

PROTOCOLE POLAR (Profil Oligoclonal des LARmes)

*L'apport de l'isoélectrofocalisation des larmes pour le diagnostic de
Sclérose en Plaques chez les patients présentant un syndrome clinique isolé
(SCI) avec ou sans lésion à l'IRM.*

POLAR (Profil OLigoclonal des LARmes)

N° Protocole	N° IDRCB/N° EudrACT
RC-P0021	«2011-A01269-32»

Promoteur :

Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille (GHICL).

Investigateur coordonnateur : Pr Gérard Forzy

Adresse : Laboratoire de Biochimie, Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille (GHICL), 115 rue du Grand But, BP 249, 59 462 Lomme cedex

Téléphone : 03 20 22 50 12 ou 54 42

Courriel : forzy.gerard@ghicl.net

Direction de la recherche médicale : Dr Catalina Iliescu

Adresse : GHICL, Hôpital Saint-Philibert, 115 rue du Grand But, BP 249, 59462 Lomme cedex

Téléphone : 03 20 22 52 69

Courriel : iliescu.catalina@ghicl.net

Méthodologiste : Dr Catalina Iliescu

Direction de la Recherche GHICL : Dr Catalina Iliescu

Biostatistique : Cellule de Biostatistique du GHICL/FLM (Professeur Gérard Forzy) en collaboration avec la cellule de promotion de la DRM du GHICL (Pr Cristian Preda).

Adresse : Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille (GHICL), Hôpital St Philibert, 115 rue du grand But, BP 249, 59462 Lomme Cedex.

Investigateurs :

Centres	Investigateurs	Téléphone	Courriel
Lille GHICL	Pr Forzy Pr Hautecoeur Dr Bilbault Dr Calais Dr Kwiatkowski	0320874901	Forzy.gerard@ghicl.net hautecoeur.patrick@ghicl.net bilbault.nicolas@ghicl.net gauthier.calais@ghicl.net arnaud.kwiatkowski@ghicl.net
Lille CHRU	Pr Vermersch Dr Zephir	0320445765	pvermersch@chru-lille.fr hzephir@chru-lille.fr
Caen	Pr Defer Dr Allouche	0231064621 0231065419	defer-gi@chu-caen.fr allouche-s@chu-caen.fr
Nice	Dr Lebrun-Fresnay	0492038754	lebrun.c@chu-nice.fr
Strasbourg	Pr De Sèze	0388116229	jerome.de.seze@chru-strasbourg.fr
Dijon	Pr Moreau	0380293089	thibault.moreau@chu-dijon.fr
Clermont-Ferrand	Pr Clavelou	0473752200	pclavelou@chu-clermont-ferrand.fr
Poissy	Dr Heinzlef	0139274185	oheinzlef@chi-poissy-st-germain.fr
Lyon	Pr Confavreux	0472681313	christian.confavreux@chu-lyon.fr
Nancy	Dr Debouverie	0383851275	m.debouverie@chu-nancy.fr
Marseille	Pr Pelletier	0491385939	jean.pelletier@mail.ap-hm.fr
Bordeaux	Pr Brochet	0556795521	bruno.brochet@chu-bordeaux.fr
Nantes	Dr Wiertlewski	0240165212	sandrine.wiertlewski@chu-nantes.fr
Valenciennes	Dr Verier	0327143532	verier-a@ch-valenciennes.fr
Rouen	Dr Bourre	0232883399	bertrand.bourre@chu-rouen.fr

Comité Scientifique :

- Professeur Gérard Forzy du Laboratoire de biologie du GHICL
- Professeur Patrick Hautecoeur chef de service Neurologie du GHICL
- Dr. Stéphane Allouche du laboratoire de biologie du CHU de Caen
- Dr. Bernadette Hennache du laboratoire du CHRU de Lille
- Dr. Catalina Iliescu, directrice de la recherche médicale du GHICL
- Mr.Foued Derraz (Enseignant-chercheur) de la Faculté Libre de Médecine de l'université catholique de Lille (responsable de l'analyse d'images)
- Professeur Christian Confavreux du CHU de Lyon.

