'activité de la maladie. Le maintien d'une faible dose de glucocorticoïdes n'exclut pas le terme de « rémission » qui est applicable chez les patients recevant de faibles doses de glucocorticoïdes.

### **7.5.3 Réponse**

Une réduction de 50% de l'activité de la maladie en l'absence de nouvelles manifestations définit une « réponse ».

### **7.5.4 Poussées et Rechutes**

Une « poussée » correspond soit à l'apparition pour la première fois de manifestations de MPA qui conduisent au diagnostic de la maladie soit à la survenue d'une rechute.

Une « rechute » est définie comme la réapparition d'une activité de la maladie (c'est à dire : réapparition d'anciennes manifestations ou apparition de nouvelles manifestations). La rechute est qualifiée de « rechute majeure » si la maladie met en jeu le pronostic fonctionnel d'un organe ou le pronostic vital et ne peut être traitée par une simple augmentation de la dose de

glucocorticoïdes et nécessite une escalade thérapeutique (traitement immunosuppresseur par exemple). La rechute est qualifiée de « rechute mineure » dans les autres cas.

#### **7.5.5 « Maladie Réfractaire »**

Une « maladie réfractaire » est définie par :

- une activité de la maladie augmentée ou inchangée, à la phase aiguë, après quatre semaines de traitement avec une thérapeutique standard

ou

- par l'absence de réponse au traitement (< ou = 50% de réduction de l'activité de la maladie après 6 semaines de traitement)

ou

- une maladie persistante et chronique définie par la présence de 1 critère majeur ou de 3 critères mineurs du BVAS après 12 mois de traitement.

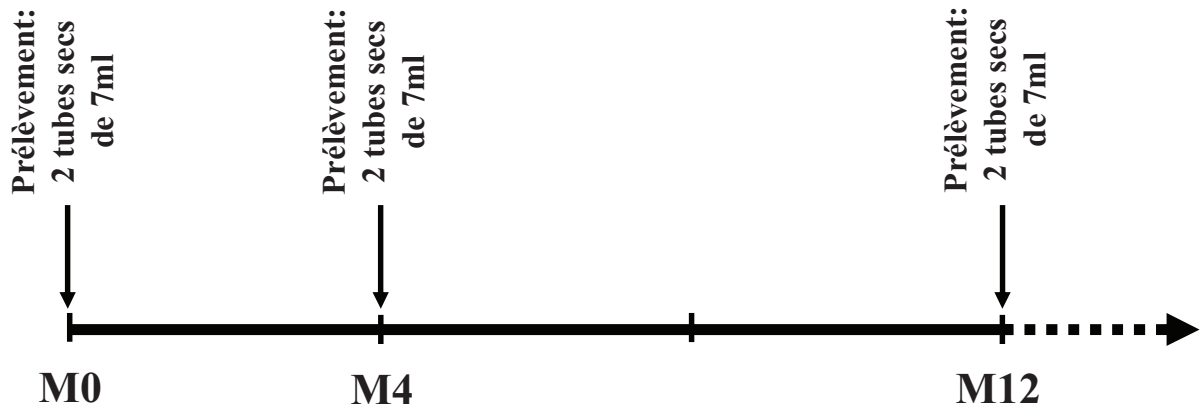
#### **7.5.6 L'état de « faible activité de la MPA »**

L'état de « faible activité de la MPA » correspond à la persistance de symptômes mineurs (comme les arthralgies et les myalgies) qui répondent à une augmentation modeste de la dose de glucocorticoïdes, sans escalade thérapeutique.

#### **7.5.7 Five factor Score**

Le Five Factor Score (FFS) est un score de sévérité des vascularites et comprend les 5 paramètres suivants: protéinurie >1gr/jour (1 point), insuffisance rénale - créatininémie >140 µmol/l ou 1.58 mg/dl (1 point), cardiomyopathie spécifique (1 point), atteinte gastro-intestinale (1 point), atteinte du système nerveux central (1 point). En additionnant les points, on calcule le FFS. Un FFS > ou = 1 définit une maladie sévère (15).

**Figure 1. Présentation schématique de la méthodologie.**



Poussée de MPA  
(diagnostic ou rechute)

**A CHACUN DES 3 PRÉLÈVEMENTS**

- Dosage des ANCA anti-MPO
- Détermination de la production d'HOCl par la MPO
- Détermination de l'activité enzymatique de la MPO.
- Détermination des taux sériques de MPO.
- Mesure de la concentration sérique de céruléoplasmine et des taux sériques de CRP
- Recueil des données cliniques et calcul du BVAS et du FFS

## 8 Evaluation de la sécurité

S'agissant d'une étude non interventionnelle, avec constitution de collection biologique dans le cadre du soin habituel du patient, **aucun événement indésirable grave** n'est attendu comme lié à la recherche.

## 9 Gestion des données et statistique

### 9.1 Stratégie d'analyse des données collectées

L'ensemble de l'analyse sera conduit par le Pr COSTES (Service de Biostatistiques et Informatique médicale, Hôpital Cochin).

