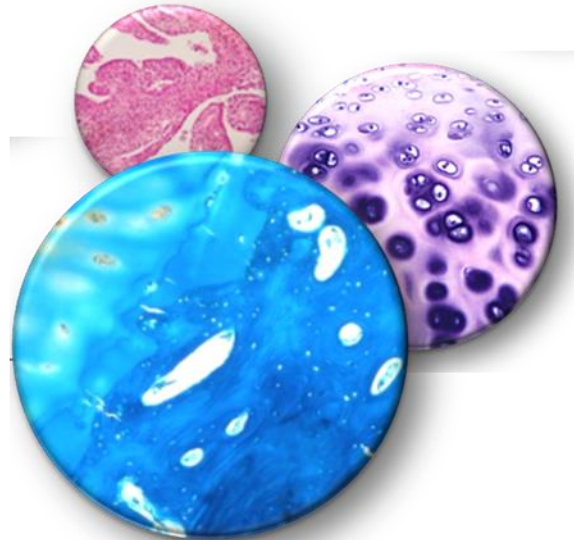
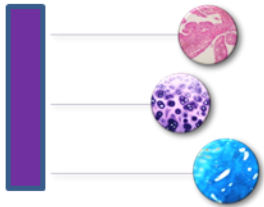


# Les marqueurs biologiques de l'arthrose: de la conception à la qualification

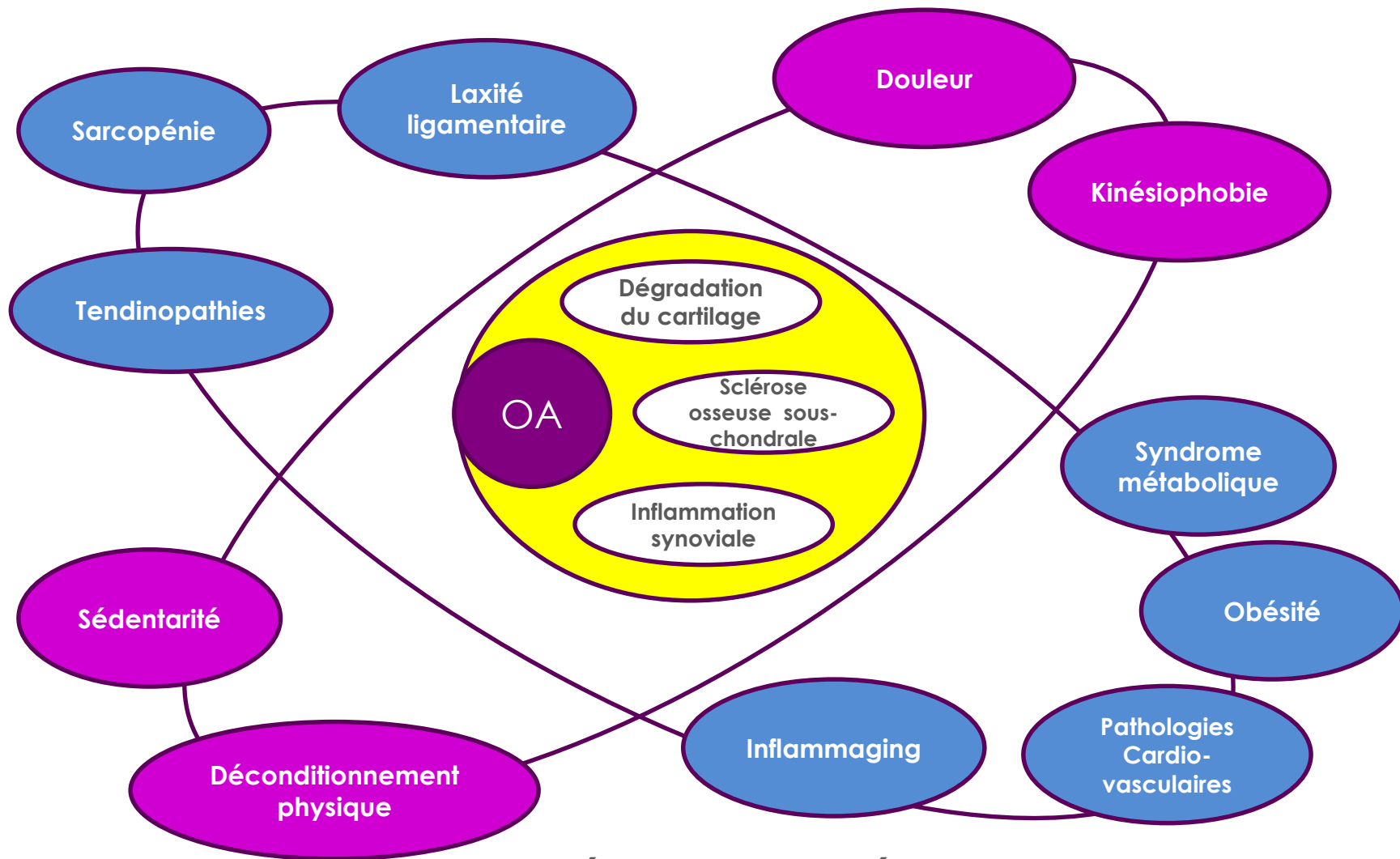
Yves Henrotin, PhD  
Université de Liège



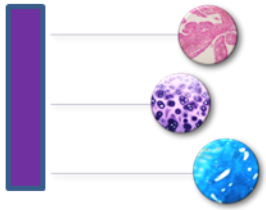


# L'arthrose

Une maladie complexe et grave



Représentation planétaire



# Un diagnostic trop tardif!



Trop tard



Génétique



Sanguins



RMN



Radiographie



**Prédisposition**   **Phase silencieuse**



Marqueurs génétiques



Changements métaboliques précoces



Marqueurs biologiques



# Mais aussi....

- Une recherche clinique trop coûteuse et trop longue
- Une méconnaissance des phénotypes de la maladie
- L'absence d'un suivi personnalisé du malade



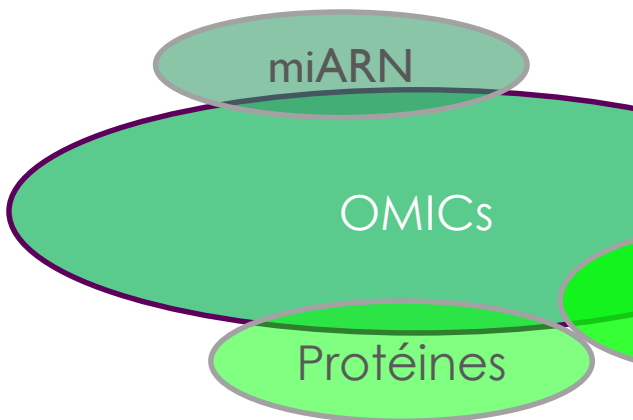
**Marqueurs biologiques**

# Définition

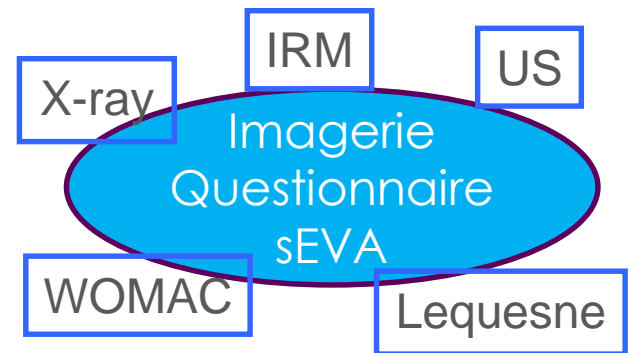
«Un biomarqueur est une caractéristique qui est mesurée et évaluée de manière **objective** comme un indicateur des processus physiologiques, pathologiques ou de la réponse à un traitement»

Biomarkers Definitions Working Group I. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther 2001; 69: 89-95.