Logistique de l'étude :

Attachés de recherche Clinique du GHICL : Direction de la Recherche Médicale

Ibrahima DIOP (diop.ibrahima@ghicl.net)

Thomas Broussaud (broussaud.thomas-ki-yong@ghicl.net)

Sommaire

1.Synopsis.....	6
2. Etat des lieux	8
2.1.Sclérose en plaques de forme rémittente-récurrente	8
2.2. Syndrome clinique isolé	8
2.3.L'analyse du liquide cérébro-spinal dans la sclérose en plaques.....	9
2.4.Hypothèse de travail : Analyse lacrymale dans la SEP.	14
3.Objectifs du protocole de recherche et les résultats attendus	16
3.1.Objectif principal.....	16
3.2.Objectifs secondaires.....	16
4.Méthodologie	17
4.6. Calcul du nombre de sujets nécessaires.....	18
4.7.Analyse statistique	18
5 Aspects médico-règlementaires et éthiques	19
5.1 Qualification juridique de l'étude	19
5.2. Promotion envisagée GHICL : Responsabilité du promoteur.....	19
5.3. Balance bénéfice/risque.....	19
5.4. CPP et autorités compétences.....	19
5.5 Contrôle et assurance de la qualité.....	20
5.6 Gestion des évènements indésirables	20
5.7 Traitement des données et conservation des documents et données relatives à la recherche	22
5.8 Contrat d'Assurance.....	23
6 Logistique de l'étude.....	24
6.1. La Direction de la Recherche Médicale du GHICL (Cellule de Promotion de la DRM).....	24
6.2. Les investigateurs dans les différents centres	26
6.3. Déroulement, lieu et durée de l'étude	28
6.4. Expérience de l'équipe dans le domaine.....	29
6.5. Recueil, conditionnement, transport, analyse, interprétation et conservation des prélèvements.....	29
6.6. Gestion et analyse des données	29
6.7. Rapport final et publication.....	30
6.8. Cahier d'observation	31

7. Financement de l'étude	31
8. REFERENCES	32
9. Annexes.....	35
9.1. Annexe 1 : Critères de McDonald révisés en 2005 pour le diagnostic de sclérose en plaques	35
9.2. Annexe 2 : Recueil des prélèvements.....	37
9.3. Annexe 3 : Conditionnement et transport des prélèvements.....	38
9.4. Annexe 4 : Analyse des prélèvements.....	38
9.5. Annexe 5 : Lecture des profils électrophorétiques	39
9.6 Conservation et destruction des prélèvements :	39
9.7. Annexe 6 : Fiche d'inclusion	41
9.8. Annexe 7 : Lettre d'information	43

PAGE DE SIGNATURE DU PROTOCOLE

Code interne de la recherche : RC-P0021

Titre : « ETUDE POLAR »

Version N° 5.2 du 29/03/2012

La recherche sera conduite conformément au protocole et aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur.

L'investigateur coordonnateur :

Pr Gérard Forzy
Laboratoire de Biologie Médicale
Hôpital St Philibert
115, rue du grand but, BP 249
59462 Lomme Cedex

Signature : 

Date : 26 / 5 / 2012

La Directrice de la DRM:

Dr Catalina Iliescu
Direction de la Recherche Médicale
GHICL-FLM Hôpital Saint Philibert
115, rue du Grand But BP 249
59462 Lomme Cedex

Signature : 