### **9.1.1 Description des méthodes statistiques prévues**

La comparaison des variables quantitatives utilisera les tests de Student ou de Wilcoxon-Mann-Whitney, si nécessaire. Des ANOVA (après transformation des variables non gaussiennes) seront également envisagés. La comparaison des variables quantitatives utilisera les tests du Chi-deux ou de Fischer, si nécessaire.

En présence de données censurées, des courbes de Kaplan-Meier et des tests du log-rank seront utilisés.

Des ajustements seront également envisagés (sur l'âge, le sexe, les concentrations sériques de MPO, etc...) : des modèles linéaires, logistiques ou de Cox seront employés.

La détermination de seuils optimaux (notamment pour la production d'HOCl à l'inclusion au regard du devenir des patients) utilisera la courbe ROC et l'indice de Youden.

La corrélation entre des variables quantitatives sera mesurée par le coefficient de corrélation de Pearson.

### **9.1.2 Nombre prévu de personne à inclure dans la recherche avec sa justification statistique**

Le protocole prévoit l'inclusion de 50 cas (assortis à 50 témoins). Partant de l'hypothèse selon laquelle un tiers des cas présenteront un rechute au bout d'un an, l'inclusion des 50 cas assure une puissance de 80% (pour un test bilatéral à 5%), si le seuil optimal est la médiane et que le risque relatif de rechute à un an associé au groupe de patients présentant les plus fortes production d'HOCl à l'inclusion est 4. De même, ce nombre de sujets assure une puissance de 80% si le seuil optimal est le 2ème tertile et que le risque relatif associé au groupe de patients présentant les plus fortes productions d'HOCl à l'inclusion est 6. (Ces calculs sont valables pour un test du log-rank, avec au plus 10% de perdus de vue à un an).

### **9.1.3 Degré de signification prévu**

Les tests, bilatéraux, seront réalisés au niveau de confiance de 5%.

### **9.1.4 Critères statistiques d'arrêt de la recherche**

Sans objet.

### **9.1.5 Méthode de prise en compte des données manquantes, inutilisées ou non valides**

Des analyses de sensibilité aux données manquantes seront réalisées. Par ailleurs, des modèles adaptés aux données censurées seront utilisés.

### **9.1.6 Gestion des modifications apportées au plan statistique initial**

Sans objet

### **9.1.7 Choix des personnes à inclure dans les analyses**

Toutes les personnes incluses seront considérés dans l'analyse (voir 9.5).

## **10 Considérations réglementaires**

### ***10.1. Textes en vigueur***

L'étude est non interventionnelle avec une collection biologique. Elle sera conduite conformément :

- à la loi n°2004-800 du 06 août 2004 relative à la bioéthique
- à la loi n°2004-801 du 06 août 2004 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés
- au décret n°2007-1220 du 10 août 2007 relatif au prélèvement, à la conservation et à la préparation à des fins scientifiques d'éléments du corps humain et modifiant le code de la santé publique (dispositions réglementaires)

### ***10.2. Demande d'autorisation auprès du Comité de Protection des Personnes***

L'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris est le gestionnaire de cette recherche conformément au 1° alinéa de l'article L.1121-1 du Code de la Santé Publique. Le DRCD en est le représentant. En accord avec l'article L.1123-6 du Code de la Santé, le protocole de recherche et la déclaration de la collection biologique sera soumis au Comité de Protection des Personnes d'Ile de France III par le gestionnaire de l'étude. L'avis de ce comité sera notifié dans le formulaire adressé au gestionnaire de l'étude avant le démarrage de la recherche. L'avis de ce comité sera ensuite notifié lors de la déclaration de ces collections biologiques par le gestionnaire au Ministère de la Recherche.

### ***10.3. Déclaration au ministère de la recherche et à l'Agence Régionale de l'Hospitalisation (ARH)***

Un dossier de déclaration de la collection biologique fixé par l'arrêté du 16 août 2007, sera complété et envoyé au Ministère de la Recherche et à l'ARH Ile De France conformément au décret n°2007-1220 du 10 août 2007.

### ***10.4. Modifications***

L'Unité de Recherche Clinique Paris Centre doit être informée de tout projet de modification du protocole par l'investigateur coordonnateur.

Après le commencement de la recherche, toute modification substantielle de celle-ci à l'initiative du gestionnaire doit obtenir, préalablement à sa mise en œuvre, un avis favorable du CPP et doit être notifiée au Ministère de la Recherche, à l'ARH et à la CNIL.

### ***10.5. Aspect légal***

Avant de démarrer la recherche, chaque investigateur fournira au gestionnaire de la recherche une copie de son curriculum vitæ personnel, daté et signé, comportant son numéro d'inscription à l'Ordre des Médecins et son numéro ADELI.

### ***10.6. Demande d'autorisation auprès de la 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. Cette recherche fera l'objet d'une demande d'autorisation unitaire, conformément à la loi n°2004-801 du 06 août 2004.

Un dossier sera complété et envoyé au Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de Recherche dans le domaine de la Santé (CCTIRS). Après autorisation de leur part, un dossier sera complété et envoyé à la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL).

