

## COMMUNICATION

### **Reclassification moléculaire des maladies auto-immunes systémiques pour identifier de nouveaux bio-marqueurs pertinents (Étude PRECISESADS)**

MOTS-CLÉS : MALADIES AUTO-IMMUNES SYSTEMIQUES. BIO-MARQUEURS. BIO-INFORMATIQUE. TAXONOMIE

#### *Molecular Reclassification to Find Clinically Useful Biomarkers for Systemic Autoimmune Diseases (the PRECISE-SADS study)*

KEY-WORDS: SYSTEMIC AUTOIMMUNE DISEASES. BIOMARKERS. BIOINFORMATICS. TAXONOMY

Jacques-Olivier PERS \*, Christophe JAMIN \*, Yves RENAUDINEAU \*, Divi CORNEC \*, Sandrine JOUSSE-JOULIN \*, Valérie DEVAUCHELLE-PENSEC \*, Alain SARAUX \*, Pierre YOUINOU \*

**Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en relation avec le contenu de cet article**

## RÉSUMÉ

*Les maladies auto-immunes (MAI) systémiques, sont un groupe de maladies inflammatoires chroniques dont les diagnostics sont difficiles à établir et les traitements aléatoires. Leur caractéristique commune est la présence d'auto-anticorps (dirigés contre des composants du Soi) dans le sérum. Actuellement les nouvelles immunothérapies disponibles ont peu de chance de résultats chez ces patients en raison de l'hétérogénéité des mécanismes moléculaires qui conduisent à la même classification clinique de la maladie. En outre, pour leurs essais cliniques, les entreprises pharmaceutiques ont d'énormes problèmes à identifier les critères de réponse aux immunothérapies par manque de marqueurs de cette réponse. Nous formulons l'hypothèse selon laquelle l'identification de signatures moléculaires spécifiques chez les patients atteints de MAI permettra aux cliniciens d'adapter leurs traitements. De fait, nous allons mettre en œuvre des stratégies de médecine de précision. Il est donc urgent*

\* EA2216, INSERM ESPRI ERI29, Laboratoire d'Immunothérapies et Pathologies lymphocytaires B, Labex « Immunotherapy, Graft, Oncology ». Laboratoire d'Immunologie, CHRU Morvan, BP824, 29609 Brest cedex ; e-mail : pers@univ-brest.fr

*Tirés à part* : Professeur Jacques-Olivier PERS, même adresse  
*Article reçu le 25 mai 2015*

*d'utiliser la puissance des techniques actuelles dites « omiques » (génomique, transcriptomique, épigénomique, métabolomique, protéomique), et la bioinformatique afin d'identifier des biomarqueurs, qui permettront de fournir le cadre à une nouvelle et pertinente taxonomie des MAI.*

## SUMMARY

*Systemic autoimmune diseases (SADs) are a group of chronic inflammatory conditions with few treatment options and difficult diagnosis. Their major common feature is the presence of unspecific autoantibodies in serum. Currently patients are being exposed to novel and approved agents with little chance of benefit due to the heterogeneity of molecular mechanisms resulting in the same disease class. Furthermore, pharmaceutical companies confront huge problems when attempting to identify end points to determine the usefulness of drugs in clinical trials and lack biomarkers that help evaluate the response to therapy. Our main hypothesis is that the identification of specific molecular signatures in patients with the SADs will enable clinicians to tailor therapies according to the specific pathways to be targeted in individual cases. In short, to implement precision medicine strategies. It is therefore urgent that we make use of the available high-throughput OMICs technologies (genomics, transcriptomics, epigenetics, metabolomics, proteomics) and bioinformatics to identify biomarkers, which will provide the framework to create a new and useful taxonomy for the SADs.*

