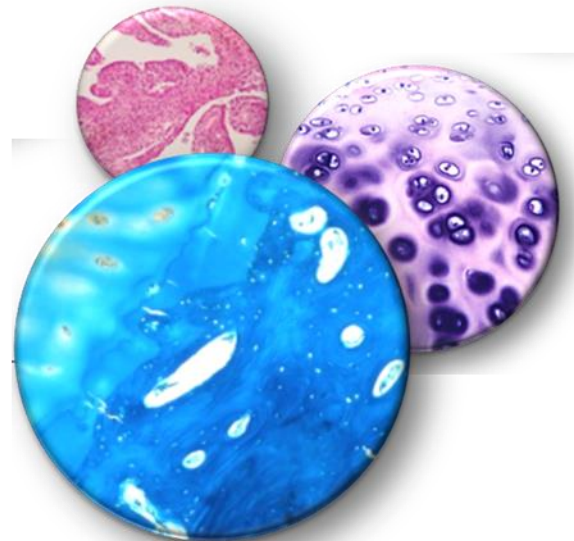


Les marqueurs biologiques de l'arthrose: de la découverte à l'industrialisation

Yves Henrotin, PT, MT, PhD

Université de Liège



L'arthrose

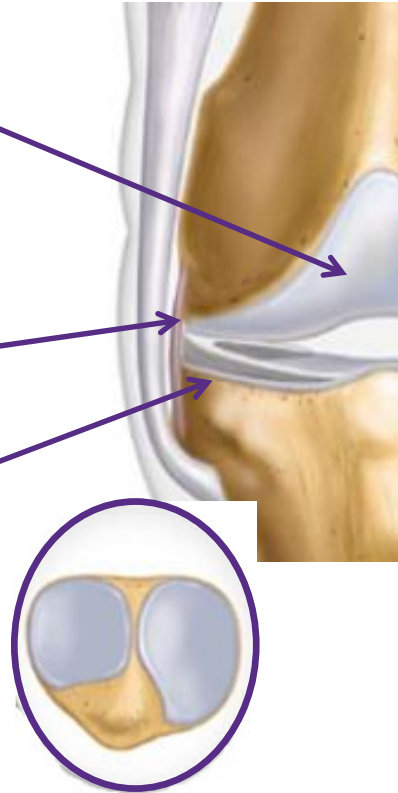
Saine

Cartilage articulaire

- chondrocytes
- matrice extracellulaire :
 - eau
 - agrécan
 - collagène

Membrane synoviale

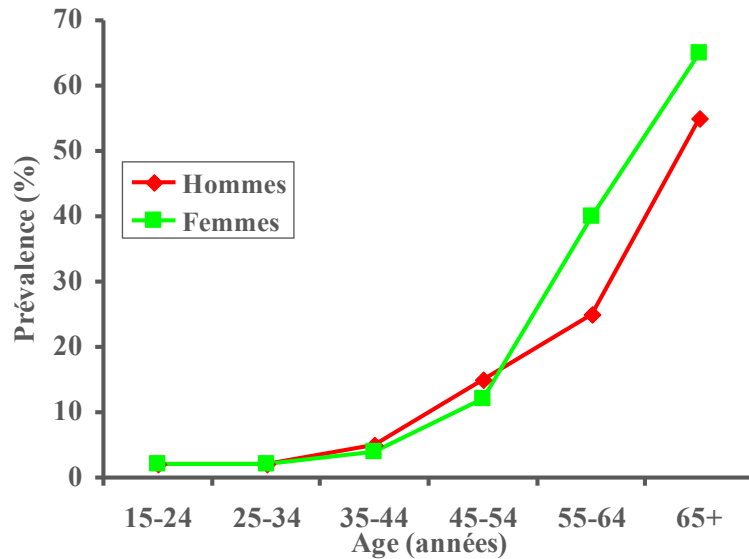
Os sous-chondral



A photograph of a stage with red curtains. The curtains are pulled back, revealing a dark stage floor. The lighting is dramatic, with a spotlight effect on the center of the stage.

De l'arthrose aux arthroses: l'histoire

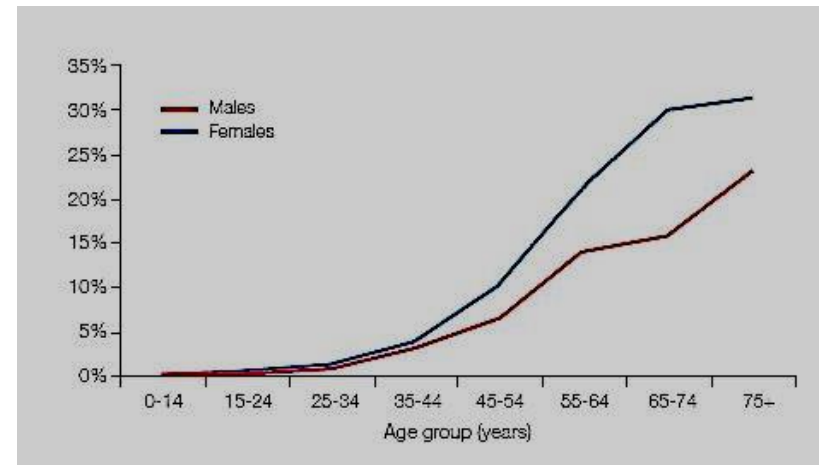
ACTE I : Usure liée au vieillissement



A 65 ans, 70% des sujets ont des signes radiologiques d'arthrose



A 65 ans, 30% des sujets ont une arthrose invalidante



ACTE II : Pathologie mécanique



Activités sportives



Surcharge pondérale



Troubles axiaux



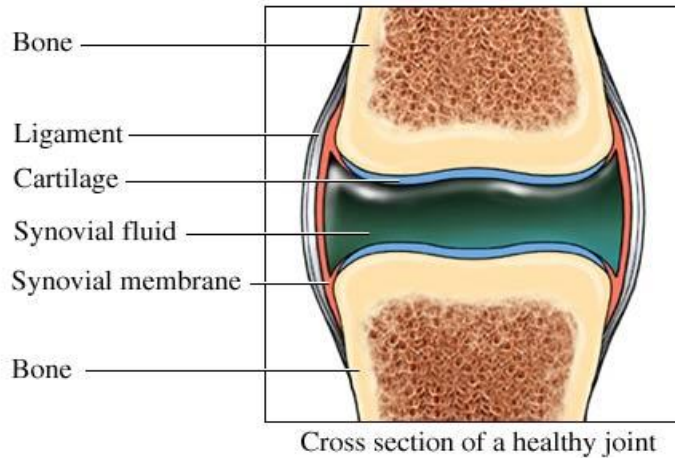
Microtraumatismes



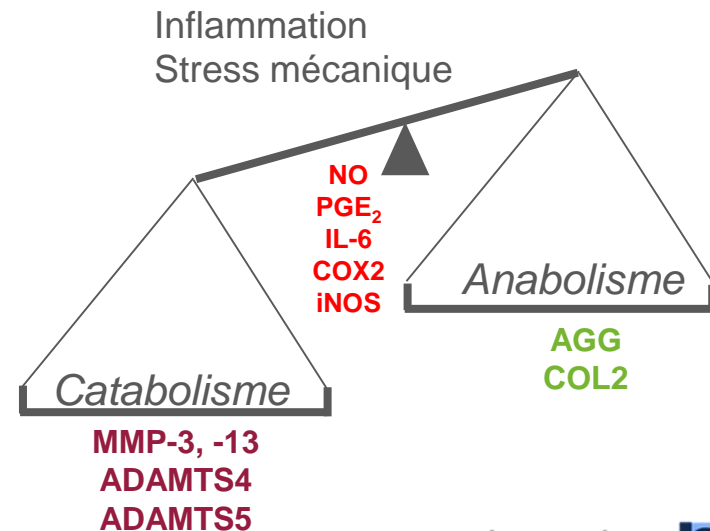
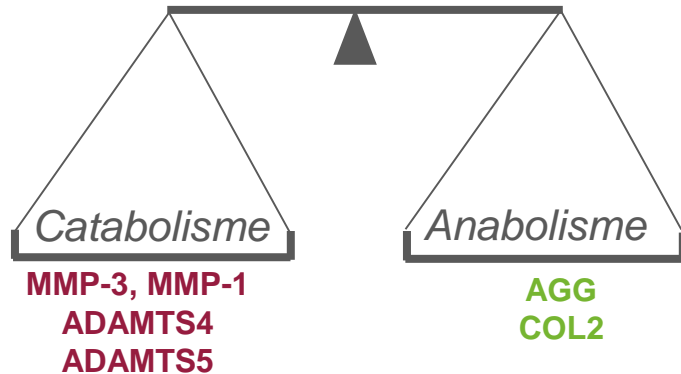
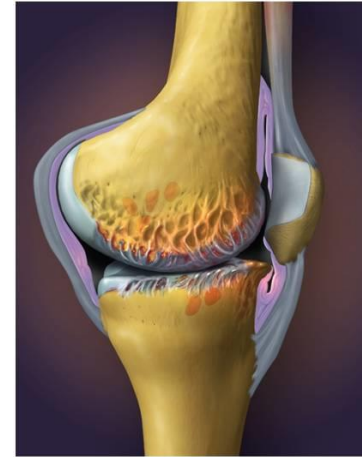
Traumatismes

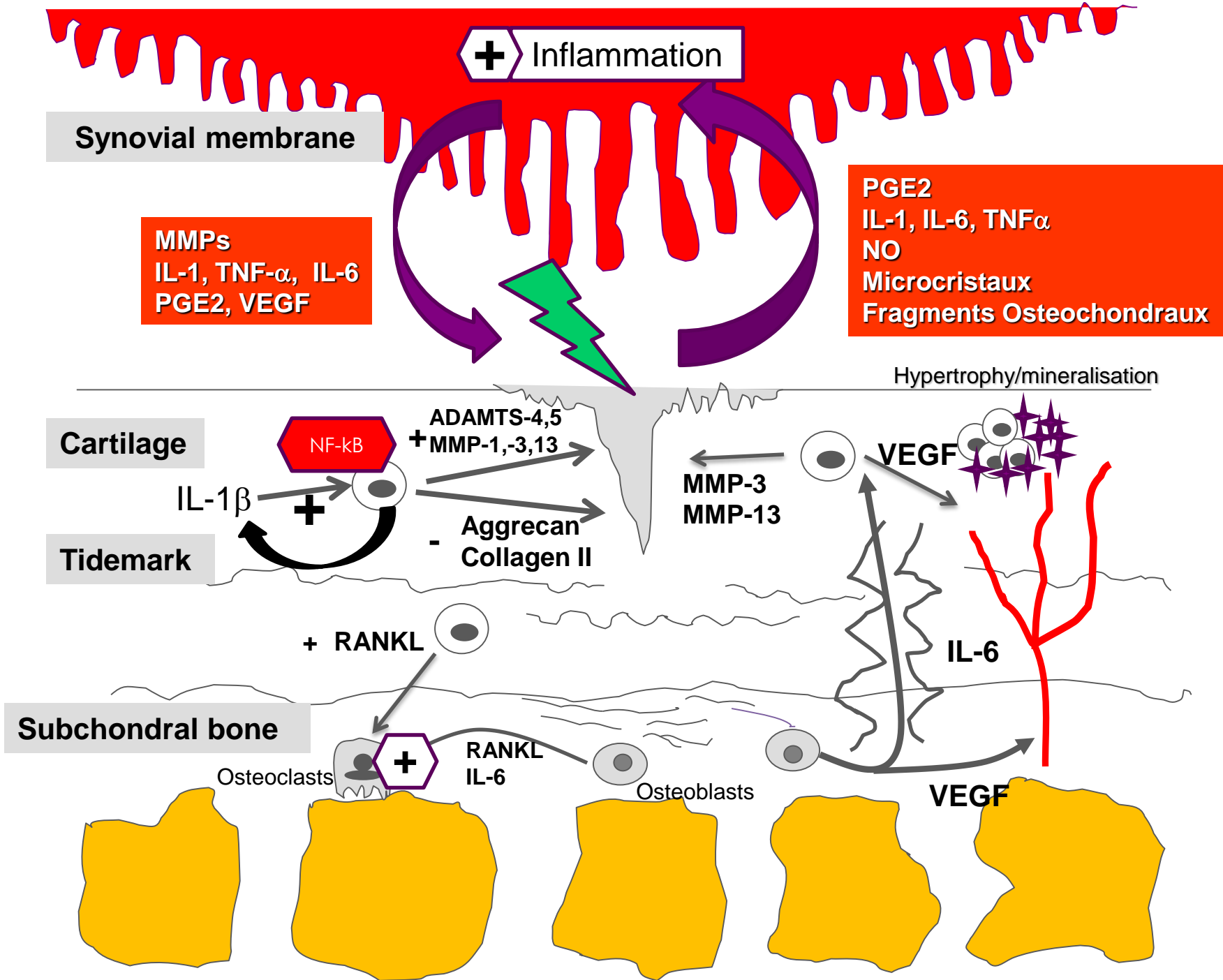
Acte III: un déséquilibre métabolique du chondrocyte