### ***10.7 Note d'information et Consentement éclairé***

Une information de la participation à cette étude sera fournie à tous les patients inclus et un consentement sera recueilli.

Plusieurs modèles de notes d'information et de consentement sont prévus :

- une note d'information et un consentement pour les sujets sains



- trois notes d'information et formulaires de consentement pour les sujets malades : pour les patients prospectifs, pour les patients partiellement rétrospectifs et pour les patients totalement rétrospectifs.

Le consentement éclairé sera recueilli le jour même de l'inclusion. Le formulaire de consentement sera signé en trois exemplaires par les patients et le médecin investigateur. Une copie de ce document sera remise au patient; l'investigateur devra garder l'exemplaire original dans ses archives pendant un minimum de 15 ans et le troisième exemplaire sera pour le gestionnaire de la recherche.

## **11 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 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.

## **12 Contrôle et assurance de la qualité**

Le déroulement de la recherche sera encadré selon les procédures opératoires standard du gestionnaire AP-HP représenté par le DRCD.

La prise en charge des personnes dans les centres participants sera faite conformément à la déontologie, aux recommandations médicales et conformément à la déclaration d'Helsinki (Annexe 3).

Les investigateurs de chaque centre s'engagent à recevoir les représentants nommés par l'AP-HP pour le contrôle de qualité et les visites de conformité, le cas échéant.

### ***12.1. Procédures de monitoring***

L'attaché de recherche clinique de l'URC Paris centre effectuera 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 A qui a été attribué au protocole.

D'abord, avant le début des inclusions, pour une ouverture de chaque centre avec mise en place du protocole et prise de connaissance avec les investigateurs.

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 ARCs de l'URC Paris centre qui en contrôleront le bon remplissage. L'investigateur principal de chaque centre et ses collaborateurs qui incluent ou suivent des sujets participant à la recherche acceptent de recevoir ces personnes à intervalles réguliers.

### ***12.2. Transcription des données dans le cahier d'observation***

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 sains sera assuré par un code numérique (« code don » attribué par l'EFS).

L'anonymat des sujets malades sera assuré par un code alphanumérique à 6 caractères, comportant le numéro du centre, le numéro du patient dans le centre et au maximum la première lettre du nom et la première lettre du prénom du sujet sur tous les documents nécessaires à la recherche, ou par effacement par les moyens appropriés (blanc correcteur...) 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.

## **13 Archivage dans les centres investigateurs**

Les documents d'une recherche entrant dans le cadre de la loi sur les recherches biomédicales doivent être archivés par l'investigateur pendant une durée de 15 ans après la fin de la recherche.

Cet archivage indexé comporte :

- les versions successives du protocole (identifiées par le n° de version et la date de la version),
- chez l'investigateur coordonnateur : le dossier et courriers de correspondance avec le CPP (y compris les amendements),
- les courriers de correspondance avec le promoteur,
- les consentements signés des sujets sous pli cacheté 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

## **14 Rapports et publications**

### ***14.1. 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 après la fin effective de la recherche.

Un rapport rédigé doit être transmis au Comité et à l'autorité compétente 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.

### ***14.2. Publications et propriétés des données***

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

L'AP-HP doit être mentionnée comme étant le gestionnaire de la recherche et comme soutien financier, le cas échéant. Les termes « Assistance Publique- Hôpitaux de Paris » doivent apparaître dans l'adresse des auteurs. L'Unité de Recherche Clinique Paris Centre sera citée dans les remerciements.

## 15 Références bibliographiques

1. Guilpain P, Chauseaud Y, Tamby MC, et al. [Pathogenesis of primary systemic vasculitides (I): ANCA-positive vasculitides]. *Presse Med.* 2005;34(14):1013-22.
2. Guilpain P, Guillevin L, Mouthon L. [New insights into the pathogenesis of ANCA-positive vasculitides]. *Presse Med.* 2007;36(5 Pt 2):854-9.
3. Falk RJ, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med.* 1988;318(25):1651-7.
4. Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, et al. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum.* 1994;37(2):187-92.
5. Woywodt A, Streiber F, de Groot K, Regelsberger H, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis. *Lancet.* 2003;361(9353):206-10.
6. Xiao H, Heeringa P, Hu P, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J Clin Invest.* 2002;110(7):955-63.
7. Guilpain P, Servettaz A, Goulvestre C, et al. Pathogenic effects of antimyeloperoxidase antibodies in patients with microscopic polyangiitis. *Arthritis Rheum.* 2007;56(7):2455-63.
8. Lightfoot RW, Jr., Michel BA, Bloch DA, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of polyarteritis nodosa. *Arthritis Rheum.* 1990;33(8):1088-93.
9. Pagnoux C, Guilpain P, Guillevin L. [Microscopic polyangiitis]. *Presse Med.* 2007;36(5 Pt 2):895-901.
10. Mahr A, Guillevin L, Poissonnet M, Ayme S. Prevalences of polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis, Wegener's granulomatosis, and Churg-Strauss syndrome in a French urban multiethnic population in 2000: a capture-recapture estimate. *Arthritis Rheum.* 2004;51(1):92-9.
11. Guillevin L, Durand-Gasselin B, Cevallos R, et al. Microscopic polyangiitis: clinical and laboratory findings in eighty-five patients. *Arthritis Rheum.* 1999;42(3):421-30.
12. Hogan SL, Nachman PH, Wilkman AS, Jennette JC, Falk RJ. Prognostic markers in patients with antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated microscopic polyangiitis and glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 1996;7(1):23-32.
13. Kapitsinou PP, Ioannidis JP, Boletis JN, et al. Clinicopathologic predictors of death and ESRD in patients with pauci-immune necrotizing glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis.* 2003;41(1):29-37.