Date : 22 05 2012

1. SYNOPSIS

TITRE COURT	POLAR (Profil Oligoclonal des LARmes)
TITRE	L'apport de l'isoélectrofocalisation des larmes pour le diagnostic de Sclérose en Plaques chez les patients présentant un Syndrome Clinique Isolé (SCI) avec ou sans lésion à l'IRM
PROMOTEUR	Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille (GHICL)
TYPE D'ETUDE	Étude de recherche biomédicale, multicentrique, prospective
INVESTIGATEUR PRINCIPAL	Pr Gérard Forzy
OBJECTIF PRINCIPAL DE L'ETUDE	Evaluer l'intérêt des larmes dans les SCI, avec ou sans lésion à l'IRM, pour le diagnostic de la sclérose en plaques définie selon les critères de Mc Donald révisés en 2005 : Etude de la concordance entre le profil électrophorétique des larmes et celui du LCS.
OBJECTIFS SECONDAIRES DE L'ETUDE	<ul style="list-style-type: none"> - Recherche de profils électrophorétiques types et analyse de leurs performances sur le diagnostic de SEP à 2 ans de suivi (2 visites successives à 1 an d'intervalle). - Mise au point d'une technique de lecture automatique des BOC dans les larmes et le LCS (analyse de profil électrophorétique) - Calcul de la sensibilité/spécificité, valeur prédictive positive/négative, efficacité odds-ratio et rapports de vraisemblance
LIEU DE L' ETUDE	15 établissements de santé sur le territoire national
CRITERE D' EVALUATION PRINCIPAL	Test du coefficient de concordance entre l'analyse des larmes et l'analyse du LCS
CRITERES D'INCLUSION	<ul style="list-style-type: none"> • Patient de plus de 18 ans, • Présentant un SCI, datant de moins de 3 mois, • Patient ayant signé un consentement libre et éclairé
CRITERES DE NON INCLUSION	<p>Les patients :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Présentant une SEP-RR, • Présentant une SEP-PP, • D'origine ethnique asiatique (en raison de la moindre fréquence du profil oligoclonal dans cette population), • Portant des verres de contact, • Présentant une infection oculaire, • Prenant un traitement immunosuppresseur dans les 3 derniers mois • Ayant reçu des corticoïdes dans le mois précédent le prélèvement • Femmes enceintes ou allaitantes • Patient ne bénéficiant pas d'une couverture sociale

METHODOLOGIE	<p>Etude multicentrique, prospective de validation d'une méthode diagnostique dans la sclérose en plaques.</p> <p>Des techniques semi-automatique et automatique seront développées pour analyser les données de larmes. Les résultats obtenus permettront d'aider la lecture, l'interprétation et la représentation des données sous forme de marqueurs. Les performances et la précision des techniques d'aide au diagnostique (analyse de larmes) seront aussi évaluées selon les critères suivants : les valeurs prédictives positives et négatives, le rapport de vraisemblance.</p> <p>Une centralisation des prélèvements de larmes et de LCS sera réalisée au laboratoire du GHICL</p>
COMITE SCIENTIFIQUE	<p>Un Comité Scientifique composé des représentants du GHICL, du CHRU de Lille, du CHU de Caen, du CHU de Lyon et de la Faculté Libre de Médecine de l'Université Catholique de Lille sera mise en place. Ce comité scientifique se réunira deux fois par an et supervisera la lecture des images en aveugle effectuée par les laboratoires du GHICL, du CHU de Lille, du CHU de Caen et du CHU de Lyon. Une comparaison des lectures des 4 laboratoires sera réalisée avant la validation finale de chaque prélèvement. Les résultats attendus consistent à valider une technique non invasive dans le diagnostic de la sclérose en plaques et de diffuser cette technique plus largement.</p>
NOMBRES DE SUJETS	<p>Un nombre total nécessaire de 242 patients est prévu pour la réalisation du projet de recherche.</p>
DUREE TOTALE DE L'ETUDE	<p>4 ans</p>
DUREE DE LA PERIODE D'INCLUSION	<p>2 ans</p>
DUREE DE PARTICIPATION POUR UN PATIENT	<p>2 ans</p>
RESULTATS ATTENDUS	<p>Les résultats attendus consistent à valider une technique non invasive dans le diagnostic de la sclérose en plaques et de diffuser cette technique plus largement. Ainsi, une partie des ponctions lombaires réalisées dans le cadre du diagnostic de SCI pourraient être évitée, et être complétée mais uniquement en cas de négativité de l'analyse des larmes, par celle du LCS.</p>

2. Etat des lieux

2.1.Sclérose en plaques de forme rémittente-récurrente

La sclérose en plaques (SEP) est une pathologie caractérisée par des lésions inflammatoires du système nerveux central, disséminées dans l'espace et dans le temps. Sa physiopathologie reste encore méconnue, malgré d'importantes avancées ces dernières années.

En France, elle touche un peu plus de 60 000 patients, avec une nette prédominance féminine (sex-ratio de 2 à 3) et constitue la première cause non traumatique de handicap sévère acquis du sujet jeune (1).

Dans 80 à 85 % des cas, la SEP évolue par poussées. On parle alors de SEP de forme rémittente-récurrente (SEP-RR). Une poussée est définie par l'apparition ou l'aggravation de symptômes neurologiques, à distance d'un épisode fébrile, durant plus de 24 heures et séparée du début de la précédente poussée d'au moins 30 jours (2).