Soluble or « wet » biomarkers



« Dry » biomarkers





# Classification BIPEDS

*Bauer et al. Osteoarthritis Cart 2006*

## Burden of disease

- Biomarqueurs corrélés avec la sévérité et/ou l'étendue de la maladie

## Investigative

- Biomarqueurs qui ne rentrent dans une autre catégorie

## Prognostic

- Biomarqueurs qui prédisent l'incidence ou la progression de la maladie ou la réponse à un traitement

## Efficacy of treatment

- Biomarqueurs indicatifs de la réponse à un traitement et dont l'amplitude du changement est le reflet de l'efficacité

## Diagnostic

- Biomarqueurs qui dissocient les populations de patients pathologiques et de patients sains.

## Safety

- Biomarqueurs qui identifient les effets secondaires

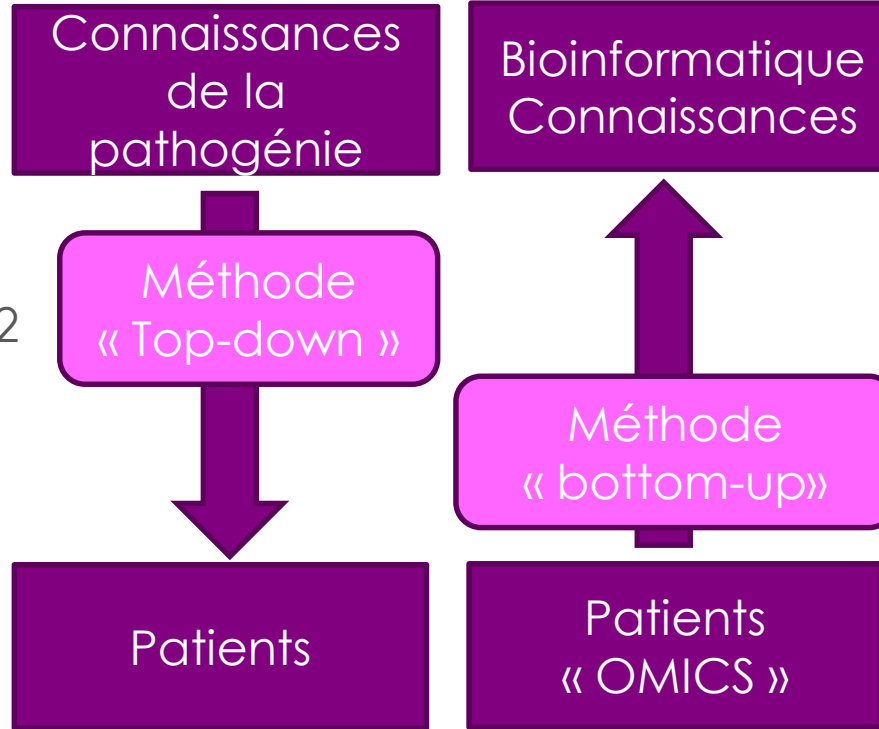
**Indicateurs de pertinence des marqueurs biologiques  
dans le cadre de la recherche**



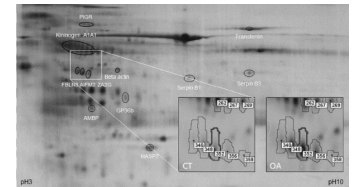
# Découverte d'un nouveau marqueur biologique



Coll2-1 &  
Coll2-1NO2



Fragments de  
Fibuline-3



Detection of specific nitrated markers, Henrotin Y, Deberg M, Patents :  
**EP 1488240B1 validated in BE, DE, DK, ES, FR, GB, IT, SE. US 7,393,649B2; US 7,915,001B2; US 8,329,874B2.**

Method for monitoring collagen type II degradation in cartilage, Henrotin Y, Chritgau S, Deberg M, Patents: **EP 1485718B1 validated in BE, DE, ES, FR, IT, SE. US 7,410,770B2; US 7,728,112B2.**

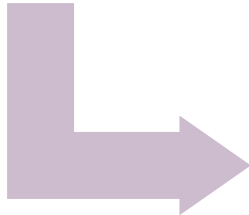
Biomarker for osteoarthritis and/or other ageing-related diseases, and use thereof. Y Henrotin, M Gharby, M Deberg, E De Pauw. Patents: **US 8,771,968B2, US 2015-0037823A1 (continuation). EP 09757339.8**

Biomarker for osteoarthritis and/or other ageing-related diseases, and use thereof. Y Henrotin, M Gharby, M Deberg, E De Pauw. Patents : **US2011-0159607A1 ; EP 09757340.6.**

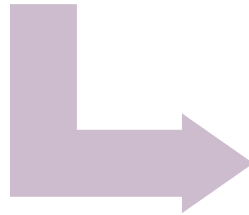
# Méthode Top-down Coll2-1 et Coll2-1NO2



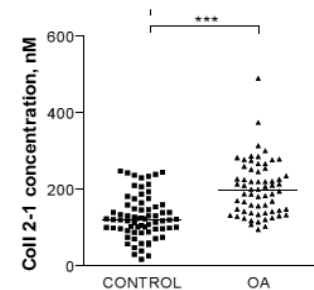
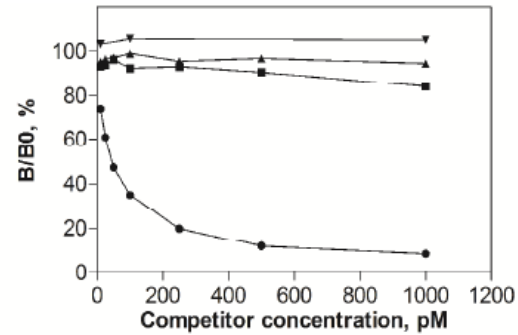
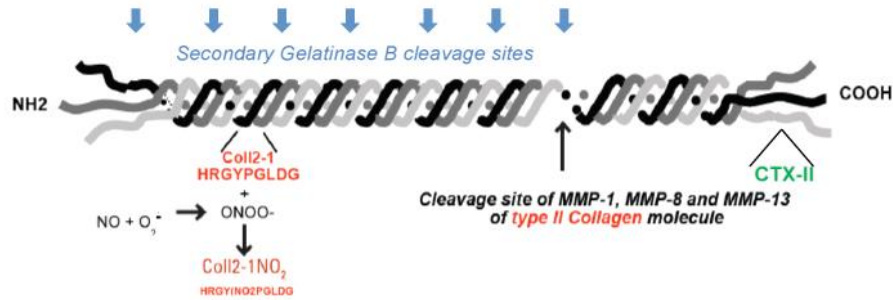
1  
Connaissances