14. Zauner I, Bach D, Braun N, et al. Predictive value of initial histology and effect of plasmapheresis on long-term prognosis of rapidly progressive glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis.* 2002;39(1):28-35.
15. Guillevin L, Lhote F, Gayraud M, et al. Prognostic factors in polyarteritis nodosa and Churg-Strauss syndrome. A prospective study in 342 patients. *Medicine (Baltimore).* 1996;75(1):17-28.
16. Eschun GM, Mink SN, Sharma S. Pulmonary interstitial fibrosis as a presenting manifestation in perinuclear antineutrophilic cytoplasmic antibody microscopic polyangiitis. *Chest.* 2003;123(1):297-301.
17. Homma S, Matsushita H, Nakata K. Pulmonary fibrosis in myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides. *Respirology.* 2004;9(2):190-6.
18. Caster JC, Shetlar DJ, Pappolla MA, Yee RW. Microscopic polyangiitis with ocular involvement. *Arch Ophthalmol.* 1996;114(3):346-8.
19. Jennette JC, Wilkman AS, Falk RJ. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and vasculitis. *Am J Pathol.* 1989;135(5):921-30.
20. Luqmani RA, Bacon PA, Moots RJ, et al. Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in systemic necrotizing vasculitis. *Qjm.* 1994;87(11):671-8.
21. Hellmich B, Flossmann O, Gross WL, et al. EULAR recommendations for conducting clinical studies and/or clinical trials in systemic vasculitis: focus on anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(5):605-17.
22. Flossmann O, Bacon P, de Groot K, et al. Development of comprehensive disease assessment in systemic vasculitis. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(3):283-92.
23. Savage CO, Winearls CG, Evans DJ, Rees AJ, Lockwood CM. Microscopic polyarteritis: presentation, pathology and prognosis. *Q J Med.* 1985;56(220):467-83.
24. Gordon M, Luqmani RA, Adu D, et al. Relapses in patients with a systemic vasculitis. *Q J Med.* 1993;86(12):779-89.
25. Lauque D, Cadranet J, Lazor R, et al. Microscopic polyangiitis with alveolar hemorrhage. A study of 29 cases and review of the literature. Groupe d'Etudes et de Recherche sur les Maladies "Orphelines" Pulmonaires (GERM"O"P). *Medicine (Baltimore).* 2000;79(4):222-33.
26. Gayraud M, Guillevin L, le Toumelin P, et al. Long-term followup of polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis, and Churg-Strauss syndrome: analysis of four prospective trials including 278 patients. *Arthritis Rheum.* 2001;44(3):666-75.
27. Guillevin L, Cohen P, Mahr A, et al. Treatment of polyarteritis nodosa and microscopic polyangiitis with poor prognosis factors: a prospective trial comparing glucocorticoids and six or twelve cyclophosphamide pulses in sixty-five patients. *Arthritis Rheum.* 2003;49(1):93-100.
28. Jayne D, Rasmussen N, Andrassy K, et al. A randomized trial of maintenance therapy for vasculitis associated with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *N Engl J Med.* 2003;349(1):36-44.