Saine

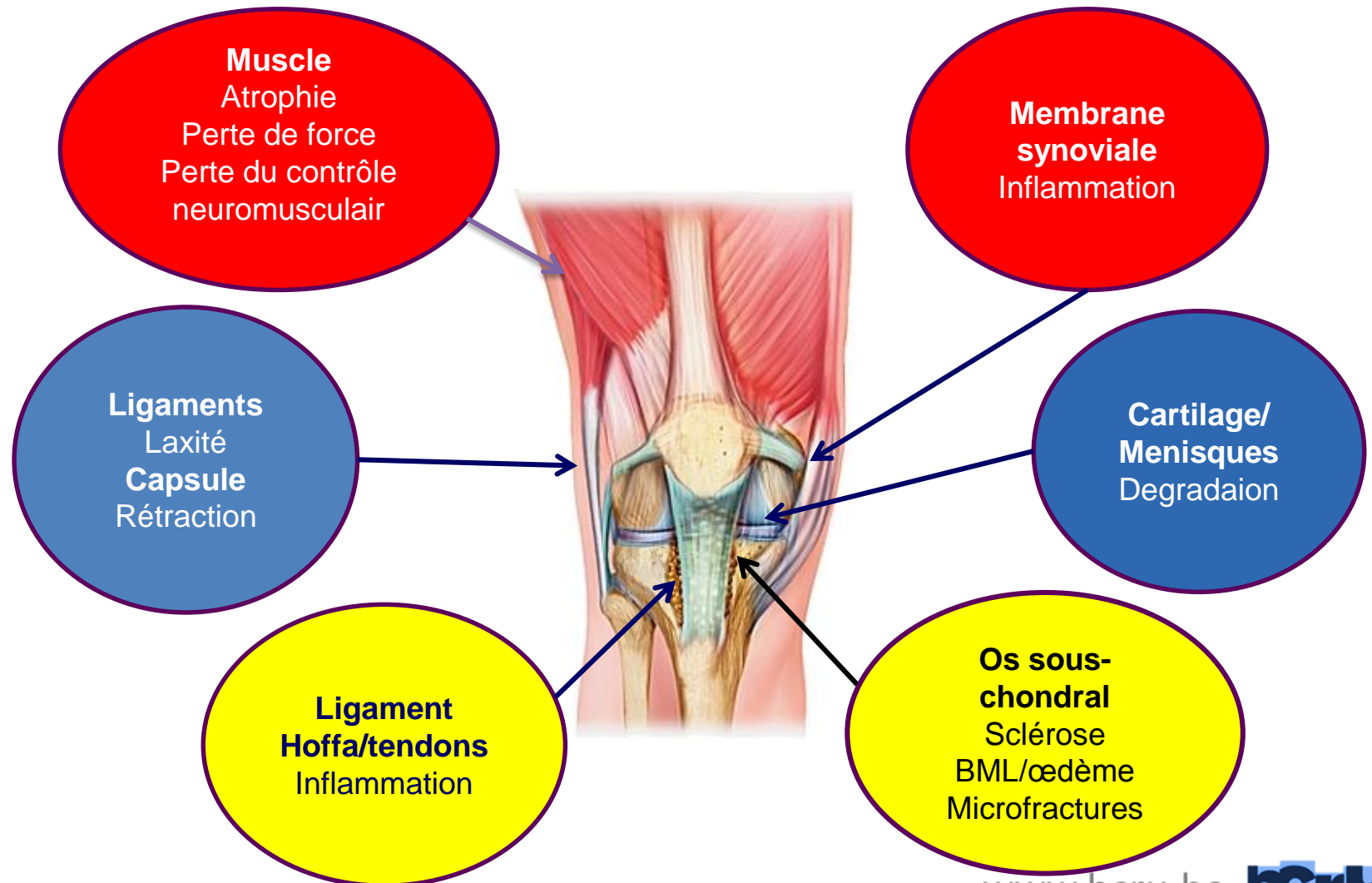


Arthrose

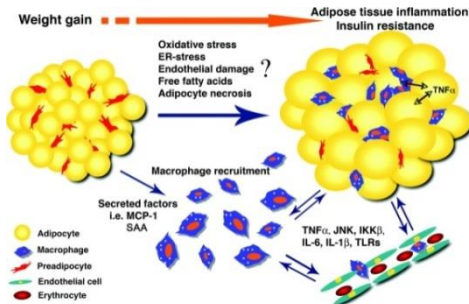




Acte IV: une maladie globale de l'articulation



ACT V: Une maladie métabolique et systémique



Adipokines
Cytokines



Chronic
Mechanical stress

Matrix peptides
Cytokines
Prostanoids
Oxidized lipids

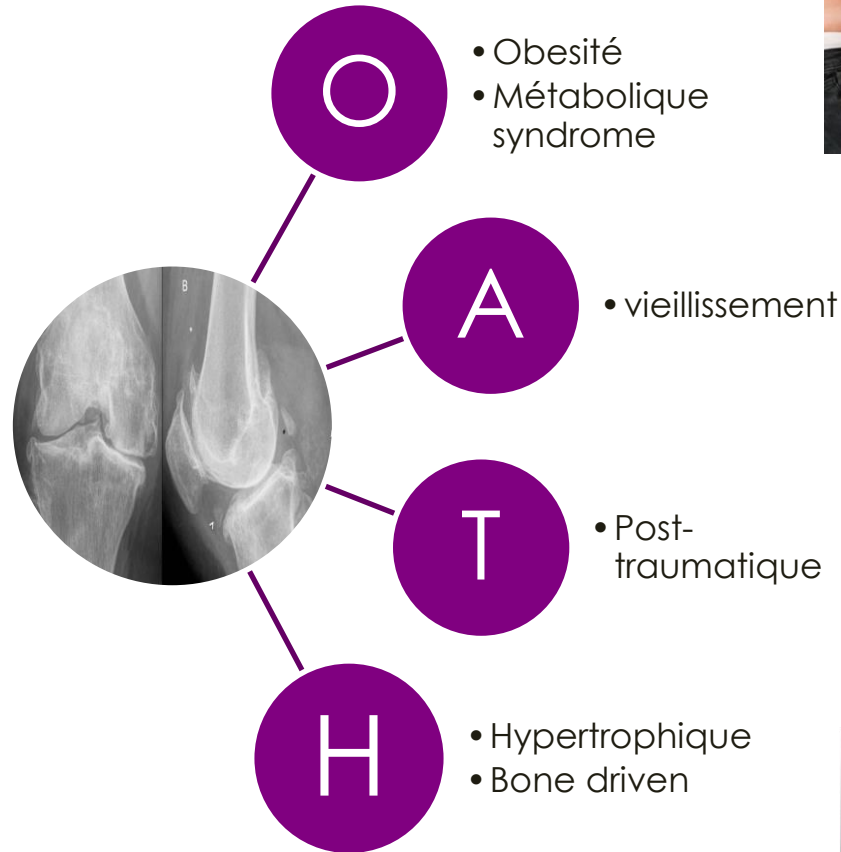
Chronic low-grade
inflammation



Metabolic syndrome
-Hypertension
-Type 2 diabetes
-Dyslipidemia



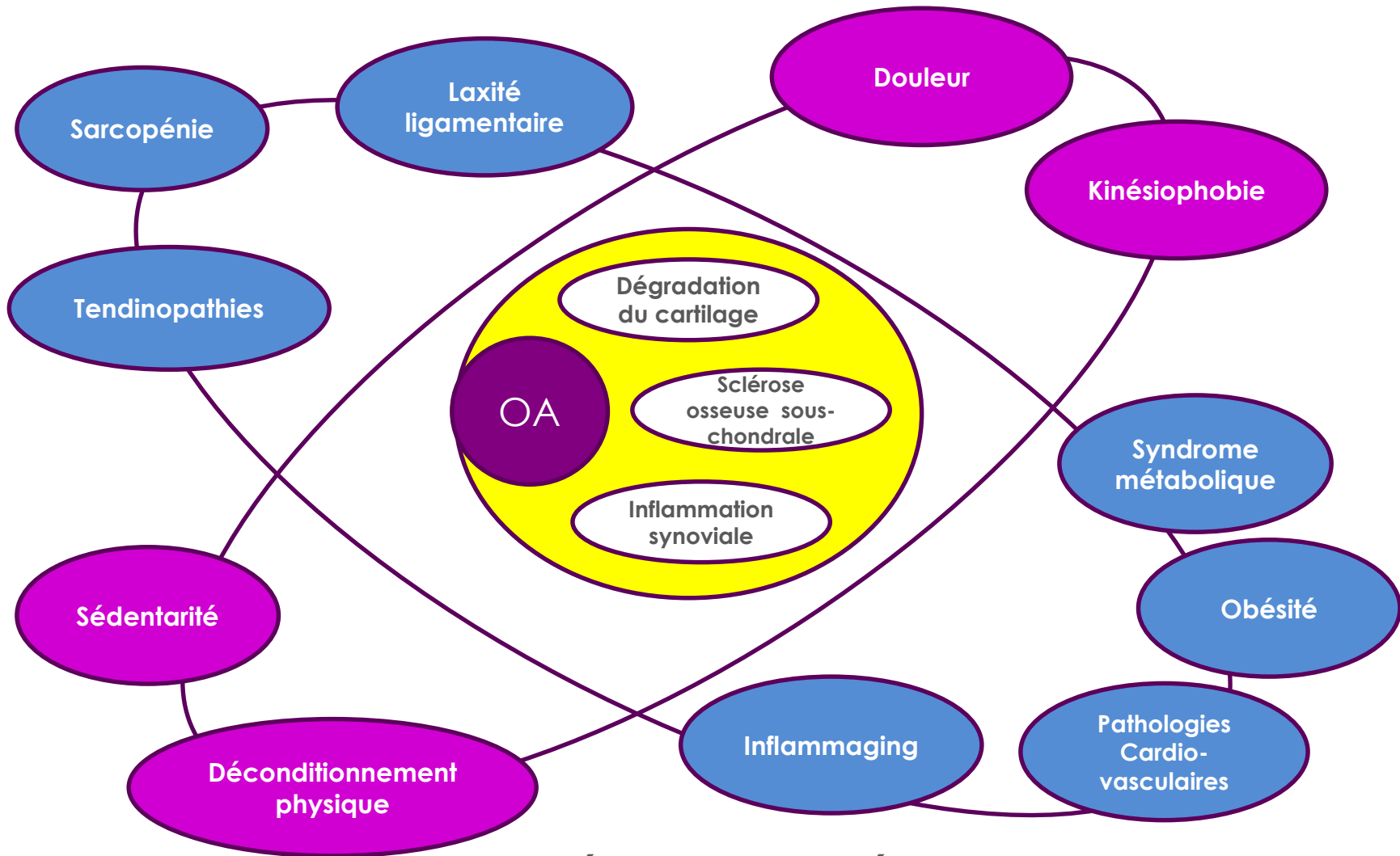
ACTE VI: Une maladie, plusieurs phénotypes