2  
Dosage  
immunologique



3  
Validation



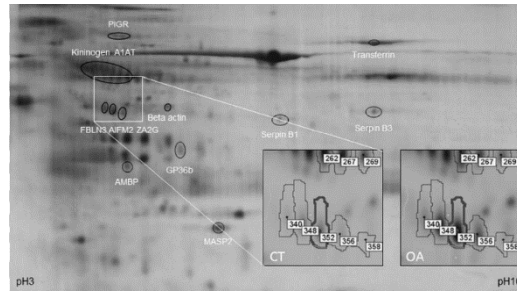
⇒ COLL2-1 is a degradation marker



# Méthode Bottom-up Fibuline-3 fragments

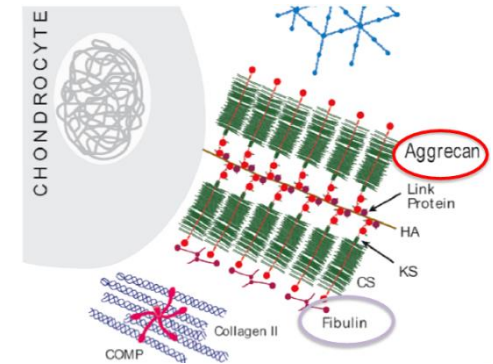
1

Identification  
Protéomique



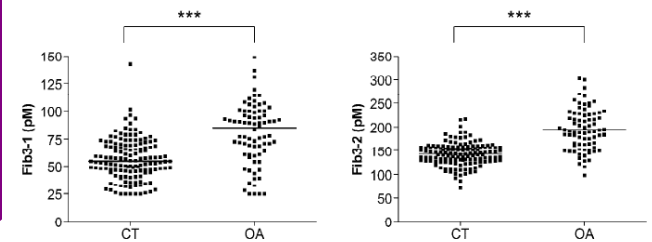
2

ID/sequencing  
Bioinformatique  
Connaissances



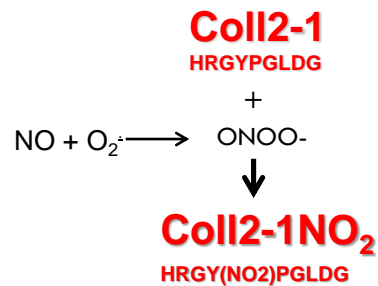
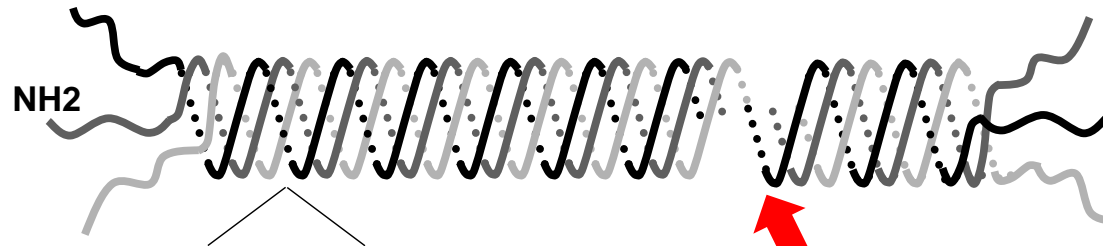
3

Dosage  
immunologique  
Validation



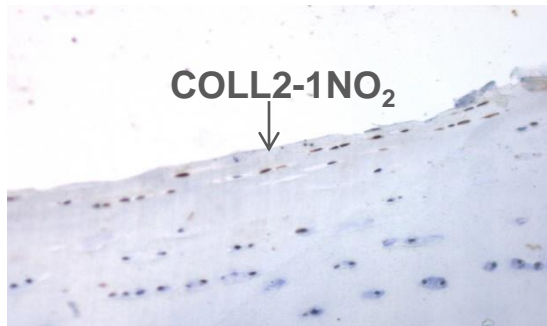
# Méthode top-down: Coll2-1 et Coll2-1NO<sub>2</sub>

Deberg et al. O&C 2008



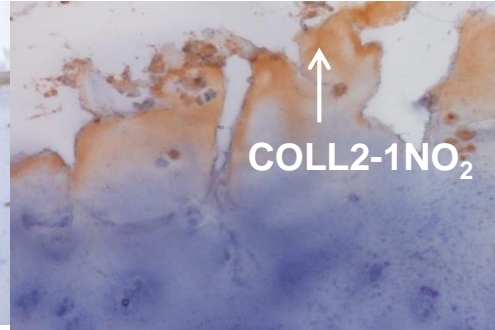
Cleavage site of MMP-1, MMP-8 and MMP-13  
of **type II Collagen** molecule