Il n'existe à ce jour aucun marqueur spécifique de la SEP-RR, dont le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments cliniques et paracliniques. Les critères diagnostiques actuellement utilisés dans la SEP-RR sont ceux de McDonald révisés en 2005 (3) (voir annexe 1). Ils reposent sur la mise en évidence d'une dissémination spatiale et temporelle des lésions par l'examen clinique, l'IRM cérébrale et l'analyse du liquide cérébro-spinal (LCS).

2.2. Syndrome clinique isolé

Un syndrome clinique isolé (SCI) correspond à un évènement neurologique pouvant faire évoquer une première poussée de SEP-RR. La définition du SCI varie en fonction des auteurs et inclut parfois des critères radiologiques. La symptomatologie consiste en une névrite optique rétrobulbaire (NORB) dans 20 % des cas, une atteinte du tronc cérébral dans 10 % des cas, une atteinte médullaire dans 45 % des cas, ou une atteinte plurifocale dans 25 % des cas (4).

Seuls 30 à 70 % des patients ayant présenté un SCI évolueront vers une SEP-RR (5). Or, il est important de déterminer parmi ces sujets ceux qui sont à haut risque de développer une SEP-RR, afin de les traiter précocement.

La présentation clinique du SCI a une valeur pronostique limitée pour prédire la conversion d'un SCI en SEP-RR (6).

L'IRM cérébro-médullaire a au contraire une bonne valeur pronostique dans cette indication. Ainsi, un SCI avec une IRM cérébrale normale a 21 % de risque de développer une SEP-RR à 20 ans, contre 82 % s'il existe au moins 1 lésion sur l'IRM initiale (7). Plusieurs critères IRM successifs ont été développés pour prédire l'évolution d'un SCI en SEP-RR : ceux de Barkhof *et al.* (1997) (8) sont actuellement les plus utilisés. Leur valeur pronostique pour prédire la conversion d'un SCI en SEP-RR varie selon les études (8;9;10;11;12;13;14) : sensibilité (Se) comprise entre 49 et 82 %, spécificité (Sp) entre 70 et 88 %, valeur prédictive positive (VPP) entre 40 et 93 %, valeur prédictive négative (VPN) entre 62 et 87 % et efficience entre 68 et 80 %.

Nous verrons par la suite l'importance de l'analyse du LCS pour le pronostic des SCI.

2.3.L'analyse du liquide cérébro-spinal dans la sclérose en plaques

Le LCS est recueilli par ponction lombaire (PL). Cette technique consiste à introduire une aiguille entre les processus épineux des troisième et quatrième (ou quatrième et cinquième) vertèbres lombaires pour prélever le LCS dans le cul-de-sac sous-arachnoïdien dural (voir figure 1).