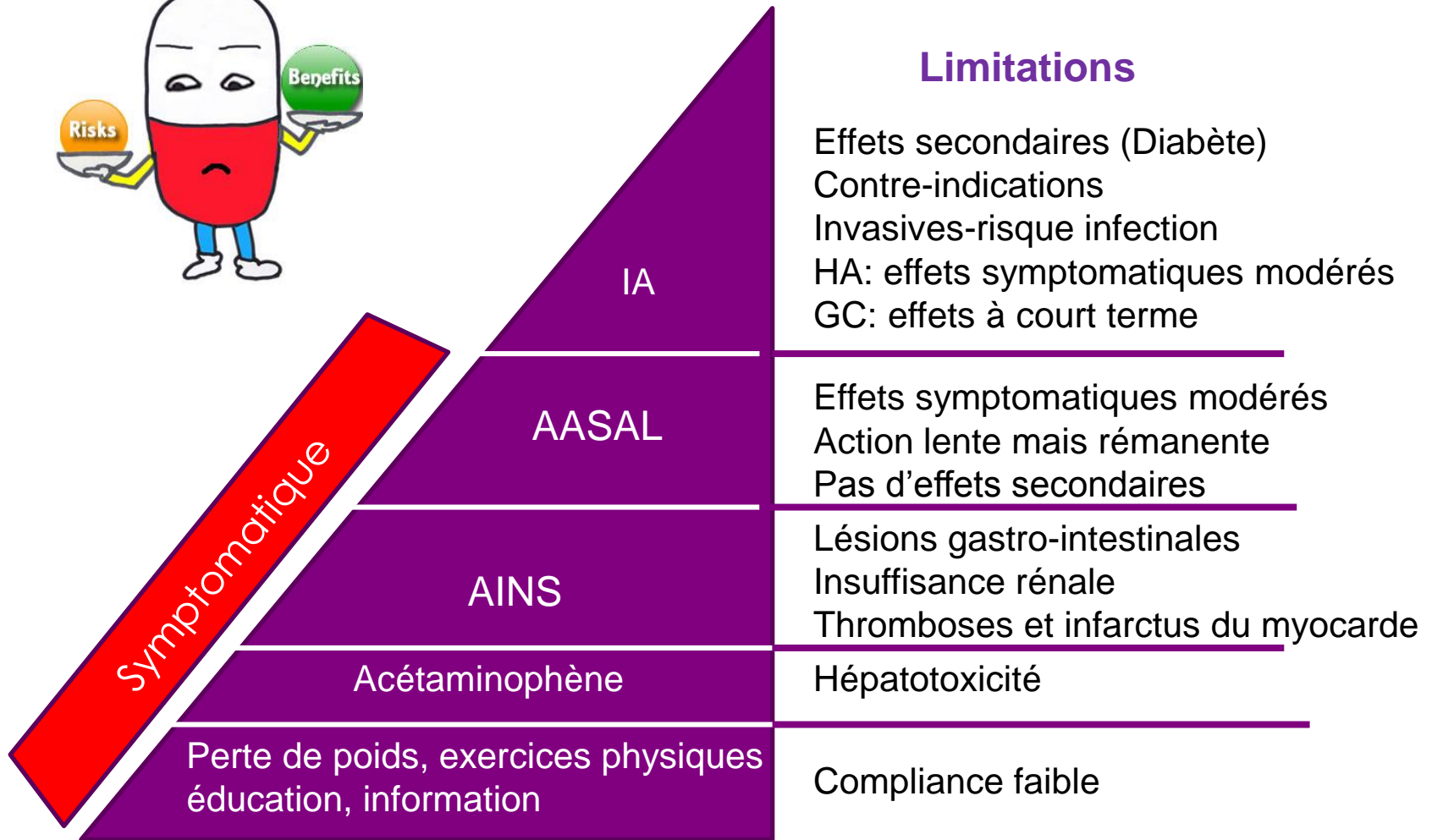
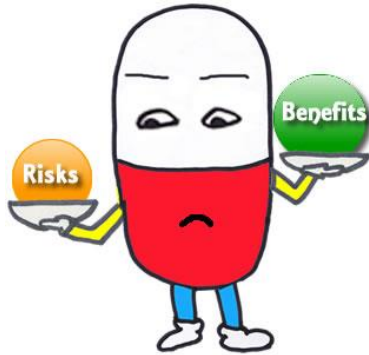
L'arthrose

Une maladie complexe et grave

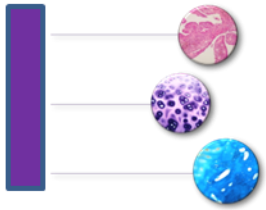


Représentation planétaire

Traitements non-chirurgicaux



Modified Clegg et al. Eur J Orthop Surg Traumatol, 2013



Un diagnostic trop tardif!



Trop tard



Génétique



Sanguins



RMN



Radiographie



Prédisposition **Phase silencieuse**



Marqueurs génétiques



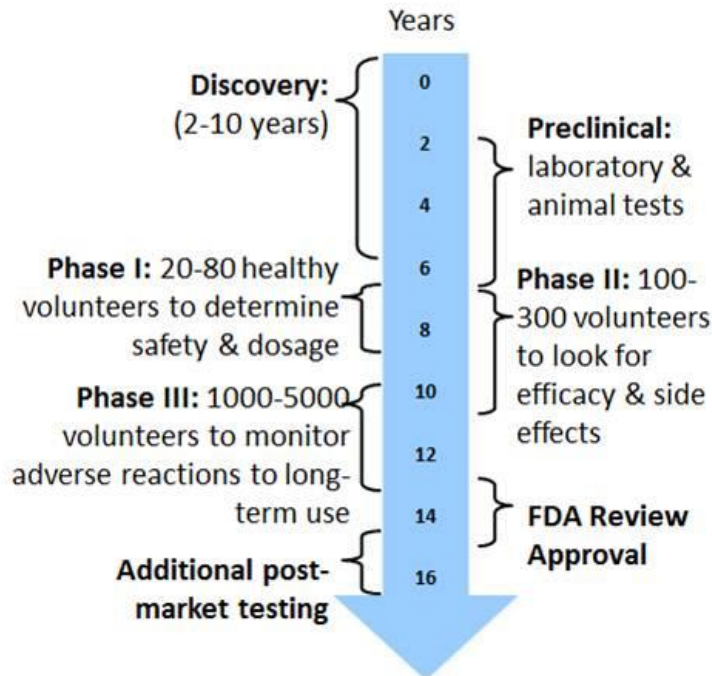
Changements métaboliques précoces



Marqueurs biologiques

Le développement des médicaments est long...trop long

R&D is risky & costly



Nothing new to offer at the patients and the OA research community



Critères principaux d'efficacité

- **Action symptomatique** (3 à 6 mois)

Douleur (EVA)

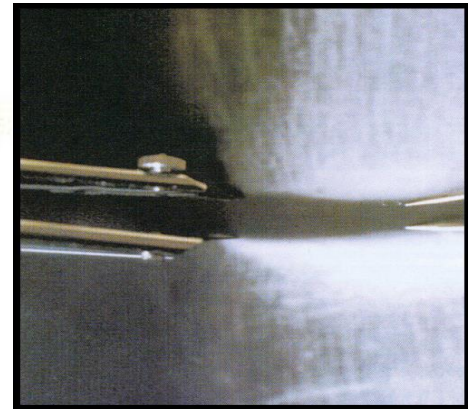
Statut-algofonctionnel (index Lequesne)

Appréciation globale du patient

- **Action structurelle** (1 à 3 ans)

Radiographie standard

Pincement minimal



Limites de la mesure du pincement articulaire

- Mesure indirecte de cartilage.
- Ne mesure pas un processus dynamique.
- Influencé par les lésions méniscales.
- Peu sensible.
- Peu reproductible.
- Peu ou pas corrélé avec la douleur ou la fonction.



Mais aussi....

- Une méconnaissance des phénotypes de la maladie
- L'absence d'un suivi personnalisé du malade



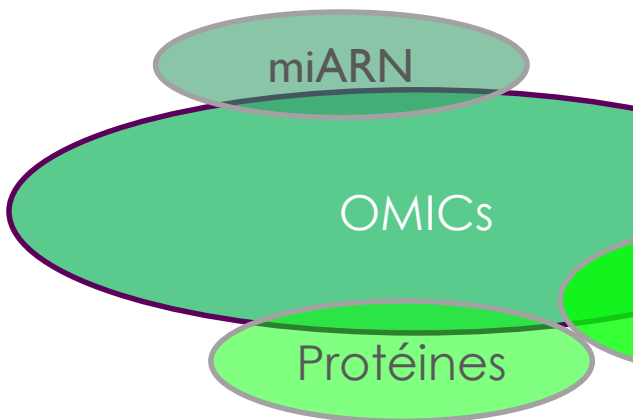
Marqueurs biologiques

Définition

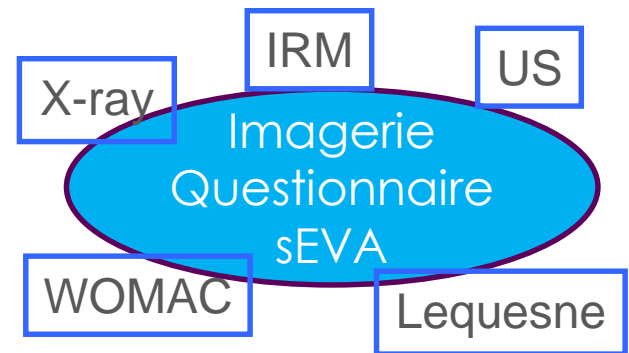
«Un biomarqueur est une caractéristique qui est mesurée et évaluée de manière **objective** comme un indicateur des processus physiologiques, pathologiques ou de la réponse à un traitement»