29. Guillevin L, Pagnoux C. Indications of plasma exchanges for systemic vasculitides. *Ther Apher Dial.* 2003;7(2):155-60.
30. Jayne D. How to induce remission in primary systemic vasculitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2005;19(2):293-305.
31. Boehme MW, Schmitt WH, Youinou P, Stremmel WR, Gross WL. Clinical relevance of elevated serum thrombomodulin and soluble E-selectin in patients with Wegener's granulomatosis and other systemic vasculitides. *Am J Med.* 1996;101(4):387-94.
32. Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(11):4115-9.
33. Yang JJ, Kettritz R, Falk RJ, Jennette JC, Gaido ML. Apoptosis of endothelial cells induced by the neutrophil serine proteases proteinase 3 and elastase. *Am J Pathol.* 1996;149(5):1617-26.
34. Yang JJ, Preston GA, Pendergraft WF, et al. Internalization of proteinase 3 is concomitant with endothelial cell apoptosis and internalization of myeloperoxidase with generation of intracellular oxidants. *Am J Pathol.* 2001;158(2):581-92.
35. Radford DJ, Luu NT, Hewins P, Nash GB, Savage CO. Antineutrophil cytoplasmic antibodies stabilize adhesion and promote migration of flowing neutrophils on endothelial cells. *Arthritis Rheum.* 2001;44(12):2851-61.
36. Xiao H, Heeringa P, Liu Z, et al. The role of neutrophils in the induction of glomerulonephritis by anti-myeloperoxidase antibodies. *Am J Pathol.* 2005;167(1):39-45.
37. Huugen D, Xiao H, van Esch A, et al. Aggravation of anti-myeloperoxidase antibody-induced glomerulonephritis by bacterial lipopolysaccharide: role of tumor necrosis factor-alpha. *Am J Pathol.* 2005;167(1):47-58.
38. Bansal PJ, Tobin MC. Neonatal microscopic polyangiitis secondary to transfer of maternal myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody resulting in neonatal pulmonary hemorrhage and renal involvement. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2004;93(4):398-401.
39. Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today.* 1993;14(9):426-30.
40. Kettle AJ, Gedye CA, Winterbourn CC. Superoxide is an antagonist of antiinflammatory drugs that inhibit hypochlorous acid production by myeloperoxidase. *Biochem Pharmacol.* 1993;45(10):2003-10.
41. Gaskin G, Savage CO, Ryan JJ, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and disease activity during long-term follow-up of 70 patients with systemic vasculitis. *Nephrol Dial Transplant.* 1991;6(10):689-94.
42. De'Oliviera J, Gaskin G, Dash A, Rees AJ, Pusey CD. Relationship between disease activity and anti-neutrophil cytoplasmic antibody concentration in long-term management of systemic vasculitis. *Am J Kidney Dis.* 1995;25(3):380-9.

43. Ara J, Mirapeix E, Rodriguez R, Saurina A, Darnell A. Relationship between ANCA and disease activity in small vessel vasculitis patients with anti-MPO ANCA. *Nephrol Dial Transplant.* 1999;14(7):1667-72.

44. Pettersson E, Heigl Z. Antineutrophil cytoplasmic antibody (cANCA and pANCA) titers in relation to disease activity in patients with necrotizing vasculitis: a longitudinal study. *Clin Nephrol.* 1992;37(5):219-28.



## Annexe 1

**Définition de la Polyangéite Microscopique selon la conférence de consensus pour la nomenclature des vascularites systémiques à Chapel Hill ; Caroline du Nord, USA, 1993 (4)**

### ***Polyangéite microscopique \* \****

*Vascularite nécrosante*

*Avec peu ou sans dépôts immuns*

*Affectant les petits vaisseaux (capillaires, veinules, artérioles).*

---

**\*\* Peut atteindre les artères de petit et moyen calibre.**

***Glomérulonéphrite nécrosante très fréquente.***

***Capillarite pulmonaire fréquemment observée.***

## Annexe 2. BVAS (2003)

### BVAS 2003 – VASCULITIS ACTIVITY SCORE 2003

**TOTAL**

*Ne cocher que les manifestations témoignant d'une maladie active (les séquelles présentes depuis plus de 3 mois sont appréciées par le VDI). Si toutes les manifestations représentent une maladie chronique active, mais faiblement (smoldering/grumbling disease) et qu'il n'y aucune manifestation nouvelle récente ou d'aggravation franche, cocher la case dans le coin en bas à droite. Les scores indiqués sont ceux pour une maladie active récemment / maladie faiblement active, « grumbling » (case du bas cochée).*

	Oui
<b>1. Signes généraux</b>	<input type="checkbox"/> (maximum 3)
Myalgies	<input type="checkbox"/> 1
Arthralgies ou arthrites	<input type="checkbox"/> 1
Fièvre ? 38°C	<input type="checkbox"/> 2
Amaigrissement ? 2 kg	<input type="checkbox"/> 2
<b>2. Signes cutanés</b>	<input type="checkbox"/> (maximum 6)
Nécrose	<input type="checkbox"/> 2
Purpura	<input type="checkbox"/> 2
Ulcération(s)	<input type="checkbox"/> 4
Gangrène	<input type="checkbox"/> 6
Autre(s) lésion(s) liée(s) à la vascularite	<input type="checkbox"/> 2
<b>3. Atteintes muqueuses et oculaires</b>	<input type="checkbox"/> (maximum 6)
Ulcération buccale / granulome	<input type="checkbox"/> 2
Ulcération génitale	<input type="checkbox"/> 1
Inflammation lacrymale ou salivaire	<input type="checkbox"/> 4
Exophtalmie	<input type="checkbox"/> 4
Episclérite	<input type="checkbox"/> 2
IConjonctivite / blépharite / kératite	<input type="checkbox"/> 1
Baisse progressive d'acuité visuelle / vue trouble	<input type="checkbox"/> 3
Baisse brutale d'acuité visuelle / cécité	<input type="checkbox"/> 6
Uvéite	<input type="checkbox"/> 6
Vascularite rétinienne	<input type="checkbox"/> 6
Thrombose / hémorragie / exsudats rétinien	<input type="checkbox"/>
<b>4. Signes ORL</b>	<input type="checkbox"/> (maximum 6)
Epistaxis / croûtes nasales / ulcération ou granulome nasal	<input type="checkbox"/> 6
Sinusite	<input type="checkbox"/> 2
Sténose sous-glottique	<input type="checkbox"/> 6
Baisse d'audition de transmission (conduction)	<input type="checkbox"/> 3
Baisse d'audition de perception (sensorielle)	<input type="checkbox"/> 6
<b>5. Signes pulmonaires</b>	<input type="checkbox"/> (maximum 6)
Wheezing / sibilants	<input type="checkbox"/> 2
Nodule(s) / Nodule(s) excavé(s)	<input type="checkbox"/> 3
Epanchement pleural	<input type="checkbox"/> 4
Infiltrat pulmonaire radiologique	<input type="checkbox"/> 4
Sténose endobronchique	<input type="checkbox"/> 4
Hémorragie intra-alvéolaire	<input type="checkbox"/> 6
Détresse respiratoire	<input type="checkbox"/> 6