## INTRODUCTION

Les maladies auto-immunes systémiques (MAI) sont un groupe de maladies inflammatoires chroniques dont les diagnostics sont difficiles à établir et les traitements aléatoires. Leur caractéristique commune est la présence d'auto-anticorps (dirigés contre des composants du soi) dans le sérum. Trois maladies représentent principalement ces MAI : le lupus érythémateux disséminé (LED), la polyarthrite rhumatoïde (PR) et la sclérodémie systémique (ScS). Ces trois maladies présentent des chevauchements importants dans leurs manifestations. Plusieurs autres entités et syndromes peuvent leur être associées comme le syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS) et le syndrome des anticorps antiphospholipides (SAPL). Alors que chaque entité clinique peut être considérée comme « rare », l'ensemble constitue la troisième cause de morbidité de part le monde (1 % de la population générale). En outre, il existe un grand nombre de personnes qui ne remplissent pas les critères cliniques ou qui ne partagent pas toutes les caractéristiques de l'une ou l'autre de ces maladies et qui de fait, vivent pendant des années comme des « cas indifférenciés ». Ces maladies sont au centre du projet « PRECISESADS ».

Or, de nouveaux traitements biologiques prometteurs sont en cours d'élaboration pour traiter ces MAI. À titre d'exemple dans le LED, plusieurs immunothérapies (Belimumab, Ataccept, Epratuzumab...) ont été évaluées. Mais, en raison de la classification propre à chaque maladie, les autres MAI, ayant pourtant une physiopathologie moléculaire commune ou supposée, ne peuvent pas bénéficier de ces

immunothérapies. En outre, les compagnies pharmaceutiques font face à d'énormes difficultés en tentant d'identifier les patients susceptibles de répondre à un médicament et manquant de biomarqueurs pour les aider à évaluer la réponse au traitement. Comme la mortalité et la morbidité associées à ces maladies autoimmunes sont élevées, il y a un besoin urgent de voir émerger des thérapies plus adéquates, afin de stopper la progression de la maladie, ou à en prévenir l'apparition et les dommages.

## **LE CAS PARTICULIER D'UNE IMMUNOTHÉRAPIE ANTI-LYMPHOCYTE B AU COURS DU SYNDROME DE GOUGEROT-SJÖGREN.**

Le SGS est une maladie chronique auto-immune dans laquelle les glandes exocrines deviennent le siège d'une activité immunologique intense, à un point tel que les dommages tissulaires entraînent une sécheresse des muqueuses. Bien que des contributions remarquables à la compréhension de son étiologie et de sa physiopathologie aient été réalisées au cours des dernières années [1], cette auto-attaque pathogène reste un mystère. En effet, une variété de caractéristiques génétiques et environnementales contribuent à provoquer cette affection [2]. Indépendamment du fait qu'elle se présente en tant que SGS isolé ou primitif ou associé à d'autres maladies de système, notamment la PR et le LED (SGS secondaire), le tissu épithélial malade est envahi par un infiltrat de lymphocytes. Contrairement à la notion de longue date selon laquelle cette maladie est le produit des lymphocytes T, notre laboratoire a participé à la démonstration que cette maladie auto-immune pourrait être imputée aux lymphocytes B dans un contexte d'épithélite auto-immune [3]. Cependant, l'essai TEARS (immunothérapie anti-LB par le rituximab) initié par l'équipe fut négatif [4], bien que plusieurs arguments suggèrent que cet échec pourrait être lié à l'incapacité de son critère d'évaluation principal à détecter l'effet du traitement. Ainsi, en utilisant les données de cet essai pour évaluer la sensibilité au changement des différents outils de mesure, nous avons créé le Sjögren's Syndrome Responder Index (SSRI). Cet index associe des critères correspondant aux symptômes principaux de la maladie et des mesures objectives de l'effet du traitement, et définit la réponse comme l'amélioration d'au moins 30 % entre l'inclusion et l'évaluation d'au moins 2 critères parmi les 5 suivants : évaluation de l'intensité de la fatigue par le patient sur une échelle visuelle analogique (EVA entre 0 et 100), EVA de la sécheresse oculaire, EVA de la sécheresse buccale, flux salivaire non stimulé et vitesse de sédimentation. Selon le moment de l'évaluation dans les 6 mois suivant l'inclusion, 50 % à 55 % des patients traités par rituximab dans l'étude TEARS répondent à cette définition contre 7 à 20 % des patients ayant reçu un placebo [5]. Ces résultats ont été validés grâce aux données d'un autre essai rituximab contre placebo mené en Hollande et publié en 2010. En utilisant cette définition de la réponse, nous avons montré que les patients avec une atteinte sévère des glandes salivaires étaient moins susceptibles de répondre à une seule cure de rituximab. En outre, nous démontrons que l'hyperactivité des lymphocytes B induite par la cytokine BAFF est associée à une résistance au traitement.