Figure 1 : La ponction lombaire

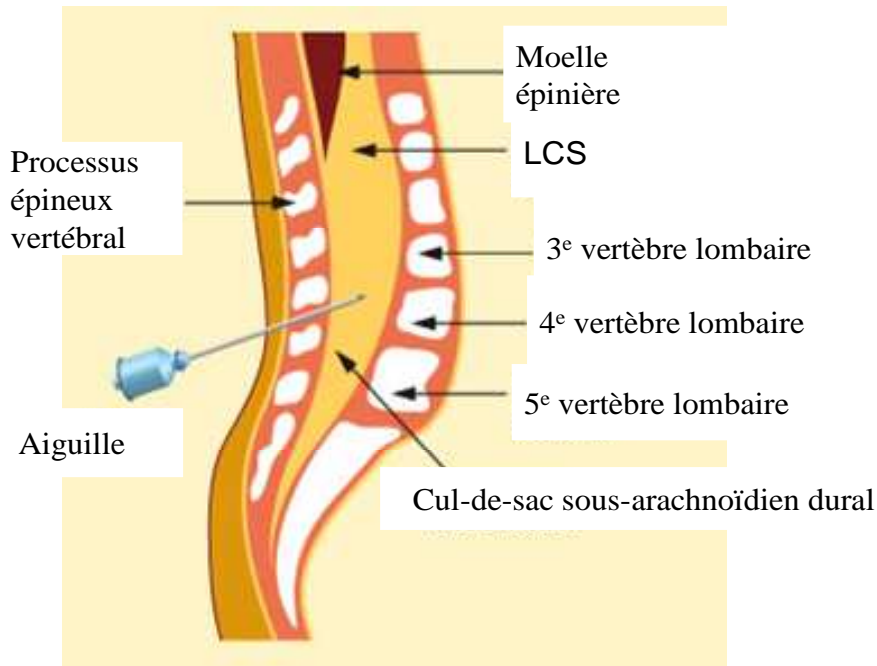


Figure 1 : La ponction lombaire

Une hypercellularité du LCS peut être observée dans la SEP. Elle est comprise entre 5 et 20 par millimètre cube dans un tiers des cas, voire entre 20 et 50 par millimètre cube dans moins de 1 % des cas (15). Une valeur supérieure doit inciter à rechercher un autre diagnostic.

Une hyperprotéinorachie inférieure à 1 gramme par litre peut également être constatée dans environ 25 % des cas (15). Au-delà de cette valeur, il faut là encore se poser la question d'un diagnostic différentiel.

Enfin, une synthèse intrathécale d'immunoglobulines G (IgG) est souvent mise en évidence dans la SEP, soit quantitativement par élévation de l'index IgG (rapport de Delpech), soit qualitativement par la détection de bandes oligoclonales (BOC) d'IgG surnuméraires dans le LCS par rapport au sérum.

L'index IgG est calculé par la formule suivante (taux d'IgG et d'albumine exprimés en grammes par litre):

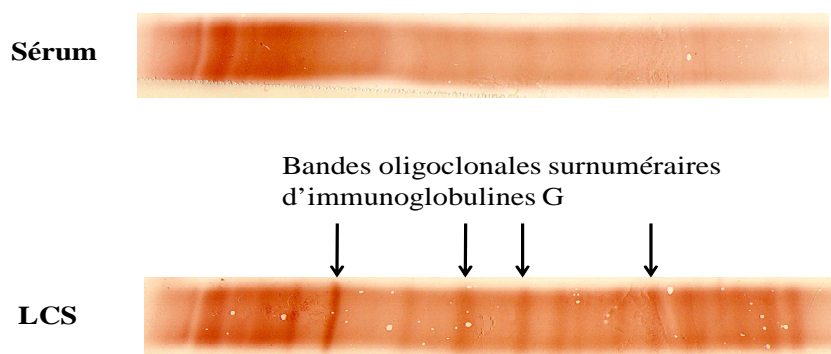
$$\frac{\text{IgG du LCS}}{\text{IgG du sérum}}$$

$$\frac{\text{Albumine du LCS}}{\text{Albumine du sérum}}$$

Un index IgG supérieur à 0,7 est en faveur du diagnostic de SEP. L'élévation de l'index IgG a une Se de 70 % dans la SEP (16).

L'isoélectrofocalisation (IEF) sur gel d'agarose combinée à un immunoblot des IgG est la technique actuellement recommandée par la conférence de consensus de Friedmann *et al.* (2005) (17) pour rechercher une synthèse intrathécale d'IgG. Elle a prouvé sa supériorité dans ce domaine sur l'index IgG et l'électrophorèse sur gel d'agarose (18;19). L'IEF permet de séparer des protéines en fonction de leur charge électrique. Elle s'effectue sur gel d'agarose, dans un gradient de pH. Sous l'effet d'un champ électrique, les protéines vont migrer jusqu'à leur point isoélectrique (pH où leur charge électrique s'annule, entraînant l'arrêt de leur migration), qui est fonction du type de protéine. La révélation se fait ensuite par immunoblot des IgG. Un profil électrophorétique est considéré comme oligoclonal s'il existe au moins 3 BOC d'IgG surnuméraire dans le LCS par rapport au sérum (voir figure 2) ou non oligoclonal dans le cas contraire. Deux techniques principales (Ellitech et Sebia) sont utilisées pour l'isoélectrofocalisation du LCS. En fonction du pays, l'une ou l'autre de ces techniques est prépondérante.

Figure 2 : Exemple de profil oligoclonal du LCS



L'existence d'un profil oligoclonal du LCS a dans la SEP une Se de 85 %, une Sp de 92 %, une VPP de 86,5 % et une VPN de 90 % (20). La Se passe à 95 % si l'on considère que 2 BOC d'IgG surnuméraires dans le LCS par rapport au sérum (au lieu de 3) suffisent pour parler de profil oligoclonal (16). La Sp est incomplète car un profil oligoclonal du LCS est observé dans 5% de la population générale et dans d'autres pathologies neurologiques, répertoriées dans le tableau 1 (21).