	Oui
<b>6. Signes cardiaques</b>	<input type="checkbox"/> (maximum 6)
Disparition d'un pouls	<input type="checkbox"/> 4
Atteinte valvulaire	<input type="checkbox"/> 4
Péricardite	<input type="checkbox"/> 3
Angor	<input type="checkbox"/> 4
Cardiomyopathie	<input type="checkbox"/> 6
Insuffisance cardiaque congestive	<input type="checkbox"/> 6
<b>7. Atteinte digestive</b>	<input type="checkbox"/> (maximum 9)
Péritonite	<input type="checkbox"/> 9
Diarrhée sanglante	<input type="checkbox"/> 9
Douleur abdominale (angor digestif)	<input type="checkbox"/> 2
<b>8. Signes pulmonaires</b>	<input type="checkbox"/> (maximum 12)
HTA	<input type="checkbox"/> 4
Protéinurie > 1 +	<input type="checkbox"/> 4
Hématurie > 10 GR / champ	<input type="checkbox"/> 6
Créatininémie 125–249 µmol/l	<input type="checkbox"/> 4
Créatininémie 250–499 µmol/l	<input type="checkbox"/> 6
Créatininémie > 500 µmol/l	<input type="checkbox"/> 8
Augmentation de la Créatininémie > 30% ou diminution de la clairance de la créatinine > 25%	<input type="checkbox"/> 6
<b>9. Atteinte neurologique</b>	<input type="checkbox"/> (maximum 9)
Céphalées	<input type="checkbox"/> 1
Méningite	<input type="checkbox"/> 3
Confusion, trouble de la conscience	<input type="checkbox"/> 3
Convulsions (non liées à l'HTA)	<input type="checkbox"/> 9
Atteinte médullaire (myélite)	<input type="checkbox"/> 9
Accident vasculaire cérébral	<input type="checkbox"/> 9
Atteinte de(s) paire(s) crânienne(s)	<input type="checkbox"/> 6
Neuropathie périphérique sensitive	<input type="checkbox"/> 6
Neuropathie périphérique motrice	<input type="checkbox"/> 9
<b>10. Autre atteinte spécifique</b>	<input type="checkbox"/>
Préciser : .....	
.....	
.....	
.....	

COCHER CETTE CASE SI **TOUTES** LES ATTEINTES NOTEES SONT ANCIENNES ET PERSISTANTES, et non récentes ou aggravées

### **Annexe 3. Déclaration d'HELSINKI de l'Association Médicale Mondiale**

Principes éthiques applicables aux recherches médicales sur des sujets humains; adoptée par la 18e Assemblée générale, Helsinki, Juin 1964 et amendée par les 29e Assemblée générale, Tokyo, Octobre 1975 35e Assemblée générale, Venise, Octobre 1983 41e Assemblée générale, Hong Kong, Septembre 1989 48e Assemblée générale, Somerset West (Afrique du Sud), Octobre 1996 et la 52e Assemblée générale, Edimbourg, Octobre 2000

#### **A. INTRODUCTION**

1. La Déclaration d'Helsinki, élaborée par l'Association médicale mondiale, constitue une déclaration de principes éthiques dont l'objectif est de fournir des recommandations aux médecins et autres participants à la recherche médicale sur des êtres humains. Celle-ci comprend également les études réalisées sur des données à caractère personnel ou des échantillons biologiques non anonymes.
2. La mission du médecin est de promouvoir et de préserver la santé de l'être humain. Il exerce ce devoir dans la plénitude de son savoir et de sa conscience.
3. Le Serment de Genève de l'Association médicale mondiale lie le médecin dans les termes suivants : "La santé de mon patient sera mon premier souci" et le Code international d'éthique médicale énonce que "le médecin devra agir uniquement dans l'intérêt de son patient lorsqu'il lui procure des soins qui peuvent avoir pour conséquence un affaiblissement de sa condition physique ou mentale".
4. Les progrès de la médecine sont fondés sur des recherches qui, in fine, peuvent imposer de recourir à l'expérimentation humaine.
5. Dans la recherche médicale sur les sujets humains, les intérêts de la science et de la société ne doivent jamais prévaloir sur le bien-être du sujet.
6. L'objectif essentiel de la recherche médicale sur des sujets humains doit être l'amélioration des méthodes diagnostiques, thérapeutiques et de prévention, ainsi que la compréhension des causes et des mécanismes des maladies. Les méthodes diagnostiques, thérapeutiques et de prévention, même les plus éprouvées, doivent constamment être remises en question par des recherches portant sur leur efficacité, leur efficience et leur accessibilité.
7. Dans la recherche médicale comme dans la pratique médicale courante, la mise en œuvre de la plupart des méthodes diagnostiques, thérapeutiques et de prévention expose à des risques et à des contraintes.
8. La recherche médicale est soumise à des normes éthiques qui visent à garantir le respect de tous les êtres humains et la protection de leur santé et de leurs droits. Certaines catégories de sujets sont plus vulnérables que d'autres et appellent une protection adaptée. Les besoins spécifiques des sujets défavorisés au plan économique comme au plan médical doivent être identifiés. Une attention particulière doit être portée aux personnes qui ne sont pas en mesure de donner ou de refuser elles-mêmes leur consentement, à celles qui sont susceptibles de donner leur consentement sous la contrainte, à celles qui ne bénéficieront pas personnellement de la recherche et à celles pour lesquelles la recherche est conduite au cours d'un traitement.