## **LES LIMITES ACTUELLES DES BIOTHÉRAPIES DANS L'AUTO-IMMUNITÉ**

Le constat actuel est clair. Le développement des biothérapies est limité par une connaissance insuffisante des mécanismes complexes impliqués dans ces maladies, et, plus encore, par l'absence d'identification des mécanismes activés à l'échelle de l'individu. Pourtant, utiliser des biothérapies ciblées suppose au préalable que les mécanismes moléculaires impliqués dans les manifestations de la maladie chez chaque patient soient identifiés. Ainsi, le développement d'une nouvelle taxonomie moléculaire de ces MAI constitue une « nécessité médicale » pour les patients souffrant de ces troubles.

Des recherches plus récentes sur la génomique fonctionnelle, l'expression des gènes et la génétique moléculaire ont montré que, bien que cliniquement différentes, ces MAI peuvent faire appel à des mécanismes moléculaires communs. Ainsi, il est fort probable qu'un groupe de patient (cluster) au sein d'une maladie s'entrecroise avec un autre groupe de patients atteints d'une autre MAI. Ce raisonnement est étayé par plusieurs exemples. Près de 70 % des patients atteints de LED sont décrits comme possédant une signature génétique qui se traduit par l'expression de gènes inducibles par les interférons de type I par les cellules mononucléées circulantes [6]. Or, cette signature « Interféron » est également retrouvée chez certains groupes de patients atteints de PR ou de SGS [7]. De même, des groupes de patients lupiques qui présentent cliniquement des lésions articulaires évocatrices de la PR sont décrits sous la qualification de RUPUS. Comme nous l'avons évoqué précédemment, la complication du SGS (secondaire) est très fréquemment observée chez les patients atteints de LED et de PR. De plus, certains patients développant une connectivité mixte (syndrome de Sharp) vont pouvoir évoluer vers une sclérodémie ou un LED mais en conservant un profil d'autoanticorps caractéristique. Enfin, l'apparition d'anticorps antiphospholipides et d'une thrombose chez les patients atteints de LED peut s'observer alors que les patients atteints d'un SAPL primitif ne développeront jamais de LED.

Bien que l'utilisation des études transcriptomiques a permis d'apporter de nouveaux concepts immunopathologiques [8] ou de management des biothérapies [9] (par exemple, la signature « Interféron » a été associée à la réponse aux immunothérapies dans plusieurs études de petite taille), l'association des différentes données provenant de diverses sources « omiques » n'a jamais été tenté dans un objectif de reclassification. Or, cette association de données fournirait des informations nouvelles et compléter ou expliquer d'autres mécanismes. Ainsi, la signature « Interféron » peut être la résultante de l'activation de gènes, partagés ou non par différents individus, car les mécanismes épigénétiques impliqués dans leur expression peuvent varier.

Notre hypothèse principale est que l'identification de signatures moléculaires spécifiques chez les patients atteints de MAI permettra aux cliniciens d'adapter leurs

traitements en fonction des voies spécifiques à cibler à l'échelle du patient. En bref, nous souhaitons mettre en œuvre des stratégies de médecine de précision.

## **LE PROJET PRECISESADS, VERS UNE NOUVELLE TAXONOMIE DES MALADIES AUTOIMMUNES**

Le consortium PRECISESADS, rassemblé autour d'un projet financé par l'Europe et l'Innovative Medicines Initiatives (IMI), est un réseau translationnel de chercheurs et de cliniciens accompagnés par 5 sociétés pharmaceutiques majeures (membres de l'EFPIA), ayant l'objectif commun de développer une nouvelle taxonomie moléculaire des MAI.