Tableau 1 : Fréquence du profil oligoclonal du LCS au cours des maladies neurologiques

Maladies neurologiques	Fréquence
SEP	> 95%
Méningites chroniques actives	> 95%
Panencéphalite sclérosante subaigue	100%
Neuro-syphilis non traitée	> 95%
Neuro-SIDA	80%
Neuro-Lyme	100%
Neuro-cysticercose	100%
Neuro-lupus	50%
Neuro-sarcoïdose	40%
Neuro-Behçet	50%
Ataxie-télangiectasie	50%
Adrénoleucodystrophie	50%
Uvéo-méningite	50%
Syndromes paranéoplasiques	60 %
Tumeurs de type germinomes, lymphomes	< 5%

Avec les critères de McDonald révisés en 2005, l'analyse du LCS n'est plus utile au diagnostic de SEP-RR qu'en cas d'absence de preuve clinique ou radiologique d'une dissémination spatiale des lésions de SEP. Dans ce cas, un LCS positif (index IgG augmenté et/ou BOC d'IgG surnuméraires dans le LCS par rapport au sérum) associé à au moins 2 lésions évocatrices de SEP à l'IRM permet d'apporter cette preuve manquante.

La recherche de BOC d'IgG surnuméraires dans le LCS par rapport au sérum est d'un grand intérêt comme facteur pronostique des SCI. La présence de cette anomalie permet de prédire la conversion en SEP-RR après un suivi moyen de 31 mois avec une Se de 81 %, une Sp de 43 %, une VPP de 30 %, une VPN de 88 % et une efficacité de 52 % (9). L'analyse du LCS présente ainsi une meilleure Se que les critères IRM de Barkhof, mais une moins bonne Sp. L'existence de BOC surnuméraires dans le LCS multiplie par 2 le risque de survenue d'une 2^e poussée, de manière indépendante par rapport à l'IRM (22).

La combinaison de l'IRM et de l'analyse du LCS permet d'estimer encore mieux le risque d'évolution d'un SCI en SEP-RR (14;23).

Ainsi, s'il existe au moins 2 lésions sur l'IRM initiale et des BOC d'IgG surnuméraires dans le LCS, on obtient pour prédire la conversion en SEP-RR 6 ans après le SCI, une Se de 94 %, une Sp de 96 % et une efficacité de 95 % (14).

L'analyse du LCS conserve donc son intérêt en cas de SCI. Cependant, la PL présente aussi certains inconvénients.

Tout d'abord, il s'agit d'un geste relativement invasif et anxiogène pour le patient. Le recours à une prémédication peut être nécessaire et la PL refusée dans certains cas.

En outre, il existe des contre-indications à la PL pouvant limiter sa réalisation, principalement l'existence de troubles de la coagulation sévères ou la prise d'un traitement anticoagulant.

Un autre inconvénient de la PL est sa difficulté de réalisation. Il s'agit d'un geste nécessitant un certain entraînement, notamment en cas d'obésité ou de scoliose du patient. Un guidage radiologique s'avère même parfois indispensable. Une PL ne peut être effectuée lors d'une simple consultation, car une surveillance clinique de quelques heures reste nécessaire après le prélèvement. Elle est donc dans la majorité des cas réalisée en hospitalisation et constitue parfois la seule raison de celle-ci, ce qui génère un surcoût économique.

La PL peut aussi entraîner certaines complications, dont la plupart restent rares : complications hémorragiques, infectieuses, thrombose veineuse cérébrale. Le risque principal d'une PL est en fait la survenue d'un syndrome post-ponction lombaire (SPPL). Celui-ci est lié à une fuite de LCS par l'orifice créé dans la dure-mère lors de la ponction.

Le diagnostic est clinique (24) et repose sur la notion de céphalées posturales, déclenchées par l'orthostatisme et disparaissant en décubitus, d'intensité variable, apparaissant en général dans les 24 heures après l'examen. Ces céphalées peuvent être associées à des signes végétatifs (nausées, vomissements), des signes cochléo-vestibulaires (vertiges, acouphènes, hypoacousie) et des signes ophtalmologiques (photophobie, diplopie, troubles de l'accommodation). En l'absence de traitement, les symptômes perdurent en général une semaine, parfois plus, ou peuvent même se chroniciser.