**CARTILAGE normal**

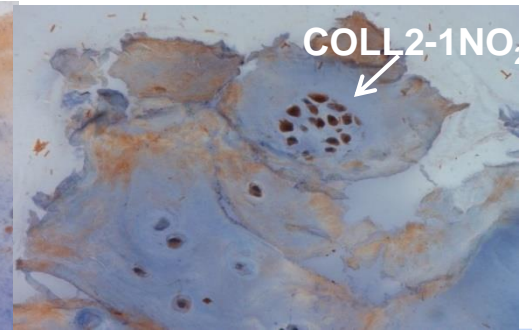


**CARTILAGE arthrosique**

**FIBRILLATION ZONE**



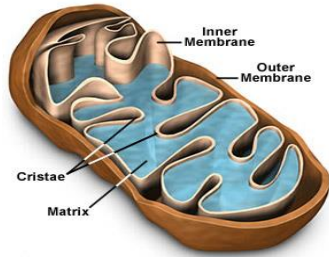
**CELL CLUSTER ZONE**



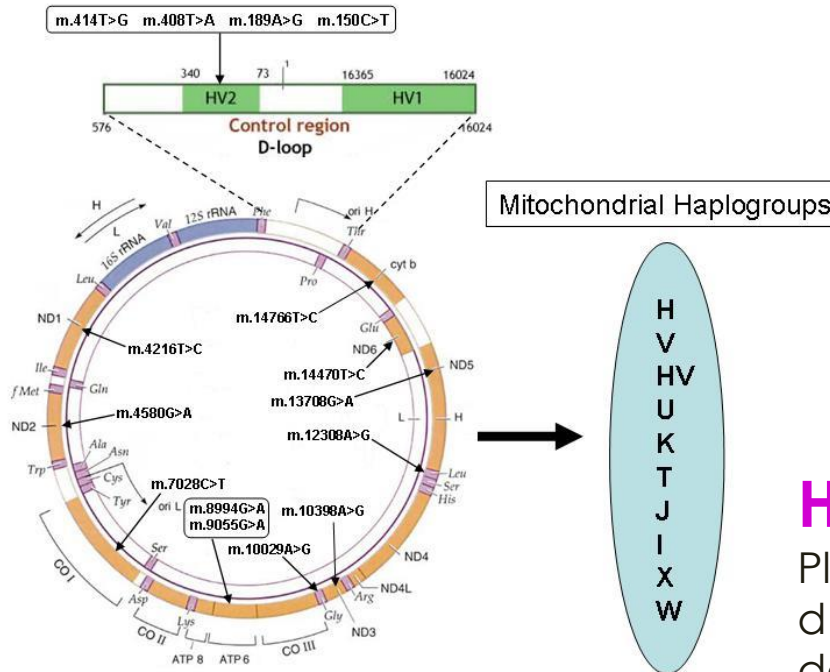


# Coll2-1 & Coll2-1NO2 marqueurs de Diagnostic des phénotypes OA

*I Rego-Perez et al., ARD, 2010 & 2011*



**Comparaison du taux sérique de marqueurs biologiques chez les patients porteurs d'un haplogroupe H ou J**

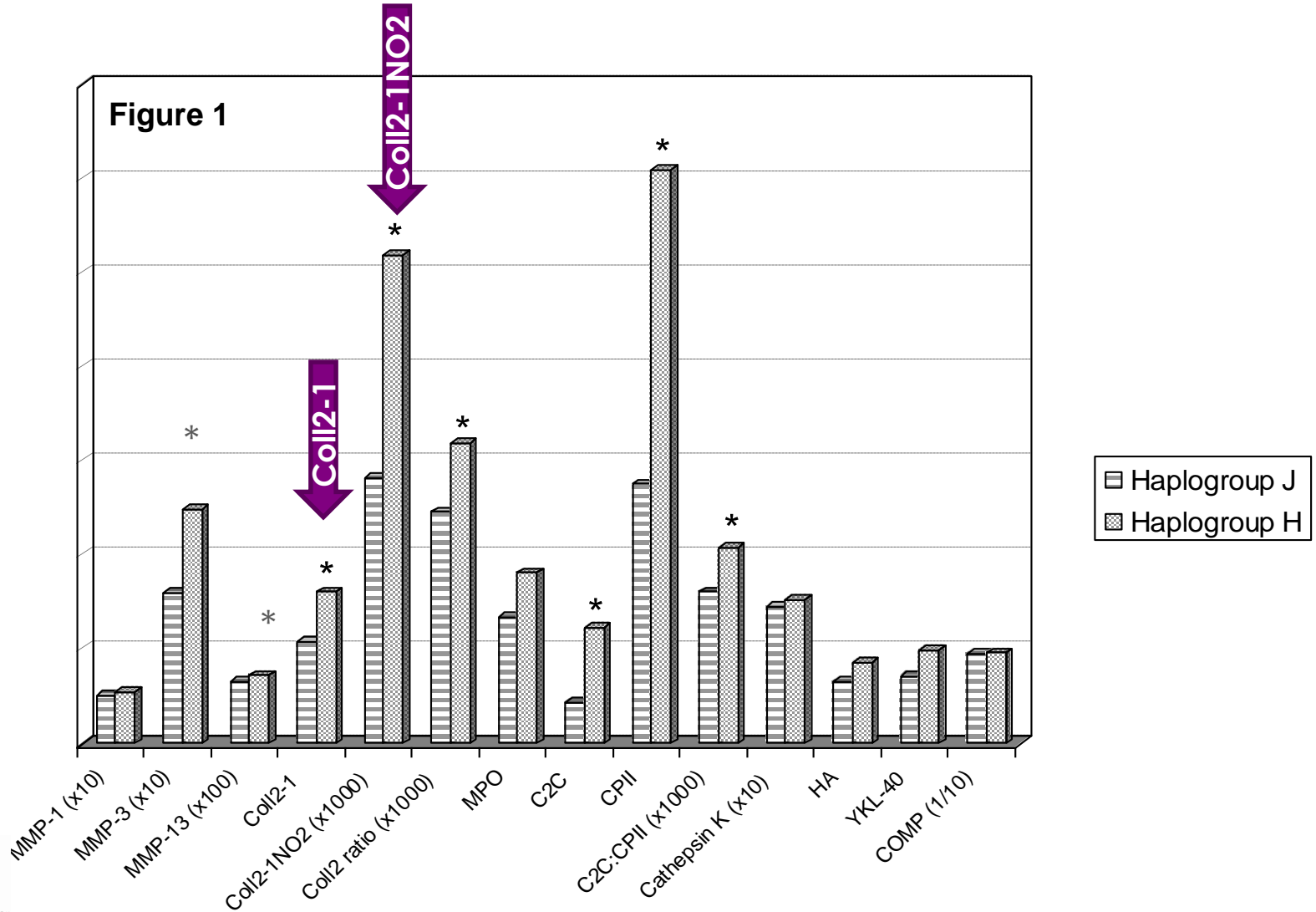


## Haplogroups J

Plus faible incidence et sévérité d'arthrose du genou et de la hanche dans la population espagnole



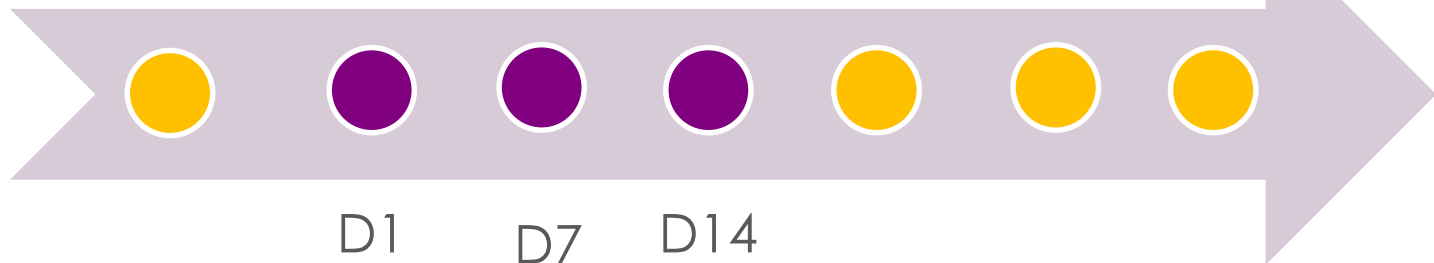
# Coll2-1 & Coll2-1NO2: marqueurs de Diagnostic



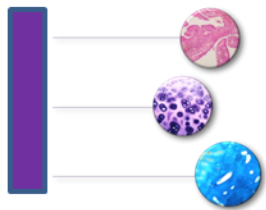
# Etude BIOVISCO

Open-label, observational prospective study

45 patients  
Gonarthrose  
Unilatérale  
Symptomatique



sHA, sColl2-1, sColl2-1NO2,  
sC2C, sCOMP, sCS-846,  
sCPII, CTX-II,  
Fib3-1, Fib3-2



# Coll2-1 et Coll2-1NO2 marqueurs d'efficacité de la viscosupplémentation

Conrozier et al, *J Orthp Res*, 2012; Henrotin et al, *J Orthp Res*, 2013.