L'enjeu est de faire usage des techniques « omiques » à disposition, en associations avec les connaissances cliniques existantes. L'idée est de substituer les signatures moléculaires aux entités cliniques. Pour cela nous allons faire abstraction, dans un premier temps du diagnostic clinique et allons regrouper ces diverses maladies ensemble (Figure 1). Ainsi, nous allons développer une taxonomie systémique fondée sur les cellules du sang, le sérum, les urines, le plasma, les tissus, dans une première cohorte transversale de 2 000 individus. Parallèlement, nous allons lancer le recrutement de patients ayant les mêmes maladies, dans une cohorte prospective puis nous utiliserons des modèles animaux de MAI pour valider la nouvelle taxonomie. L'étude prospective aura deux objectifs : étudier les patients au moment de l'établissement de leur diagnostic, c'est à dire en ayant peu ou pas de traitement, puis de les suivre afin d'observer leurs évolutions vers une signature préalablement définie ou liée au traitement prescrit. Ces personnes seront prélevées trois fois à un an d'intervalle.

## **LES TECHNIQUES « OMIQUES » UTILISÉES**

En premier lieu, nous allons exploiter les approches de génomique, de transcriptomique et d'épigénétique (Figure 2). Le génotypage du génome entier puis un ciblage « next generation sequencing » (NGS) seront effectués pour identifier toutes les caractéristiques structurelles génomiques des patients. Les mutations rares seront identifiées en réalisant un NGS de l'exome. Des techniques d'ARN-Seq permettront d'identifier les séquences d'intérêt qui seront en outre étudiées dans des types cellulaires spécifiques triés. De même, une analyse transcriptomique par « array » sera réalisée sur les cellules mononuclées du sang de tous les individus. Enfin, les analyses épigénétiques suivantes seront menées : analyse du statut de méthylation de l'ADN, analyse par CHiP-seq des histones H3K4me3 et H3K27me3 dans le sang total et sur cellules triées. Pour éviter toute erreur d'interprétation des analyses transcriptomiques liée à la variabilité entre les plateformes d'analyse, nous utiliserons une seule plate-forme et les échantillons seront préparés selon un protocole commun strict et suivi par tous.

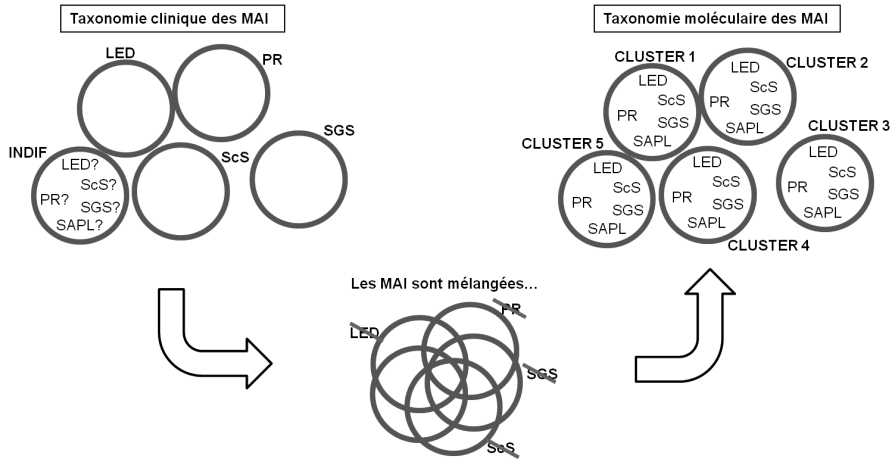


FIG. 1. — Concept de l’approche du consortium PRECISESADS dans l’élaboration d’une nouvelle taxonomie moléculaire des maladies autoimmunes (MAI). PR, polyarthrite rhumatoïde ; LED, lupus érythémateux disséminé ; ScS, sclérodermie systémique ; SGS, syndrome de Gougerot-Sjögren, INDIF, MAI indifférenciée ; SAPL, syndrome des anticorps anti-phospholipides.