9. L'investigateur doit être attentif aux dispositions éthiques, légales et réglementaires applicables à la recherche sur les sujets humains dans son propre pays ainsi qu'aux règles internationales applicables. Aucune disposition nationale d'ordre éthique, légal et réglementaire ne doit conduire à affaiblir ou supprimer les mesures protectrices énoncées dans la présente déclaration.

## **B. PRINCIPES FONDAMENTAUX APPLICABLES A TOUTE FORME DE RECHERCHE MEDICALE**

10. Dans la recherche médicale, le devoir du médecin est de protéger la vie, la santé, la dignité et l'intimité de la personne.
11. La recherche médicale sur des êtres humains doit se conformer aux principes scientifiques généralement reconnus. Elle doit se fonder sur une connaissance approfondie de la littérature scientifique et des autres sources pertinentes d'information ainsi que sur une expérimentation appropriée réalisée en laboratoire et, le cas échéant, sur l'animal.
12. Des précautions particulières doivent entourer les recherches pouvant porter atteinte à l'environnement et le bien-être des animaux utilisés au cours des recherches doit être préservé.
13. La conception et l'exécution de chaque phase de l'expérimentation sur des sujets humains doivent être clairement définies dans un protocole expérimental. Ce protocole doit être soumis pour examen, commentaires, avis et, le cas échéant, pour approbation, à un comité d'éthique mis en place à cet effet. Ce comité doit être indépendant du promoteur, de l'investigateur ou de toute autre forme d'influence indue. Il doit respecter les lois et règlements en vigueur dans le pays où s'effectuent les recherches. Il a le droit de suivre le déroulement des études en cours. L'investigateur a l'obligation de fournir au comité des informations sur le déroulement de l'étude portant en particulier sur la survenue d'événements indésirables d'une certaine gravité. L'investigateur doit également communiquer au comité, pour examen, les informations relatives au financement, aux promoteurs, à toute appartenance à une ou des institutions, aux éventuels conflits d'intérêt ainsi qu'aux moyens d'inciter des personnes à participer à une recherche.
14. Le protocole de la recherche doit contenir une déclaration sur les implications éthiques de cette recherche. Il doit préciser que les principes énoncés dans la présente déclaration sont respectés.
15. Les études sur l'être humain doivent être conduites par des personnes scientifiquement qualifiées et sous le contrôle d'un médecin compétent. La responsabilité à l'égard d'un sujet inclus dans une recherche doit toujours incomber à une personne médicalement qualifiée et non au sujet, même consentant.
16. Toute étude doit être précédée d'une évaluation soigneuse du rapport entre d'une part, les risques et les contraintes et d'autre part, les avantages prévisibles pour le sujet ou d'autres personnes. Cela n'empêche pas la participation à des recherches médicales de volontaires sains. Le plan de toutes les études doit être accessible.
17. Un médecin ne doit entreprendre une étude que s'il estime que les risques sont correctement évalués et qu'ils peuvent être contrôlés de manière satisfaisante. Il doit être mis un terme à la recherche si les risques se révèlent l'emporter sur les bénéfices escomptés ou si des preuves consistantes de résultats positifs et bénéfiques sont apportées.
18. Une étude ne peut être réalisée que si l'importance de l'objectif recherché prévaut sur les contraintes et les risques encourus par le sujet. C'est particulièrement le cas lorsqu'il s'agit d'un volontaire sain.
19. Une recherche médicale sur des êtres humains n'est légitime que si les populations au sein desquelles elle est menée ont des chances réelles de bénéficier des résultats obtenus.