	D1 (après la première injection)	90 jours (après la dernière injection)	p-Value D1 vs D90
sColl2-1 (nM)	140.34(882.44-285.32)	128.41 (85.6-241.34)	0.05*
sColl2-1NO2 (nM)	0.400 (0.050-1.010)	0.370 (0.14-0.870)	0.025*
uCTX-II (ng/nmolcreat)	392.7 (90.0-816.4)	306.0 (90-1123.9)	0.02*
sPIICP (ng/ml)	817.9 (131.4-1848.6)	874.8.3 (326.4-1435.0)	0.41
sC2C (ng/ml)	223.6 (99.4-329)	209.5 (135.9-291.7)	0.11
sCOMP (U/L)	10.9 (6.0-20.2)	10.5 (6.0-20.0)	0.82
sCS846 (ng/ml)	99.8 (45.9-172.3)	102.2 (53.0-190)	0.38
sHA (ng/ml)	34.1 (15.4-211)	33.3 (9.5-230.1)	0.38



# Méthode Bottom-up

## 1. Identification

- Protéomique (gel + Chromato + Swissprot)

## 2. Selection

- Pouvoir discriminant
- Littérature

## 3. Dosage (Validation)

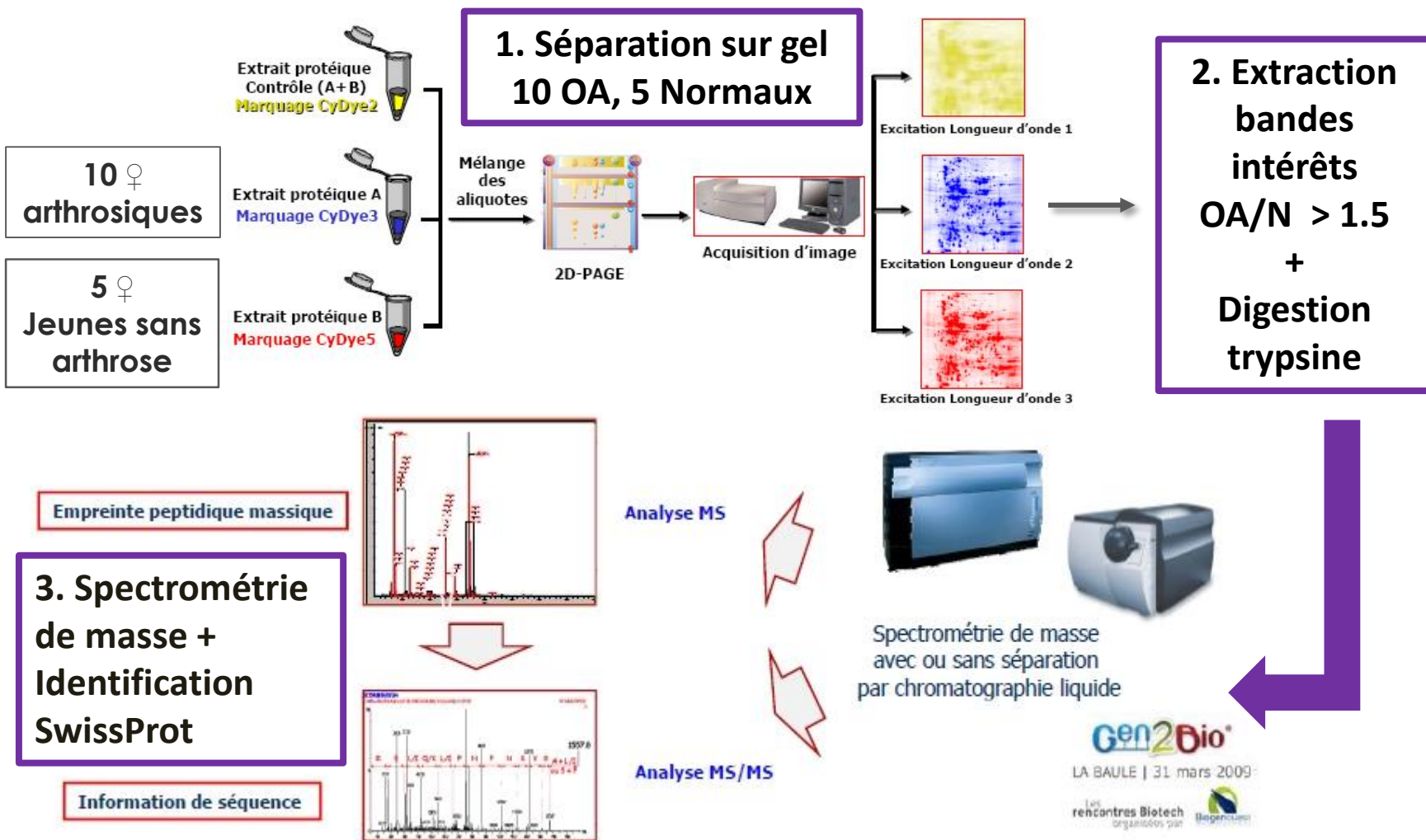
- Production d'anticorps polyclonaux
- Dosage immunologique

## 4. Qualification

- Etude transversale (diagnostic)
- Critères BIPEDS

# 1. Identification

Analyse protéomique urine



Gharbi et al, Front Physiol 2011





## 2. La sélection

### Quelques protéines remarquables

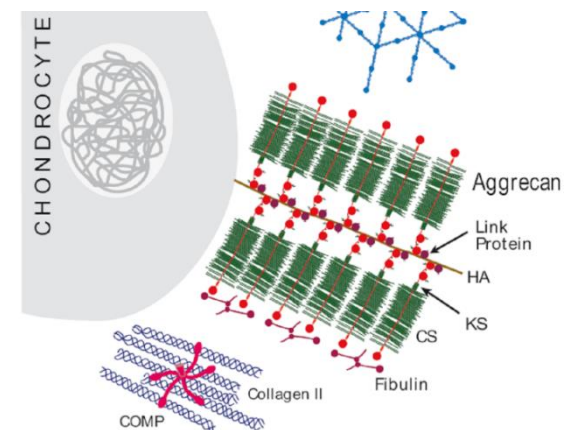
40 protéines avec un rapport OA/N > 1,5

Rapport d'abondance OA/N	Nom de la protéine	Signification statistique Valeur de p
4,1	$\beta$ -actine	P < 0,0001
2,2	$\alpha$ 1-microglobuline/bikunin receptor	P<0,001
2,2	Fibuline-3	P< 0,001
2,2	Apoptosis-inducing factor-2 Fibuline-3 (Fib3-2)	P<0,001
2,0	Zn- $\alpha$ -2-glycoprotein precursor	P<0,001