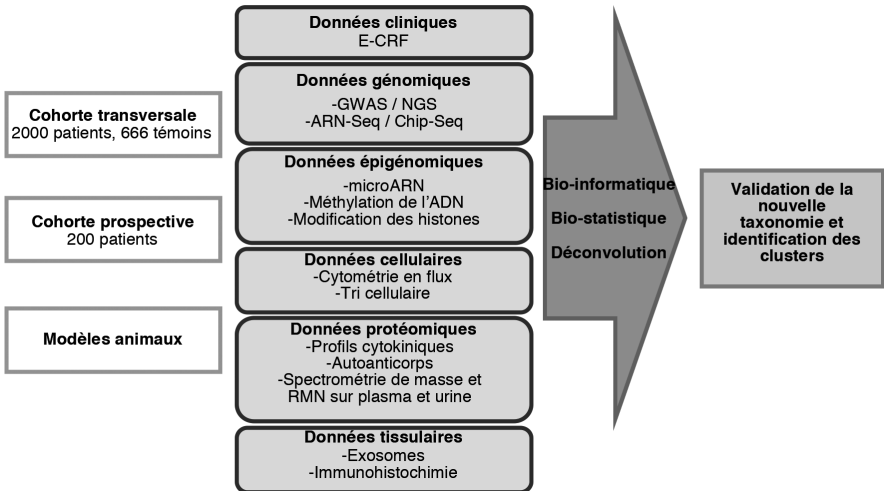


FIG. 2. — Cohortes constituées et données « omiques » étudiées pour l’élaboration de la nouvelle taxonomie des maladies autoimmunes.

Une analyse fine par cytométrie en flux des populations cellulaires du sang (lymphocytes T, lymphocytes B, monocytes, polynucléaires, cellules dendritiques...) permettra d'obtenir des données quantitatives qui pourront être corrélées aux résultats des approches génomiques, transcriptomiques et épigénétiques. Pour cela, nous allons utiliser des méthodes de déconvolution [10], et développer des biomarqueurs cellulaires qui pourront être utilisés en clinique, similaires à ceux utilisés en hémato-oncologie. Nous allons ainsi effectuer deux types d'analyses : a) une analyse fine des sous-populations cellulaires à partir du sang total à l'aide de 9 panels associant 8 marqueurs différents. Pour ce faire, nous avons mis en miroir 11 cytomètres différents, ce qui n'avait jusqu'alors jamais été réalisé. L'entièreté de l'analyse sera réalisée à Brest par un bioinformaticien qui aura pour objectif de mettre en évidence des populations cellulaires nouvelles. b) une analyse initiée à partir d'un tri cellulaire. Les cellules triées (granulocytes, lymphocytes B, lymphocytes T, monocytes) bénéficieront des techniques de génomique, de transcriptomique et d'épigénétique précédemment décrites. Ceci nous permettra de valider nos approches par déconvolution réalisées sur l'ensemble des cellules du sang total.

Ensuite, des approches de protéomique, de métabolomique et de sérologie seront menées. Ainsi, le profil des cytokines dans le sérum sera caractérisé par la technologie Luminex ; le profil des auto-anticorps et du complément (C3, CH50) seront déterminés dans le laboratoire brestois (laboratoire européen de référence en autoimmunité) ; le profil métabolomique à haut débit par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse du plasma et des urines sera réalisé. Ce profil est particulièrement important pour définir les voies métaboliques qui peuvent prédire le métabolisme des médicaments, leur absorption adéquate (folates, vitamine D), et être d'importance pour les réponses au traitement. Ces échantillons seront également soumis à la technique de résonance magnétique nucléaire (RMN) pour confirmer les profils métaboliques. Un profil transcriptomique des exosomes plasmatiques et urinaires sera enfin établi. Les informations obtenues à partir des urines seront particulièrement importantes dans la recherche de biomarqueurs urinaires potentiels qui peuvent nous aider à déterminer si un individu est enclin à développer une maladie rénale.

## **QUELS SONT LES RÉSULTATS ATTENDUS ?**

Les approches « omiques » associées à la bioinformatique intégrative devraient permettre : l'identification de biomarqueurs pour une utilisation clinique (diagnostique, pronostic, réponse aux traitements), l'identification de groupes de biomarqueurs qui caractérisent des groupes de patients (clustering), une classification des MAI basée sur les biomarqueurs cliniques pertinents, d'améliorer les connaissances scientifiques sur les interconnexions existantes entre les MAI, de développer un protocole de prise en charge individualisé des patients souffrants de MAI.