20. Les sujets se prêtant à des recherches médicales doivent être des volontaires informés des modalités de leur participation au projet de recherche.
21. Le droit du sujet à la protection de son intégrité doit toujours être respecté. Toutes précautions doivent être prises pour respecter la vie privée du sujet, la confidentialité des données le concernant et limiter les répercussions de l'étude sur son équilibre physique et psychologique.
22. Lors de toute étude, la personne se prêtant à la recherche doit être informée de manière appropriée des objectifs, méthodes, financement, conflits d'intérêts éventuels, appartenance de l'investigateur à une ou des institutions, bénéfices attendus ainsi que des risques potentiels de l'étude et des contraintes qui pourraient en résulter pour elle. Le sujet doit être informé qu'il a la faculté de ne pas participer à l'étude et qu'il est libre de revenir à tout moment sur son consentement sans crainte de préjudice. Après s'être assuré de la bonne compréhension par le sujet de l'information donnée, le médecin doit obtenir son consentement libre et éclairé, de préférence par écrit. Lorsque le consentement ne peut être obtenu sous forme écrite, la procédure de recueil doit être formellement explicitée et reposer sur l'intervention de témoins.
23. Lorsqu'il sollicite le consentement éclairé d'une personne à un projet de recherche, l'investigateur doit être particulièrement prudent si le sujet se trouve vis-à-vis de lui dans une situation de dépendance ou est exposé à donner son consentement sous une forme de contrainte. Il est alors souhaitable que le consentement soit sollicité par un médecin bien informé de l'étude mais n'y prenant pas part et non concerné par la relation sujet-investigateur.
24. Lorsque le sujet pressenti est juridiquement incapable, physiquement ou mentalement hors d'état de donner son consentement ou lorsqu'il s'agit d'un sujet mineur, l'investigateur doit obtenir le consentement éclairé du représentant légal en conformité avec le droit en vigueur. Ces personnes ne peuvent être incluses dans une étude que si celle-ci est indispensable à l'amélioration de la santé de la population à laquelle elles appartiennent et ne peut être réalisée sur des personnes aptes à donner un consentement.
25. Lorsque le sujet, bien que juridiquement incapable (un mineur par exemple), est cependant en mesure d'exprimer son accord à la participation à l'étude, l'investigateur doit obtenir que cet accord accompagne celui du représentant légal.
26. La recherche sur des personnes dont il est impossible d'obtenir le consentement éclairé, même sous forme de procuration ou d'expression préalable d'un accord, ne doit être conduite que si l'état physique ou mental qui fait obstacle à l'obtention de ce consentement est une des caractéristiques requises des sujets à inclure dans l'étude. Les raisons spécifiques d'inclure des sujets dans une étude en dépit de leur incapacité à donner un consentement éclairé doivent être exposées dans le protocole qui sera soumis au comité pour examen et approbation. Le protocole doit également préciser que le consentement du sujet ou de son représentant légal à maintenir sa participation à l'étude doit être obtenu le plus rapidement possible.
27. Les auteurs et les éditeurs de publications scientifiques ont des obligations d'ordre éthique. Lors de la publication des résultats d'une étude, les investigateurs doivent veiller à l'exactitude des résultats. Les résultats négatifs aussi bien que les résultats positifs doivent être publiés ou rendus accessibles. Le financement, l'appartenance à une ou des institutions et les éventuels conflits d'intérêt doivent être exposés dans les publications. Le compte-rendu d'une étude non conforme aux principes énoncés dans cette déclaration ne doit pas être accepté pour publication.

### **C. PRINCIPES APPLICABLES A LA RECHERCHE MEDICALE CONDUITE AU COURS D'UN TRAITEMENT**

28. Le médecin ne peut mener une recherche médicale au cours d'un traitement que dans la mesure où cette recherche est justifiée par un possible intérêt diagnostique, thérapeutique ou de prévention. Quand la recherche est associée à des soins médicaux, les patients se prêtant à la recherche doivent bénéficier de règles supplémentaires de protection.
29. Les avantages, les risques, les contraintes et l'efficacité d'une nouvelle méthode doivent être évalués par comparaison avec les meilleures méthodes diagnostiques, thérapeutiques ou de prévention en usage. Cela n'exclut ni le recours au placebo ni l'absence d'intervention dans les études pour lesquelles il n'existe pas de méthode diagnostique, thérapeutique ou de prévention éprouvée.
30. Tous les patients ayant participé à une étude doivent être assurés de bénéficier à son terme des moyens diagnostiques, thérapeutiques et de prévention dont l'étude aura montré la supériorité.
31. Le médecin doit donner au patient une information complète sur les aspects des soins qui sont liés à des dispositions particulières du protocole de recherche. Le refus d'un patient de participer à une étude ne devra en aucun cas porter atteinte aux relations que le médecin entretient avec ce patient.
32. Lorsqu'au cours d'un traitement, les méthodes établies de prévention, de diagnostic ou de thérapeutique s'avèrent inexistantes ou insuffisamment efficaces, le médecin, avec le consentement éclairé du patient, doit pouvoir recourir à des méthodes non éprouvées ou nouvelles s'il juge que celles-ci offrent un espoir de sauver la vie, de rétablir la santé ou de soulager les souffrances du malade. Ces mesures doivent, dans toute la mesure du possible, faire l'objet d'une recherche destinée à évaluer leur sécurité et leur efficacité. Toute nouvelle information sera consignée et, le cas échéant, publiée. Les autres recommandations appropriées énoncées dans la présente déclaration s'appliquent.