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

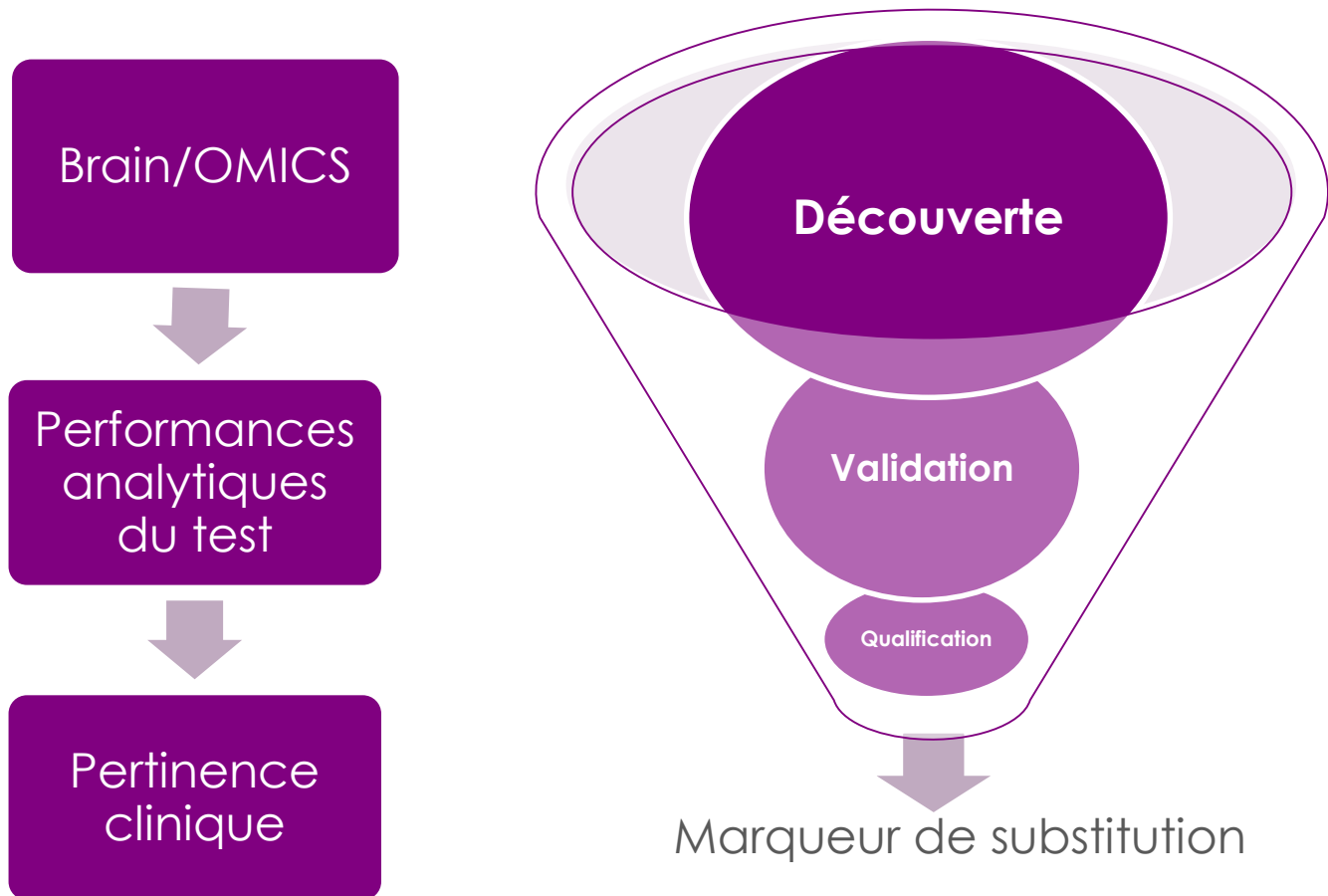
Soluble or « wet » biomarkers



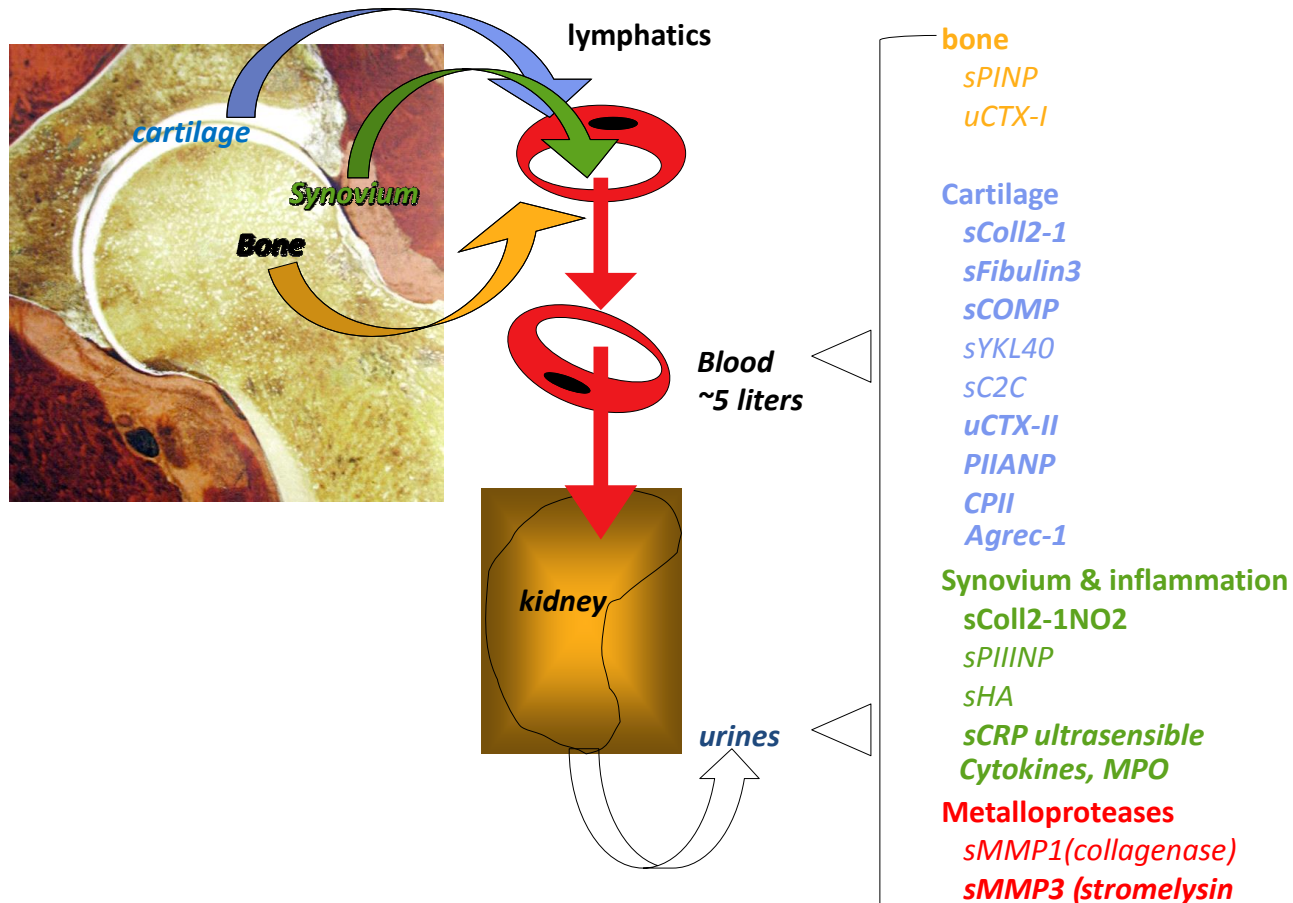
« Dry » biomarkers



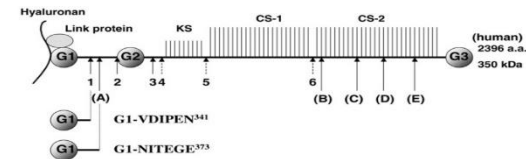
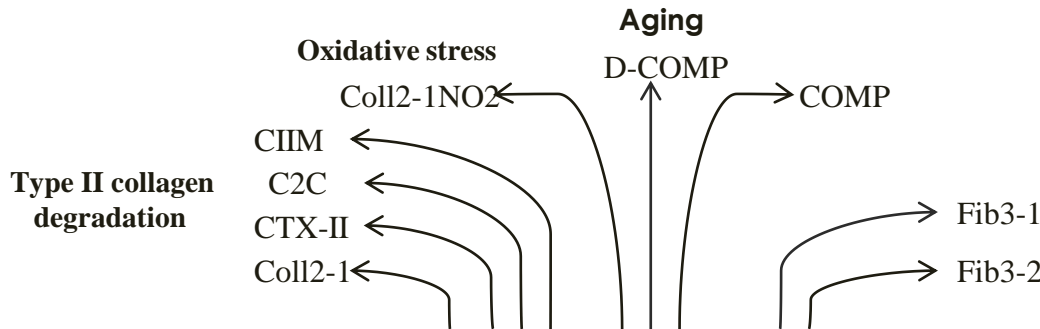
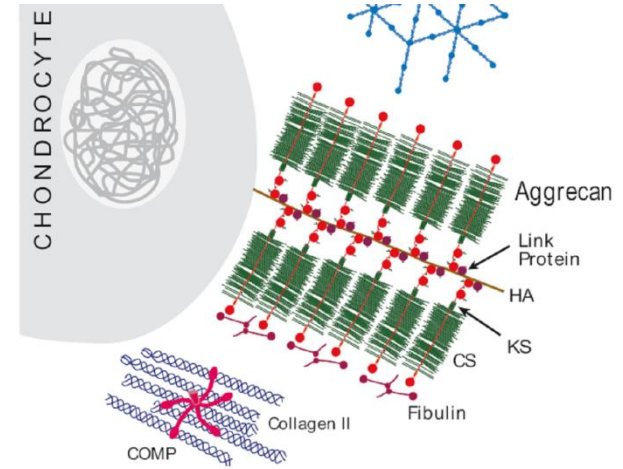
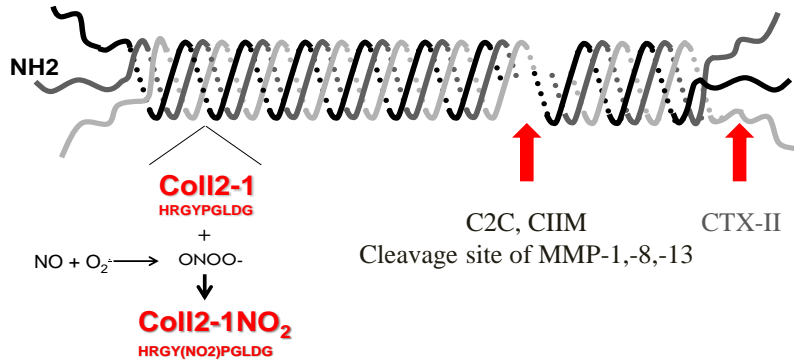
Développement



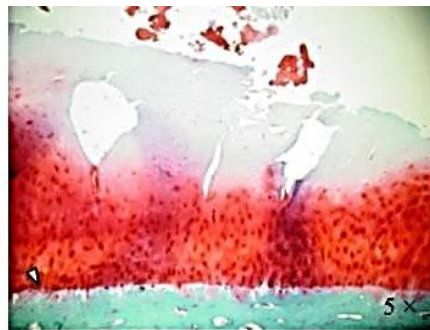
OA Biomarkers



Biomarkers of cartilage metabolism



Type II collagen synthesis
 PIINP ←
 PIICP ←

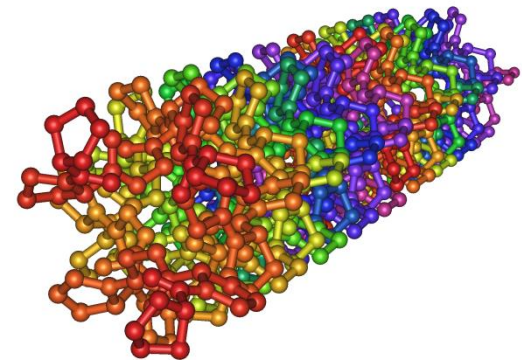


ARGs → **Aggrecan degradation**
 NITEGE → **Aggrecan degradation**
 CS-846 → **Aggrecan turnover**
 KS → **Aggrecan turnover**