# La fibuline-3 (EFEMP1)

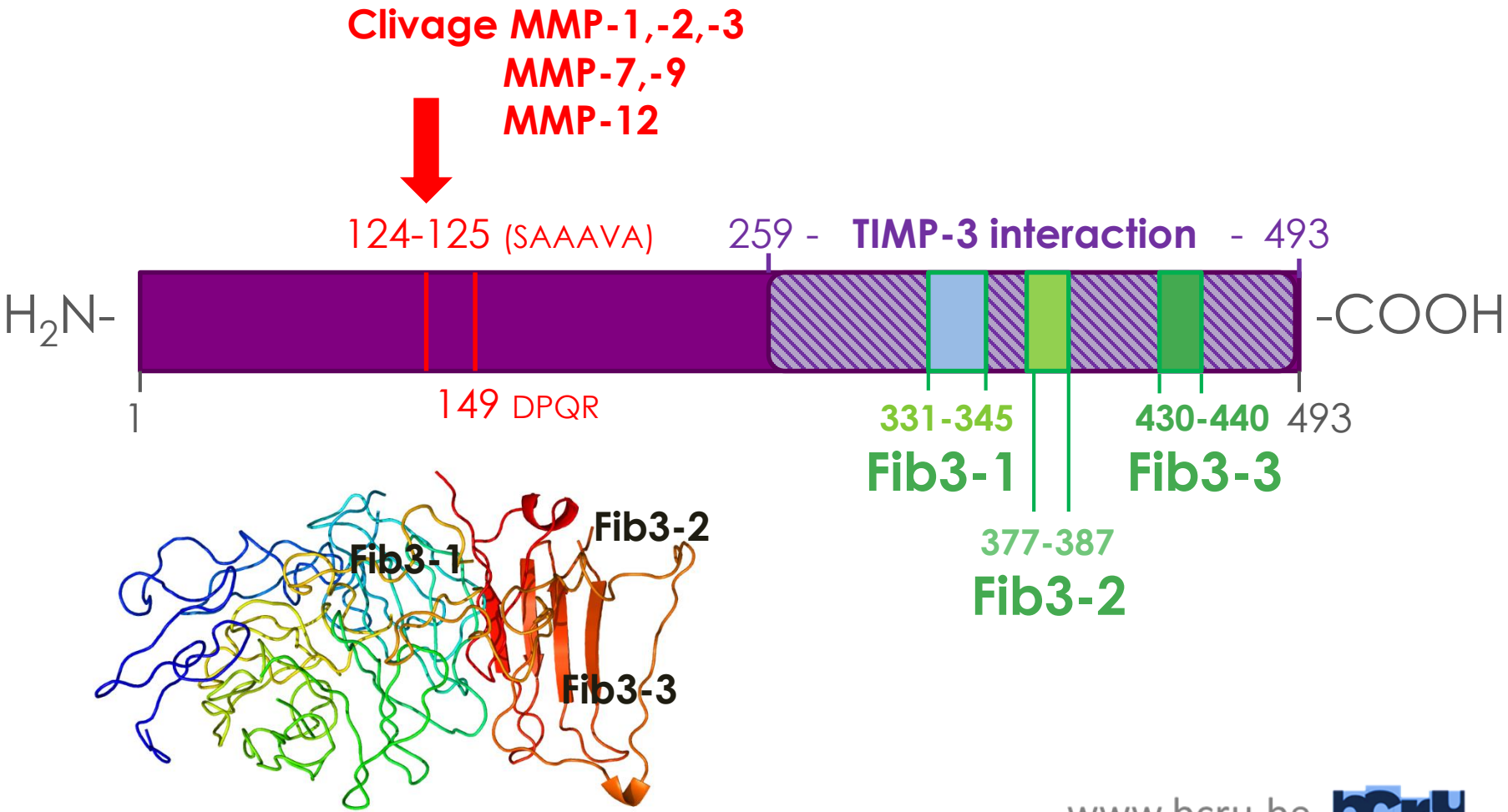
Glycoprotéine extracellulaire 54.641 Da

- Exprimée dans la couche superficielle du cartilage → diminué avec l'âge
- Inhibiteur de la différenciation hypertrophique des chondrocytes
- Associée à TIMP-3 et à l'aggrécane
- Inhibiteur de l'angiogenèse
- Formation des fibres élastiques





# Fibuline-3 epitopes

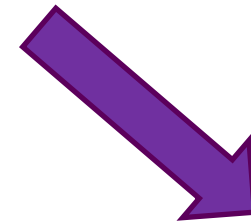


# 3. Le dosage

## Production d'anticorps

Fib3-1: **TCQDINECETTNECR**

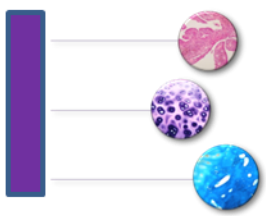
Fib3-2: **CVCPVSNAMCR**



Immunodosage  
Immunohistochimie

Deux antiséra:  
AS88: Fib3-1  
AS94: Fib3-2





# Localisation de Fib3-1 and Fib3-2 par immunohistochimie

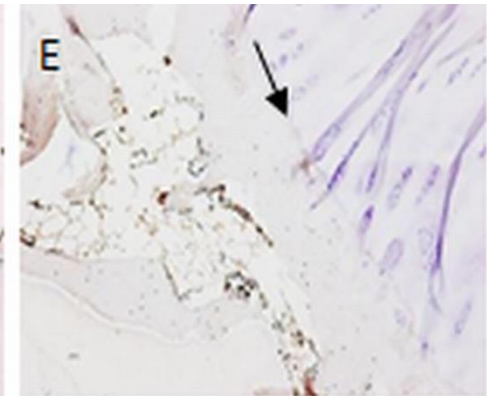
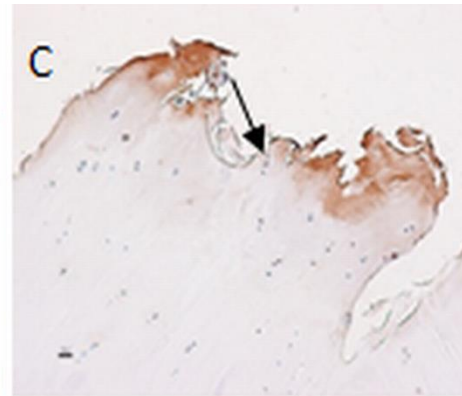
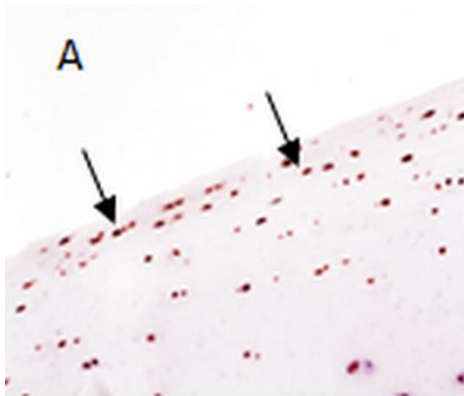
*Henrotin et al. Arthritis Rheum, 2013*