Des facteurs de risque relatifs au patient ont été identifiés : sexe féminin, âge entre 18 et 30 ans, indice de masse corporelle bas, antécédents de céphalées (25). Il existe également des facteurs de risque techniques liés à la réalisation du geste lui-même : gros diamètre de l'aiguille, aiguille à pointe biseautée, orientation perpendiculaire à l'axe du rachis du biseau de la pointe, nombre important de tentatives de ponction (26). Un certain

nombre de mesures préventives s'imposent donc : l'utilisation de l'aiguille ayant le plus petit diamètre possible, à pointe arrondie, par un ponctionneur expérimenté. Le repos en décubitus strict et l'augmentation des apports hydriques après le geste n'ont par contre jamais fait leurs preuves dans la prévention du SPPL, bien qu'ils soient encore largement pratiqués.

Cependant, même si les mesures préventives sont appliquées, la fréquence du SPPL reste de 6 %, contre 32 % en l'absence de mesures spécifiques (26). Il s'agit donc d'un effet secondaire fréquent, pouvant être invalidant et nécessiter une hospitalisation avec traitement médicamenteux en première intention (hydratation, perfusions d'antalgiques et de caféine), voire colmatage sanguin épidural (blood patch) en seconde intention (injection de sang autologue dans l'espace épidural, visant à colmater la brèche durale).

Ces inconvénients de la PL, nous conduisent à nous interroger sur la possibilité d'une alternative à cet examen dans la SEP.

2.4.Hypothèse de travail : Analyse lacrymale dans la SEP.

L'étude princeps concernant l'analyse lacrymale dans la SEP est celle de Coyle et Sibony (1986) (27), complétée par une deuxième étude (28). Le prélèvement s'effectuait par capillarité après induction du larmoiement par oignons ou stimulation aromatique ammoniaquée. Une IEF sur gel d'agarose avec imprégnation argentique et révélation par anti-IgG était ensuite réalisée. Des BOC d'IgG furent détectées chez 14 des 21 patients (67 %) présentant une SEP. Dans la plupart des cas, ces bandes n'étaient pas présentes dans le sérum. Les larmes n'avaient pas été comparées au LCS.

L'analyse lacrymale dans la SEP est ensuite tombée en désuétude suite à la négativité de 3 études (29;30;31) utilisant pourtant des techniques d'analyse proches de celles de Coyle *et al.*, (1987) (27).

Il fallut attendre les travaux de Forzy *et al.* en 1999 (32), complétés par ceux de Devos *et al.* en 2001 (33) pour que l'analyse lacrymale se réalise dans la SEP en but de diagnostic. La principale innovation technique était le mode de recueil des larmes par bandelette de Schirmer et non plus par induction du larmoiement, d'une technicité moindre et permettant en outre d'éviter la dilution du prélèvement et donc de minimiser le risque de faux négatif. L'IEF était réalisée sur gel d'agarose avec imprégnation argentique et révélation par anti-

IgG. Les résultats de l'IEF des larmes et du LCS étaient comparés. Au total, 123 patients avaient été inclus, dont 60 présentant une SEP cliniquement définie selon les critères de Poser et al. (1983) (34), à n'importe quel stade de la maladie (44 SEP-RR, 9 SEP-PP et 7 SEP secondairement progressive) et 63 présentant une autre pathologie ayant conduit à la pratique de l'analyse du LCS. Cinq patients avaient été exclus en raison de la présence d'un profil oligoclonal dans le sérum. Parmi les patients non SEP, 13 étaient porteurs d'une autre pathologie neuro-inflammatoire. Les résultats montraient 83% de concordance entre l'IEF des larmes et du LCS chez les patients atteints de SEP et 86% de concordance chez les contrôles. La Se de la recherche d'un profil oligoclonal dans les larmes pour le diagnostic de SEP était de 72% et sa Sp de 84%, la VPP étant de 82%. La Se de la même analyse dans le LCS était de 75% et sa Sp de 86% chez les patients atteints de SEP. Aucune différence liée à la durée d'évolution de la maladie n'apparaissait au sein du groupe SEP.