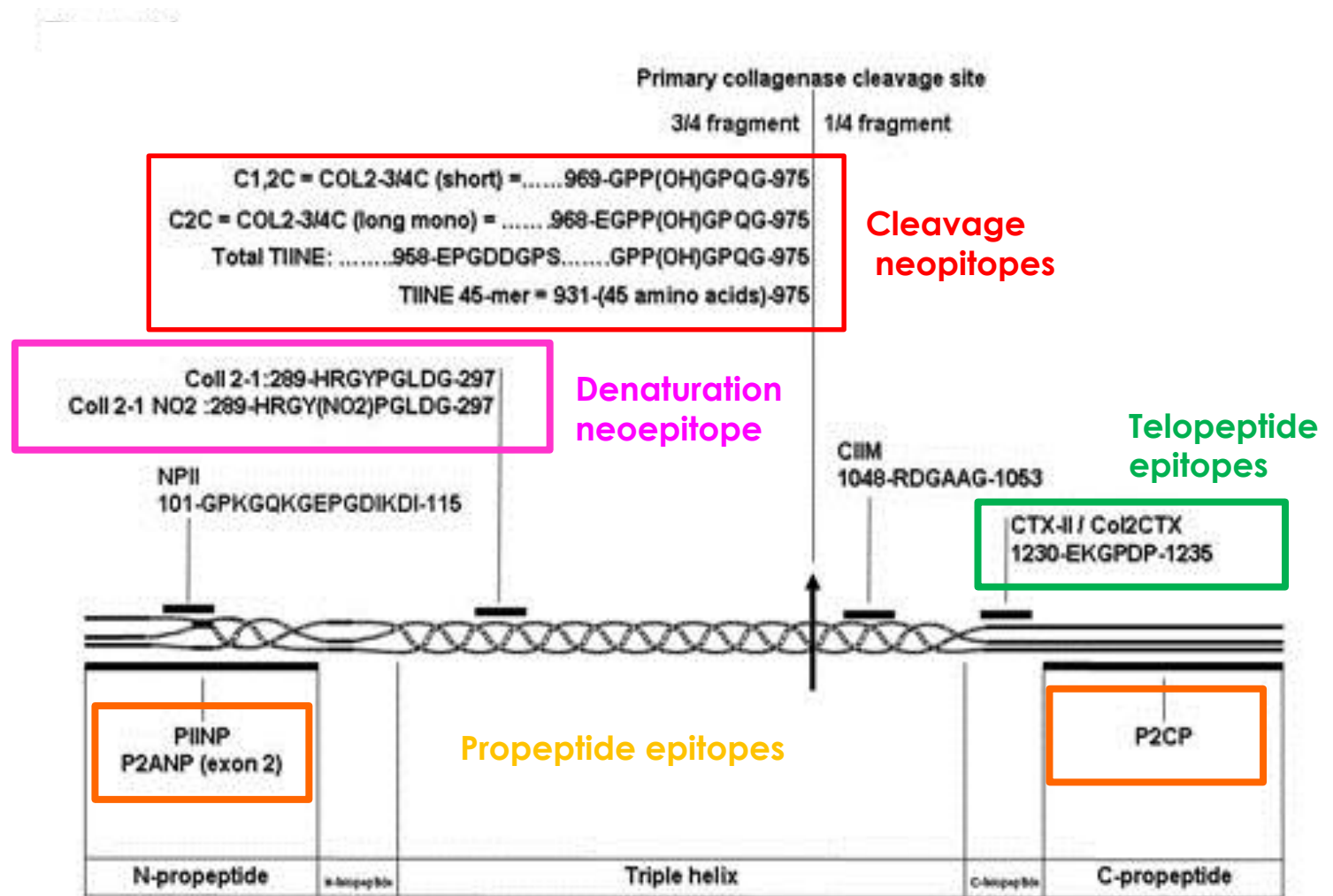
ADAMTS-5

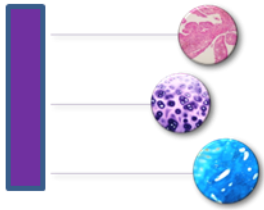
Pourquoi la recherche de biomarqueurs s'est-elle focalisée sur le collagène de type II?

- La protéine la plus abondante du cartilage
- Spécifique du cartilage articulaire
- Représente seulement 1% des collagènes
- La dégradation du collagène de type II est une étape clé de la pathogénie de l'arthrose



Type II collagen 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

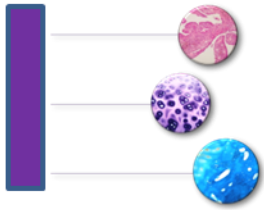
Diagnostic

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

Safety

- Biomarqueurs qui identifient les effets secondaires

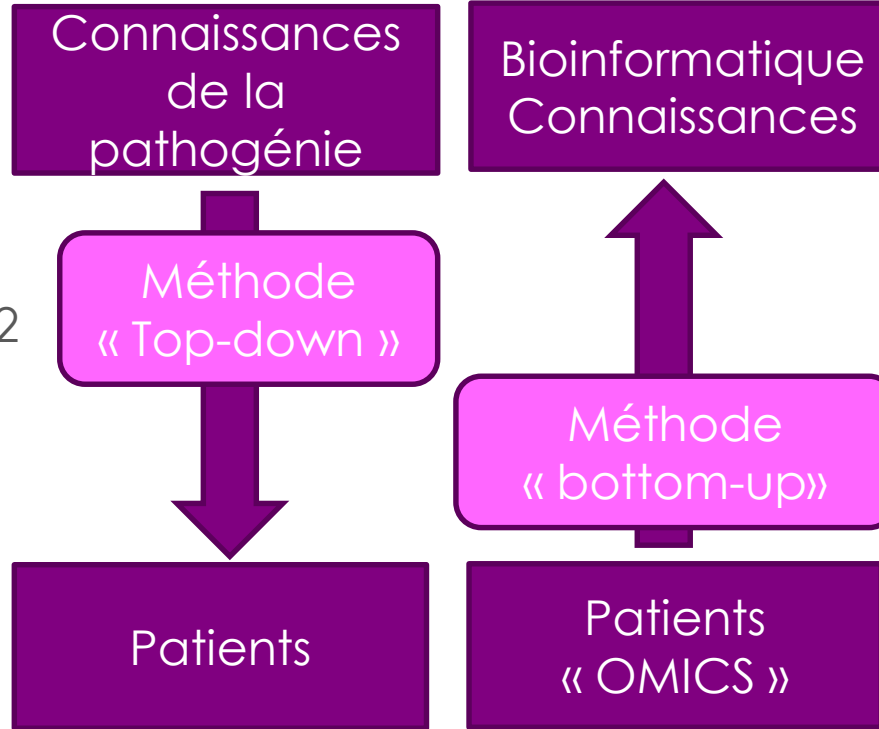
**Indicateurs de pertinence des marqueurs biologiques
dans le cadre de la recherche**



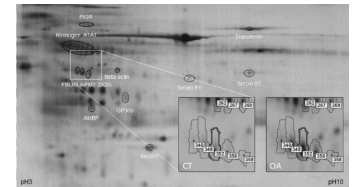
Découverte d'un nouveau marqueur biologique



Coll2-1 &
Coll2-1NO2



Fragments de
Fibuline-3

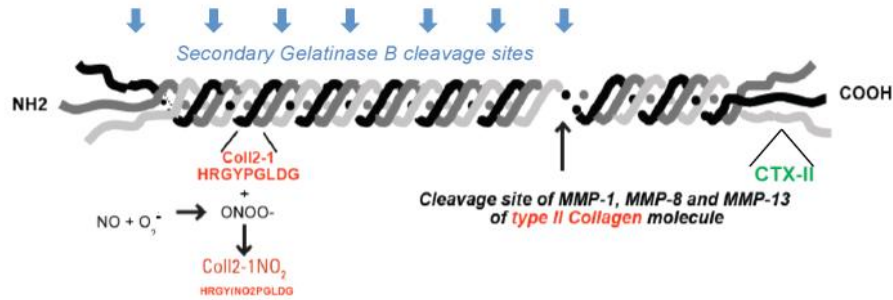


Detection of specific nitrated markers, Henrotin Y, Deberg M, Patents :
EP 1488240B1 validated in BE, DE, DK, ES, FR, GB, IT, SE. US 7,393,649B2; US 7,915,001B2; US 8,329,874B2.

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

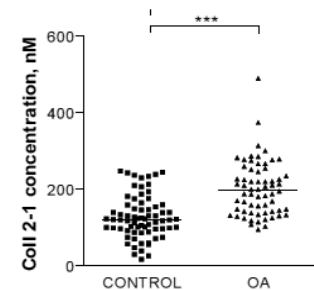
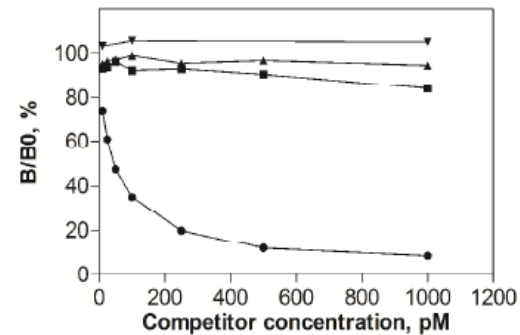
Connaissances

2

Dosage immunologique

3

Validation

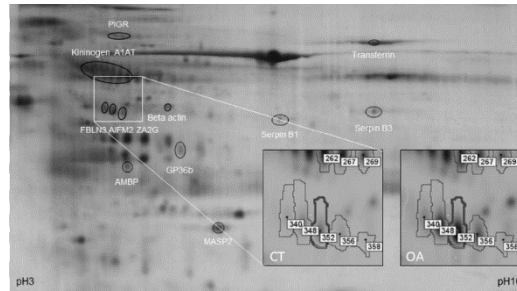


⇒ COLL2-1 is a degradation marker

Méthode Bottom-up Fibuline-3 fragments

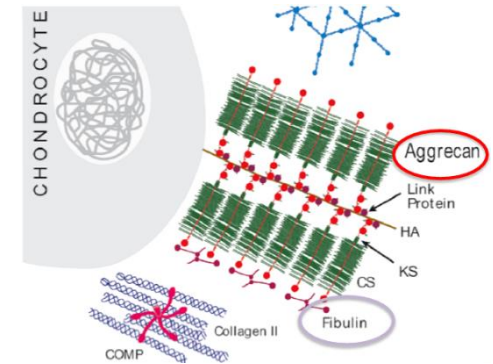
1

Identification
Protéomique



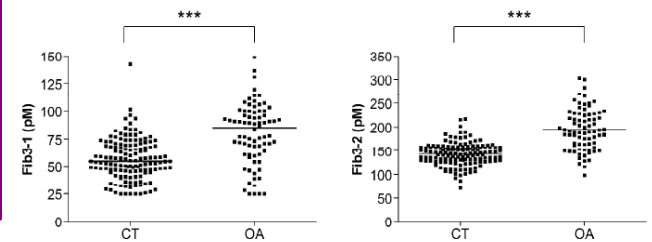
2

ID/sequencing
Bioinformatique
Connaissances



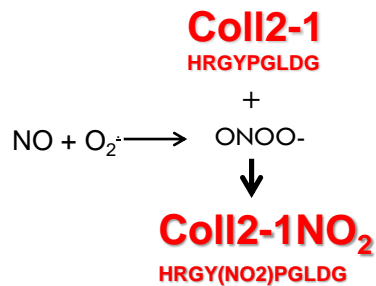
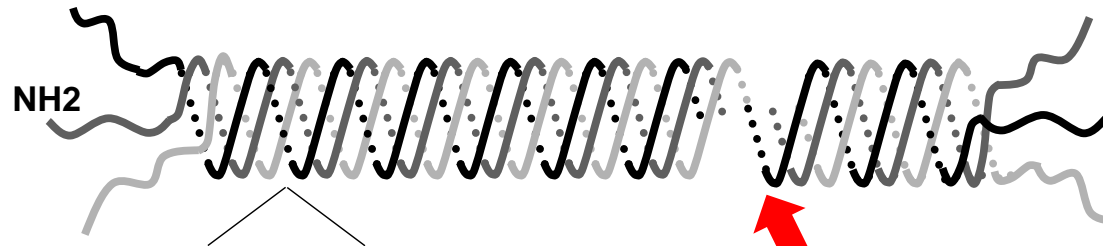
3