**Normal**

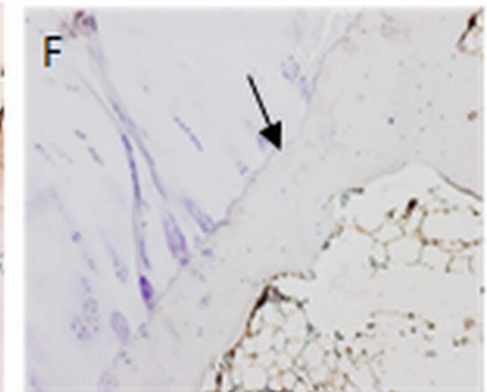
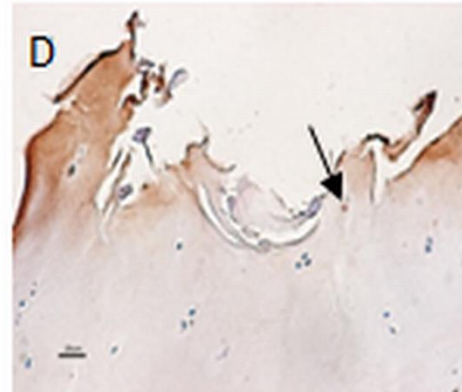
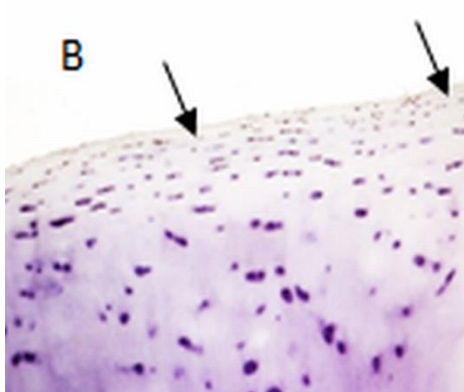
**Arthrosique  
surface**

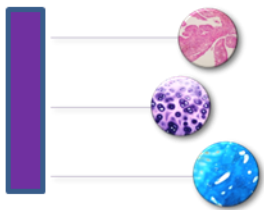
**Arthrosique  
Zone profonde**

**Fib3-1**



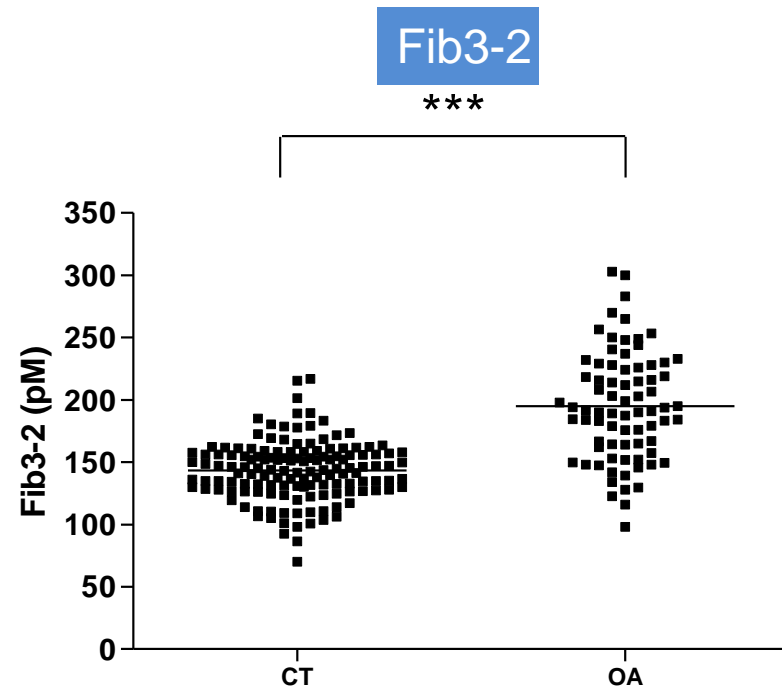
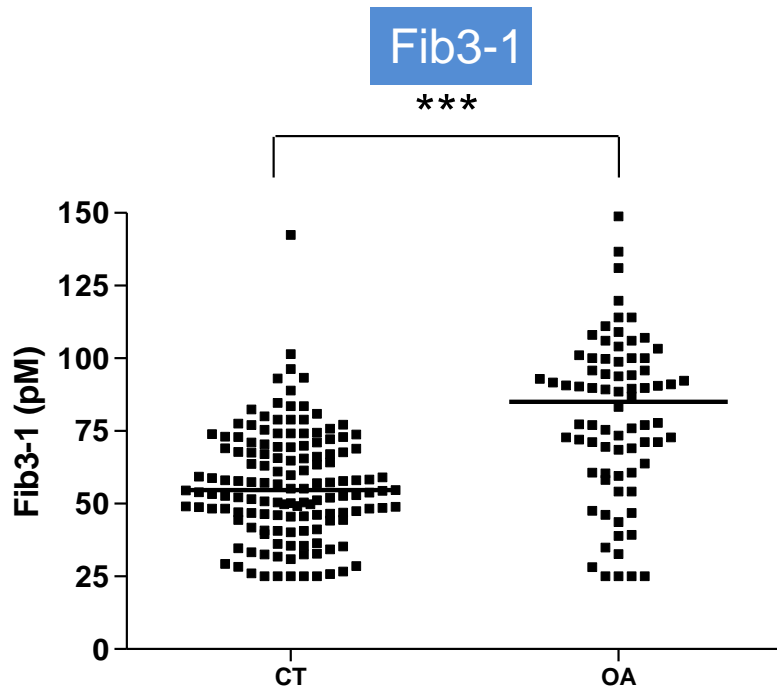
**Fib3-2**





# Fib3-1 et Fib3-2 sériques et gonarthrose

(Henrotin et al. Arthritis Rheum, 2013)



	OA (n=76)	CTRL (n=140)
Fib3-1 (median, 25%>75% range , pM)	85.10, 60.7 > 99.5	54.63, 45.59 > 69.56
Fib3-2 (median, 25%>75% range , pM)	191.4, 162.5 > 227.5	144.4, 128.7 > 157.7

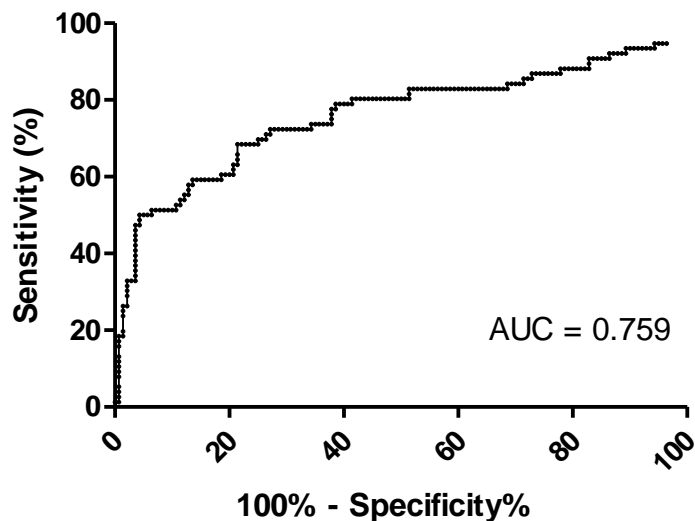
**Fib3-1 et Fib3-2 ne sont pas corrélés** [www.bcr.u](http://www.bcr.u)