Ces résultats devraient se traduire par les impacts suivants :

- Impact sur la classification et la stratification des patients atteints d'une MAI. L'un des principaux objectifs du consortium PRECISESADS est de générer une nouvelle classification des MAI sur la base de l'état de l'art des données « omiques », mais avec la possibilité de faire ressortir un nombre minimum de biomarqueurs faciles à utiliser et peu coûteux qui pourront être transférés à la pratique clinique. D'autres questions seront ensuite abordées : Est-ce que les signatures moléculaires hétérogènes sous-tendent des manifestations cliniques et biologiques hétérogènes ? Peut-on prévoir l'évolution vers une maladie rénale ? Les signatures moléculaires observées chez un individu peuvent-elles contribuer à une stratégie thérapeutique de précision les impliquant (thérapie ciblée) ?
- Impact sur la génération de biomarqueurs robustes pour un usage clinique. L'analyse bioinformatique devrait générer un ensemble robuste de biomarqueurs associés à des signes cliniques généraux et spécifiques des MAI. Ces clusters de biomarqueurs ne seront pas seulement utilisés pour la re-classification des MAI et la stratification des patients, mais seront aussi potentiellement utilisés pour identifier d'autres troubles connexes qui partagent les caractéristiques cliniques des MAI (y compris l'inflammation, la fibrose, la signature « Interféron », la signature « lymphocytes B », la signature « granulocytes »).
- Impact sur les connaissances des mécanismes moléculaires impliqués et interconnectés dans la régulation, la progression et la réponse aux traitements.
- Impact sur la création d'une plate-forme analytique pour tester de nouvelles cibles thérapeutiques. Le profil moléculaire à l'échelle du patient et l'identification de biomarqueurs pertinents facilitera la stratification des patients pour les essais cliniques. Ainsi en parallèle, ces données seront explorées dans des modèles animaux de MAI.

En conclusion, les aspects contenus dans ce projet novateur et ambitieux contribueront à accroître la probabilité de succès pour développer de nouveaux traitements et proposer de nouvelles options thérapeutiques dans l'autoimmunité.

## REMERCIEMENTS

Ce projet bénéficie du soutien de « *Innovative Medicines Initiative* » en vertu de l'accord de subvention n° 115565. Le financement est assuré par le septième programme-cadre de l'Union européenne (FP7 / 2007-2013) et les sociétés pharmaceutiques de l'EFPIA.



## RÉFÉRENCES

- [1] Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome: a forty-year scientific journey. *J Autoimmun.* 2014 ; 51:1-9.
- [2] Jonsson R, Bolstad AI, Brokstad KA, Brun JG. Sjogren's syndrome-a plethora of clinical and immunological phenotypes with a complex genetic background. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 ; 1108:433-47.
- [3] Youinou P. Sjogren's syndrome: a quintessential B cell-induced autoimmune disease. *Joint Bone Spine.* 2008;75(1):1-2.
- [4] Devauchelle-Pensec V, Mariette X, Jousse-Joulin S, Berthelot JM, Perdriger A, Puechal X, et al. Treatment of primary Sjogren syndrome with rituximab: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2014;160(4):233-42.
- [5] Cornec D, Devauchelle-Pensec V, Mariette X, Jousse-Joulin S, Berthelot JM, Perdriger A, et al. Development of the Sjogren's Syndrome Responder Index, a data-driven composite endpoint for assessing treatment efficacy. *Rheumatology (Oxford).* 2015:sous presse.
- [6] Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med.* 2003;197(6):711-23.
- [7] Toro-Dominguez D, Carmona-Saez P, Alarcon-Riquelme ME. Shared signatures between rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome uncovered through gene expression meta-analysis. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(6):489.
- [8] Delgado-Vega AM, Alarcon-Riquelme ME, Kozyrev SV. Genetic associations in type I interferon related pathways with autoimmunity. *Arthritis Res Ther.* 2010;12 Suppl 1:S2.
- [9] Reynier F, Petit F, Paye M, Turrel-Davin F, Imbert PE, Hot A, et al. Importance of correlation between gene expression levels: application to the type I interferon signature in rheumatoid arthritis. *PLoS One.* 2011;6(10):e24828.
- [10] Shen-Orr SS, Tibshirani R, Khatri P, Bodian DL, Staedtler F, Perry NM, et al. Cell type-specific gene expression differences in complex tissues. *Nat Methods.* 2010;7(4):287-9.