Dosage
immunologique
Validation



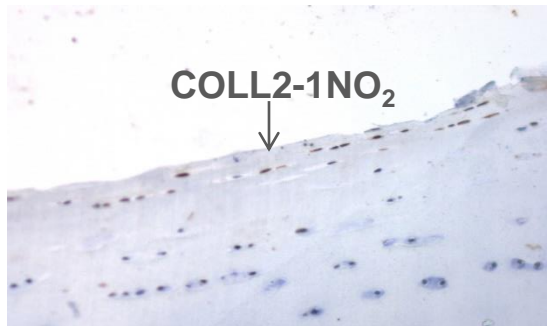
Méthode top-down: Coll2-1 et Coll2-1NO₂

Deberg et al. O&C 2008



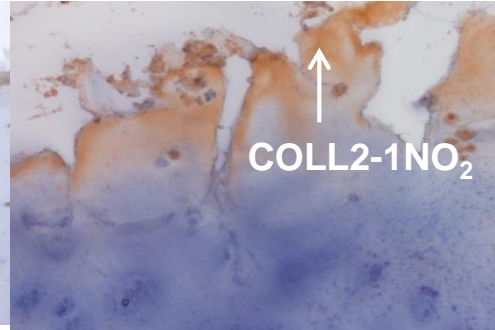
Cleavage site of MMP-1, MMP-8 and MMP-13
of **type II Collagen** molecule

CARTILAGE normal

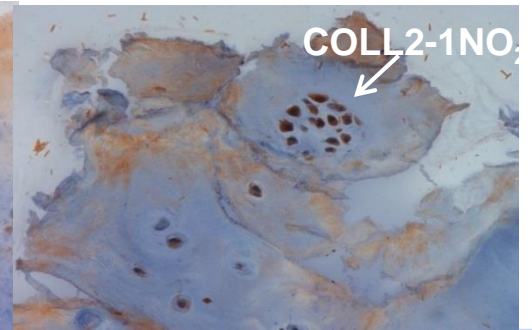


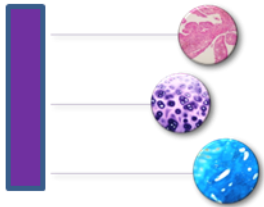
CARTILAGE arthrosique

FIBRILLATION ZONE



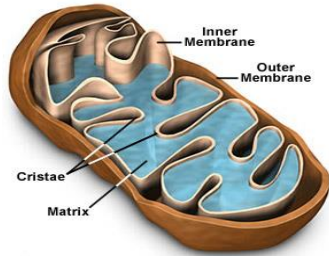
CELL CLUSTER ZONE



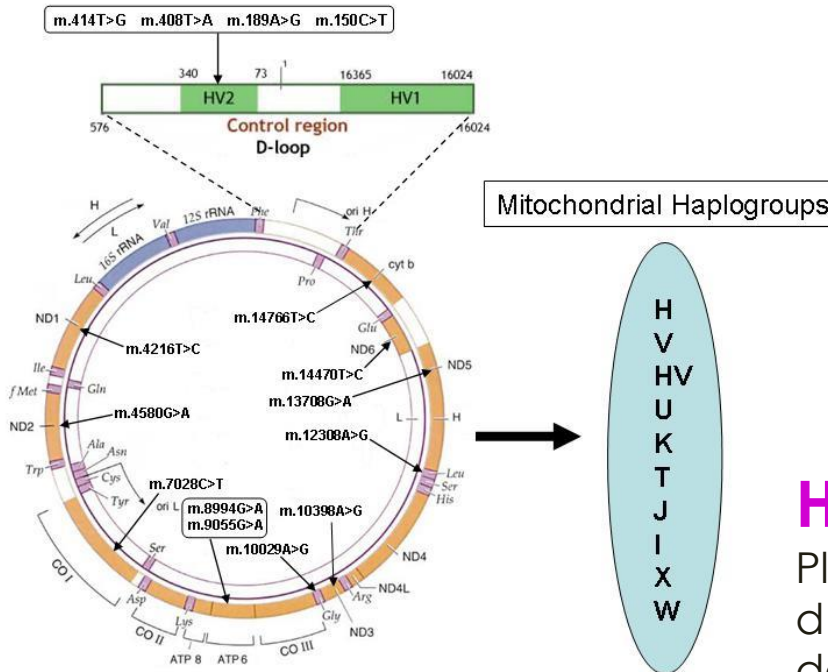


Coll2-1 & Coll2-1NO2 marqueurs de Diagnostic des phénotypes OA

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

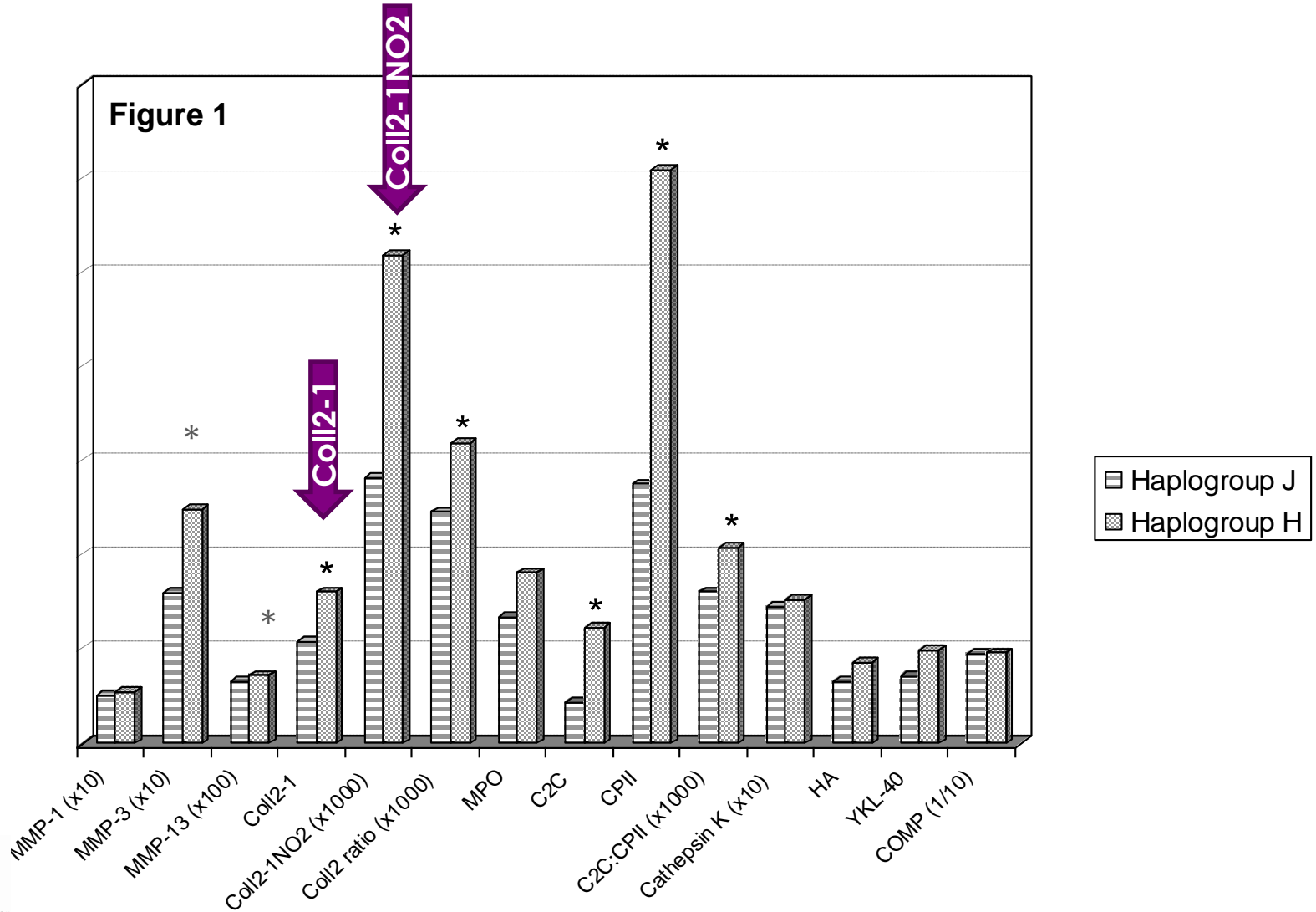


Haplogroups J

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



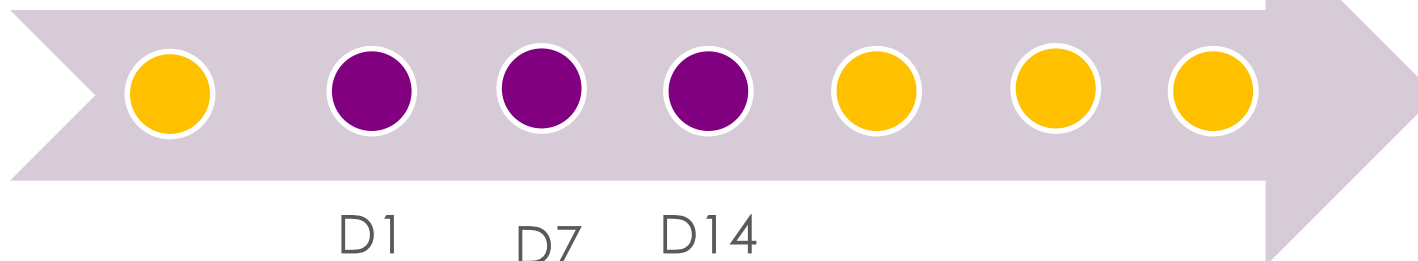
Coll2-1 & Coll2-1NO2: marqueurs de Diagnostic



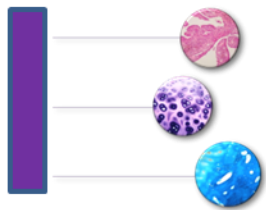
Etude BIOVISCO

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)