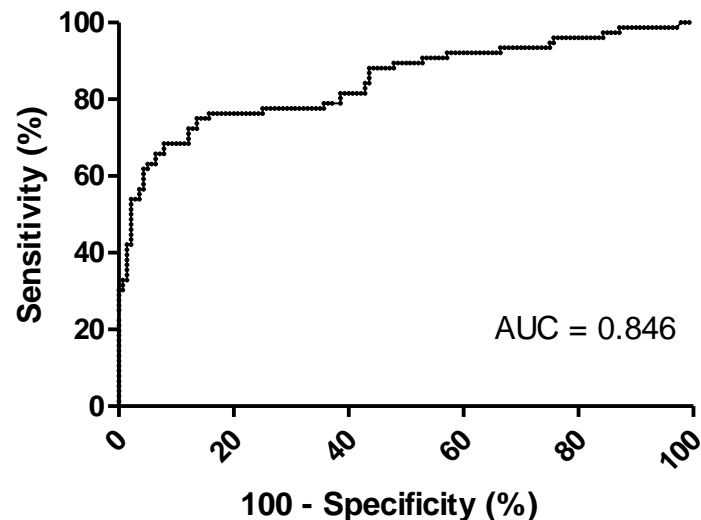
# Fib3-1 et Fib3-2 : des marqueurs de Diagnostic de l'arthrose du genou

(Henrotin et al. Arthritis Rheum, 2013)

Fib3-1: ROC curve



Fib 3-2:ROC curve



	Sensibility	Specificity
Fib3-1 (cut-off: 71.1 pM)	78.5%	68.4%
Fib3-2 (cut-off: 163.7 pM)	75.0%	86.4%

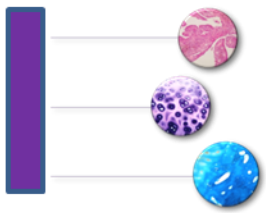


# Fib3-1 & Fib3-2 marqueurs de Pronostic de l'incidence de la gonarthrose

Runhaar et al. O&C 2015

- Cohorte « Proof »
- 407 Femmes (patientes à risques)
- Age: 50-60 ans
- IMC :  $\geq 27$  kg/m<sup>2</sup>
- Pas d'arthrose clinique ou radiologique du genou à l'inclusion
- 30 mois de suivi

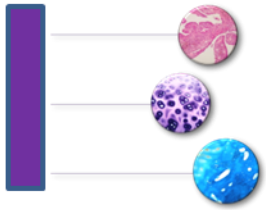




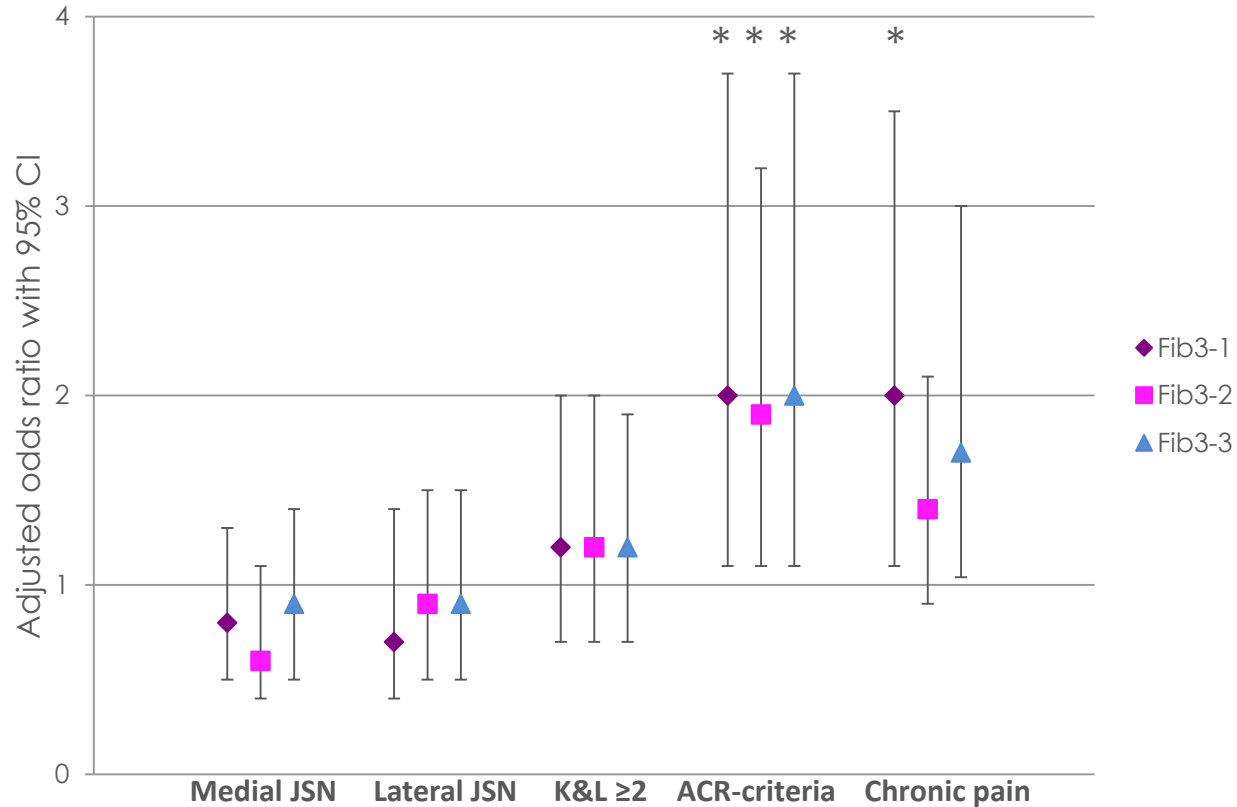
# « Proof »

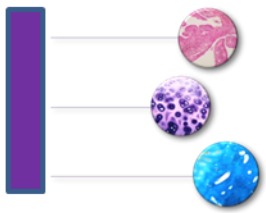
## Incidence de l'arthrose

- Incidence selon variables primaires = 72/254 femmes (28.3%).
  - Pincement médial: 27/254 (10,6%)
  - Pincement latéral: 26/254 (10,2%)
  - K&L  $\geq$  2: 23/254 (9,1%)
  - Critères ACR: 20/254 (7,9%)



# Fib3-1 & Fib3-2 prédictifs de l'incidence de la gonarthrose (ACR)





# Conclusions

- Marqueurs biologiques pour la recherche
- Industrialisation & production et le multiplexage sont des étapes à réussir
- Qualification sur des cohortes représentatives de la population générale



Merci de votre  
attention





← **bcrU** Team  
Bone and Cartilage Research Unit



Merci!

**International collaborations:**

- F Blanco (La coruna, Spain)
- T Conrozier (CHU Lyon, France)
- V Kraus (Duke University, USA)
- L Punzi (University of Padova, Italy)
- A Mobasher (University of Nottingham, UK)
- J Monfort (Hospital del mare (Spain)
- P Richette (Lariboisiere, France)
- J Runhaar (Erasmus MC, Rotterdam)