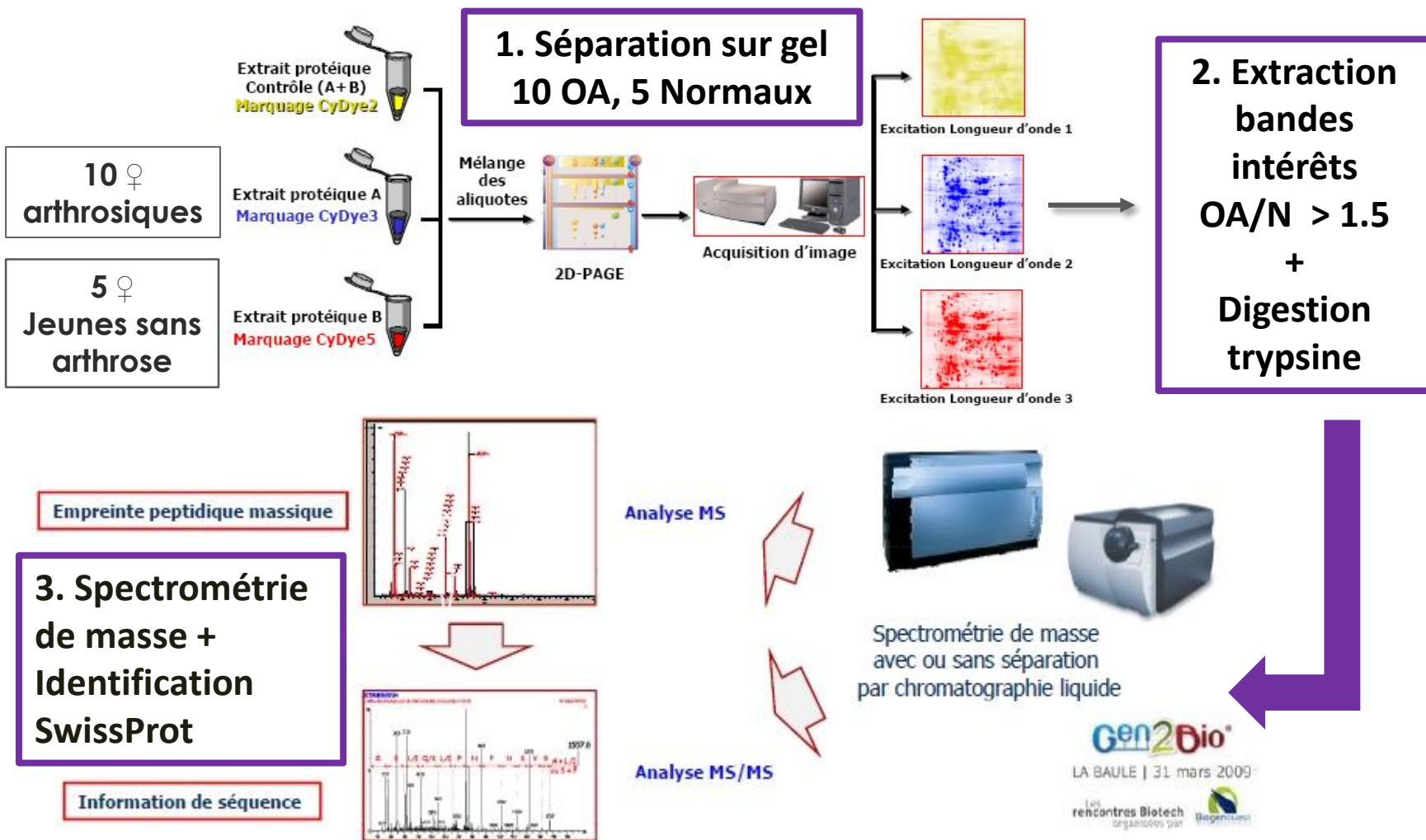
- Production d'anticorps polyclonaux
- Dosage immunologique

4. Qualification

- Etude transversale (diagnostic)
- Critères BIPEDS

1. Identification

Analyse protéomique urine



Gharbi et al, Front Physiol 2011



2. La sélection

Quelques protéines remarquables

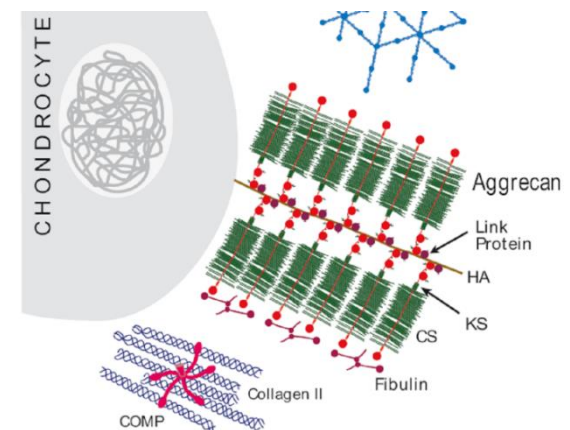
40 protéines avec un rapport OA/N > 1,5

Rapport d'abondance OA/N	Nom de la protéine	Signification statistique Valeur de p
4,1	β -actine	P < 0,0001
2,2	α 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- α -2-glycoprotein precursor	P<0,001

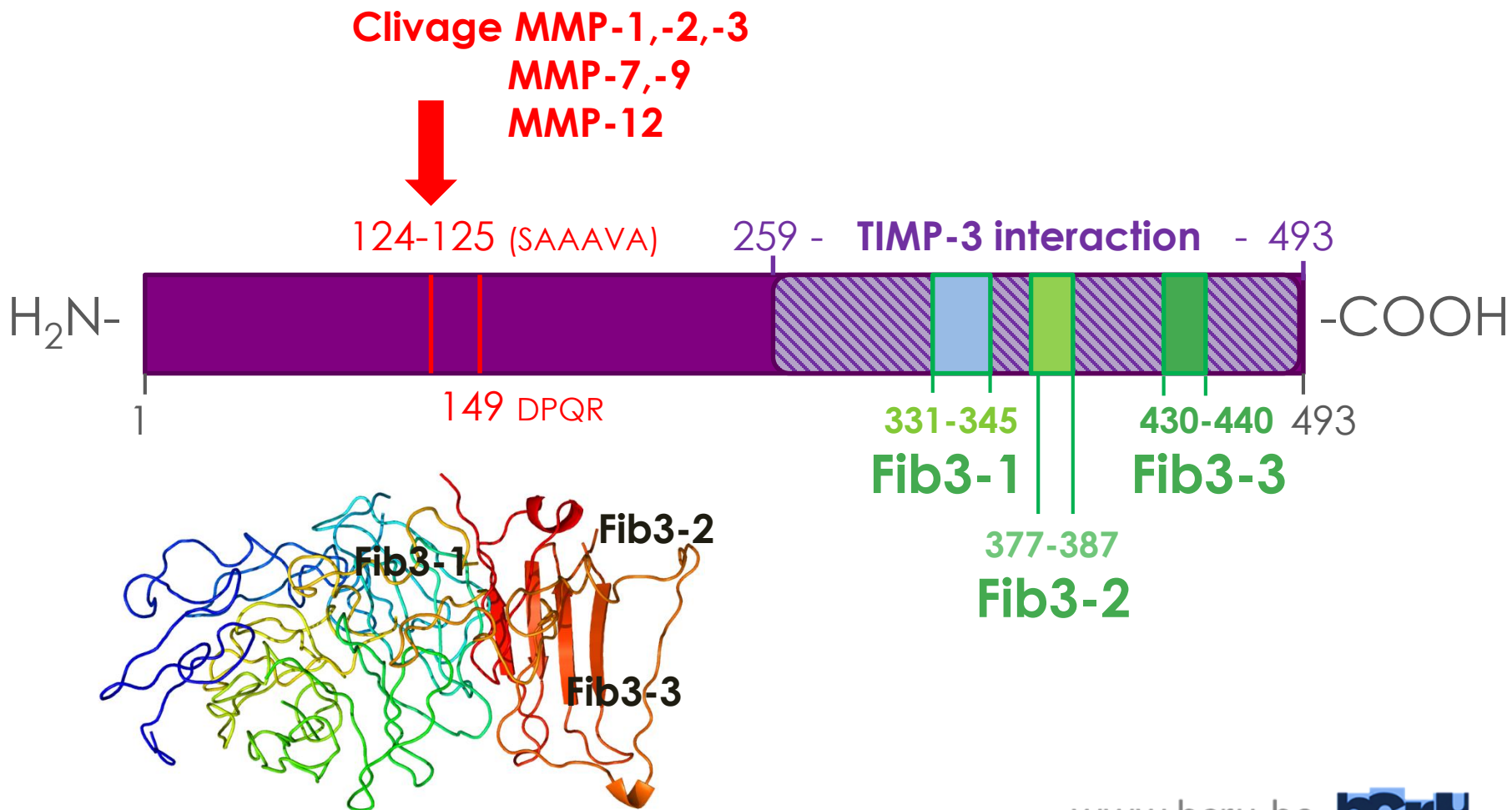
La fibuline-3 (EFEMP1)

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'angiogénèse
- Formation des fibres élastiques



Fibuline-3 epitopes

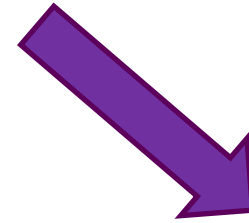


3. Le dosage

Production d'anticorps

Fib3-1: **TCQDINECETTNECR**

Fib3-2: **CVCPVSNAMCR**

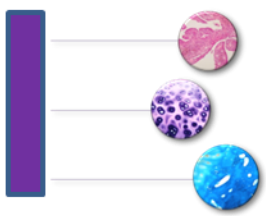


Immunodosage
Immunohistochimie



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





Localisation de Fib3-1 and Fib3-2 par immunohistochimie

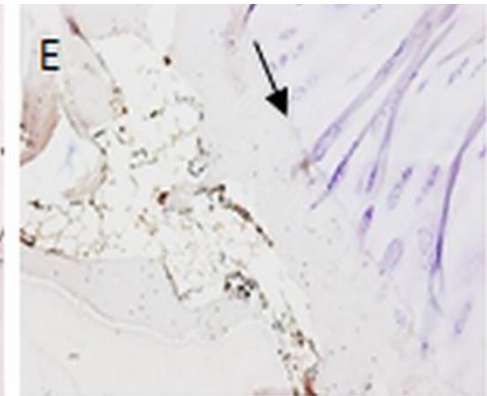
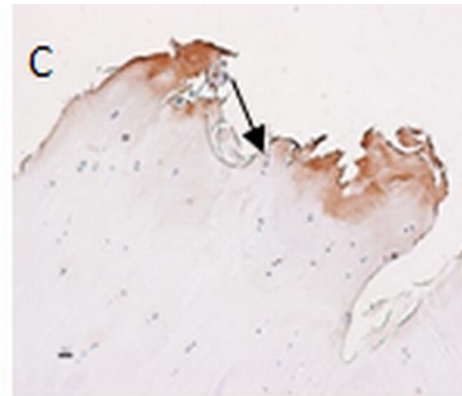
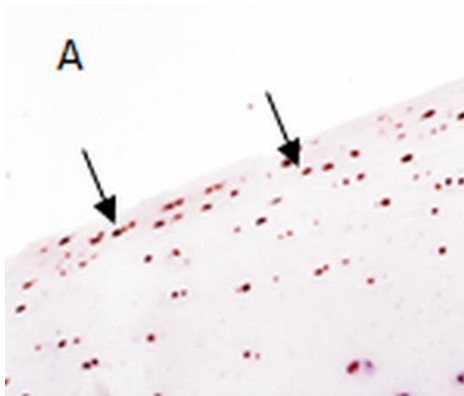
Henrotin et al. Arthritis Rheum, 2013

Normal

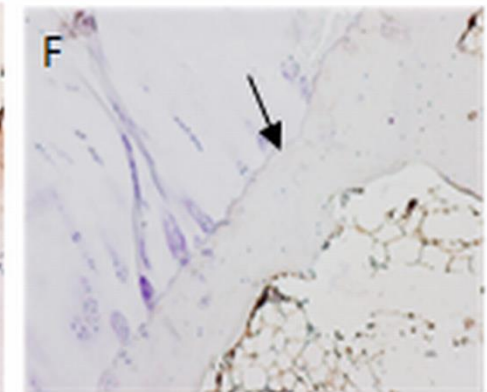
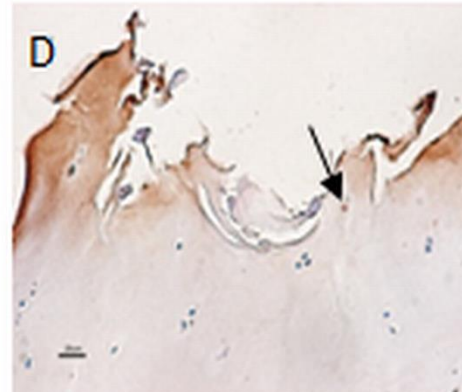
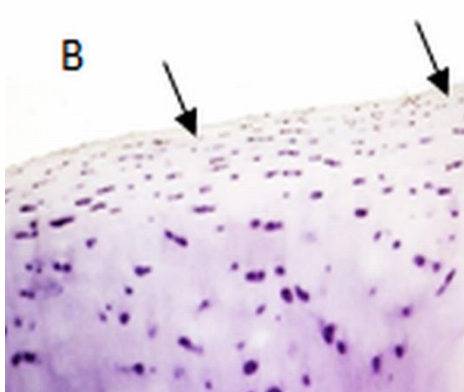
Arthrosique
surface

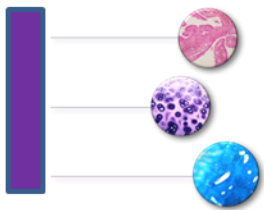
Arthrosique
Zone profonde

Fib3-1



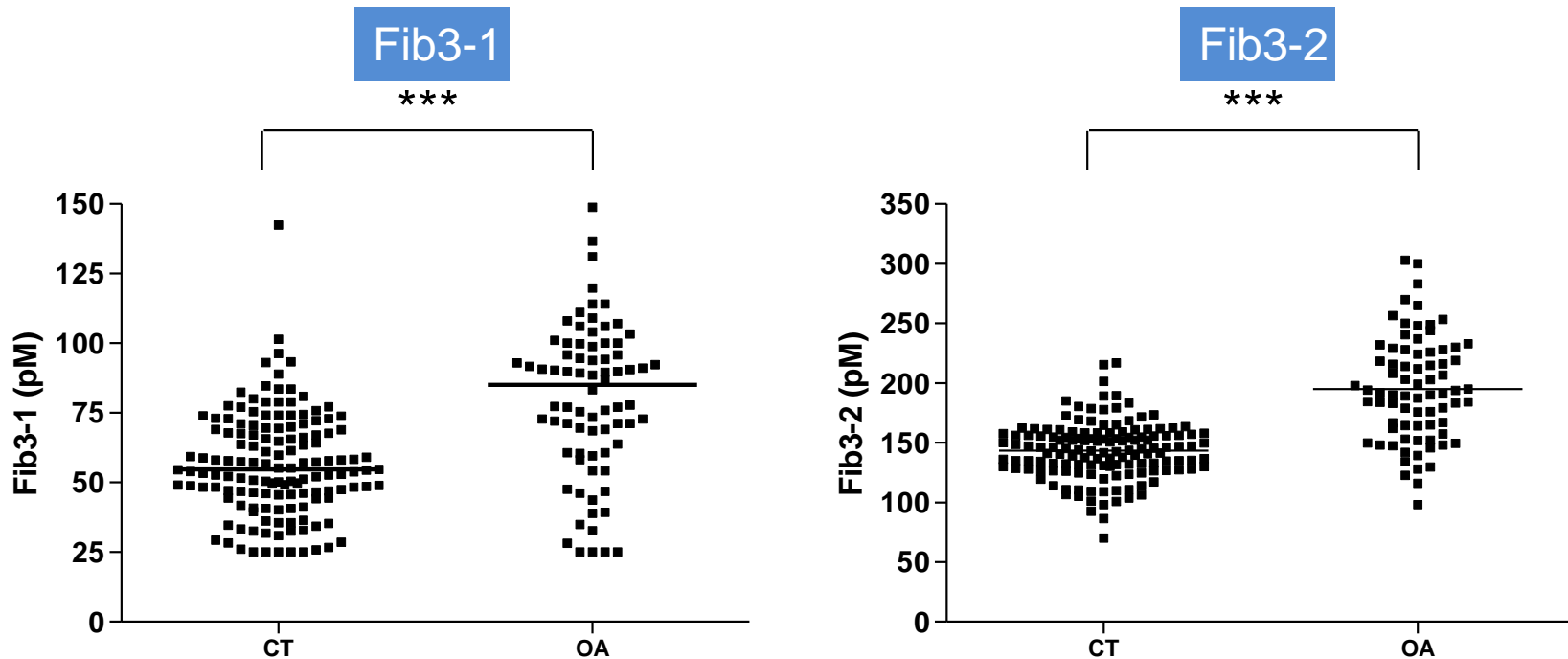
Fib3-2





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

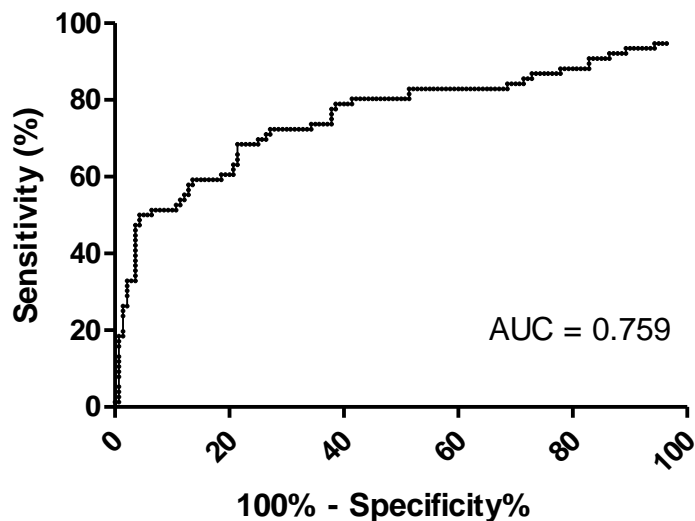
Fib3-1 et Fib3-2 ne sont pas corrélés



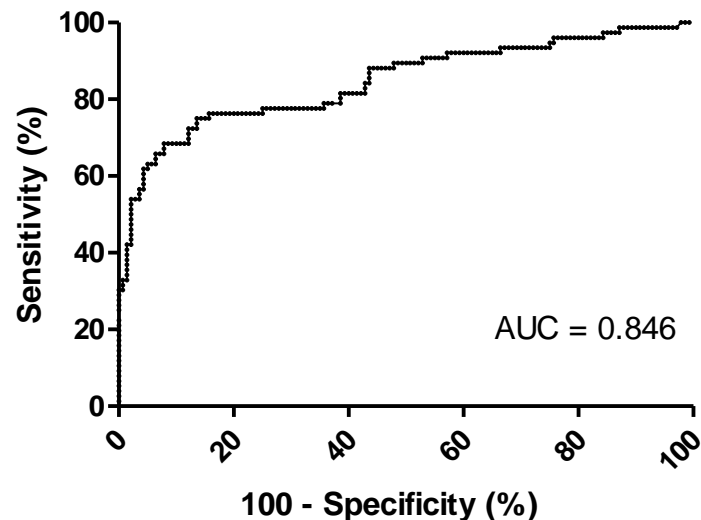
Fib3-1 et Fib3-2 : des marqueurs de Diagnostic de l'arthrose du genou

(Henrotin et al. Arthritis Rheum, 2013)

Fib3-1: ROC curve



Fib 3-2:ROC curve



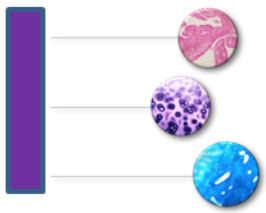
	Sensibility	Specificity
Fib3-1 (cut-off: 71.1 pM)	78.5%	68.4%
Fib3-2 (cut-off: 163.7 pM)	75.0%	86.4%



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

Runhaar et al. O&C 2015

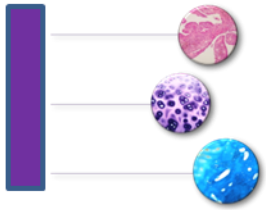
- Cohorte « Proof »
- 407 Femmes (patientes à risques)
- Age: 50-60 ans
- IMC : ≥ 27 kg/m²
- Pas d'arthrose clinique ou radiologique du genou à l'inclusion
- 30 mois de suivi



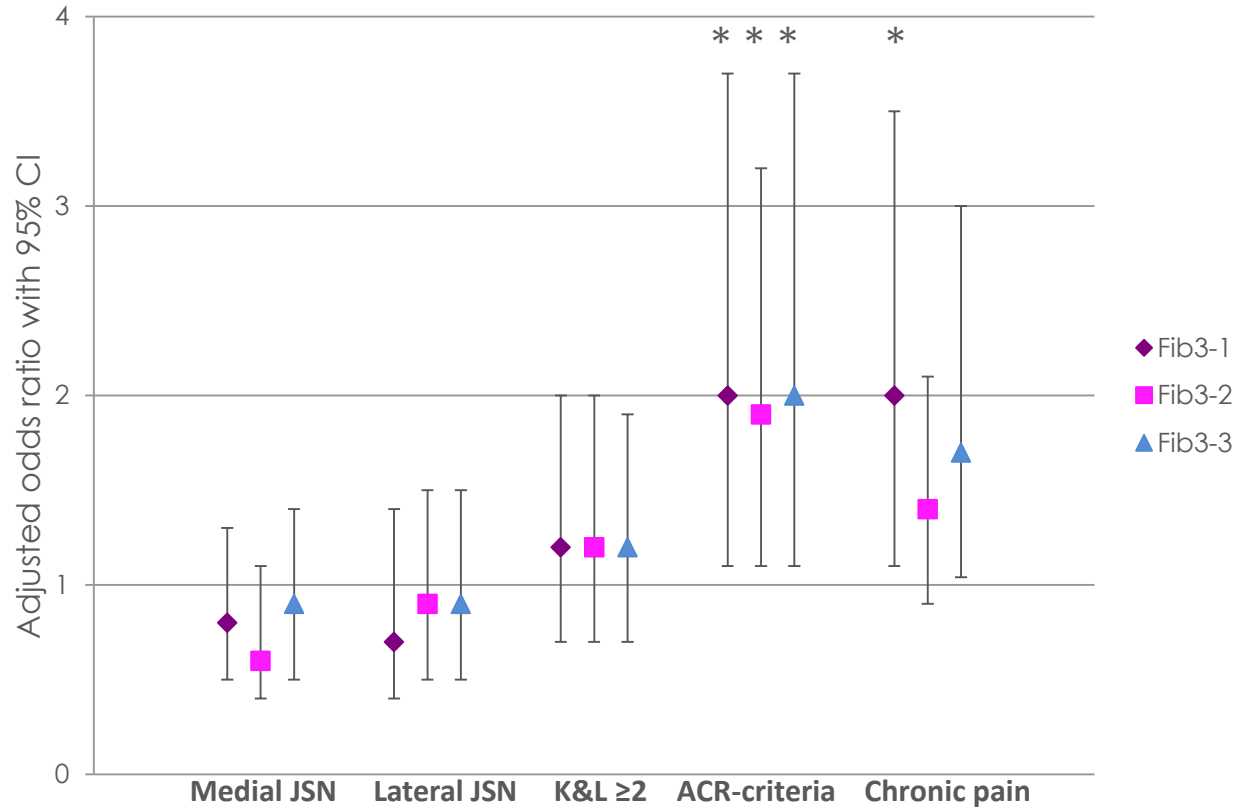
« Proof »

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%)

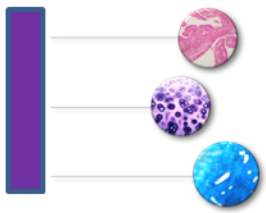


Fib3-1 & Fib3-2 prédictifs de l'incidence de la gonarthrose (ACR)



The long and winding road...





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

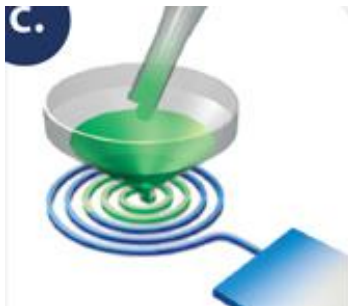
L'avenir!





L'avenir

- Développement de multiplex
- Intégration des marqueurs dans des algorithmes décisionnels
- Développement de nouvelles technologies adaptées à la médecine de « précision »





Fondation contre l'Arthrose

Fondation privée créée en 2015

L'arthrose. Ca nous concerne tous!

Pour tout don un seul n° : BE 38 0017 6370 0072



Bone and Cartilage Research Unit



International collaborations: **Merci!**

- F Blanco (La corona, 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)
- F Rannou (Paris, France)
- J Guicheux (Nantes, France)