Enfin, Calais *et al.* (2010) (35) se sont intéressés récemment à l'analyse lacrymale dans les SCI. Le recueil des larmes se faisait par bandelette de Schirmer, puis l'IEF était réalisée sur gel d'agarose, combinée à un immunoblot des IgG, à la fois pour le sérum, le LCS et les larmes. L'étude était multicentrique. Au total, 69 patients avaient des prélèvements interprétables. Des BOC d'IgG surnuméraires par rapport au sérum ont été détectées dans le LCS chez 64 % des patients et dans les larmes chez 42 % d'entre eux. Le taux de concordance entre les résultats de l'IEF du LCS et des larmes était de 78 %. Tous les patients ayant des BOC d'IgG surnuméraires dans les larmes en avaient aussi dans le LCS. **Ces résultats suggéraient donc que pour un SCI, l'existence d'un profil oligoclonal des larmes permettrait d'éviter de réaliser une PL** (car le LCS aurait également un profil oligoclonal).

Seule l'étude de Calais et al. (2010) (35) s'est intéressée à l'analyse lacrymale dans les SCI. Plusieurs critiques peuvent être formulées concernant cette étude :

- Son effectif restreint (69 patients), que nous proposons d'augmenter,
- Des critères d'inclusion trop restrictifs. N'étaient inclus en effet que les patients présentant un SCI avec au moins 2 lésions évocatrices de SEP à l'IRM cérébrale initiale, ce qui conduisait à n'inclure dans l'étude que des patients à haut risque de SEP. Nous proposons donc d'élargir la population étudiée à tous les SCI, avec ou sans lésion à l'IRM cérébro-médullaire initiale.
- L'absence de suivi des patients inclus, ne permettant pas d'évaluer la valeur pronostique de l'isoélectrofocalisation des larmes sur la conversion des SCI en SEP-RR,

- L'utilisation d'une seule des 2 techniques d'isoélectrofocalisation principales (Ellitech et pas Sebia),
- L'interprétation visuelle et non pas automatisée des profils électrophorétiques des larmes et du LCS, ce qui induit davantage de subjectivité.

Nous supposons qu'il existe un profil type de présence/absence de BOC dans le profil électrophorétique des larmes, permettant d'aider au diagnostic de la sclérose en plaques.

3.Objectifs du protocole de recherche et les résultats attendus

3.1.Objectif principal

L'objectif principal est d'évaluer l'intérêt des larmes chez des patients présentant un SCI, avec ou sans lésion à l'IRM, pour le diagnostic de la sclérose en plaques défini selon les critères de McDonald révisés en 2005 : Etude de la concordance entre le profil électrophorétique des larmes et celui du LCS.

3.2.Objectifs secondaires

Les objectifs secondaires sont les suivants :

- Recherche de profils électrophorétiques types et analyse de leurs performances sur le diagnostic de SEP-RR à 2 ans de suivi (2 visites successives à 1 an d'intervalle).
- Calcul de la sensibilité/spécificité, valeur prédictive positive/négative, efficacité odds-ratio et rapports de vraisemblance
- Mise au point d'une technique de lecture automatique (36-37) des bandes oligoclonales (analyse du profil électrophorétique) pour les larmes. Les résultats obtenus permettront d'aider la lecture, l'interprétation et la représentation des données (38).
- Etudier la concordance entre une lecture visuelle et une lecture automatique du profil électrophorétique des larmes.

4.Méthodologie

4.1.Plan Expérimental

Il s'agit d'une étude prospective, multicentrique sur série consécutive.

La période d'inclusion par centre sera de 2 ans. La durée de suivi de chaque patient sera de 2 ans.

La durée totale de l'étude sera de 4 ans.

4.2.Population étudiée

Elle concernera tous les patients adultes porteurs d'un Syndrome cliniquement isolé avec ou sans lésion à l'IRM et pour lesquels il est indiqué de faire un bilan par analyse de LCS.

4.3.Critères d'inclusion

- Patient de plus de 18 ans,
- Patient présentant un SCl, datant de moins de 3 mois.
- Patient ayant accepté de signer un consentement éclairé

4.4.Critères de non inclusion

- Patient présentant une SEP-RR,
- Patient présentant une SEP-PP,
- Patient d'origine ethnique asiatique (en raison de la moindre fréquence du profil oligoclonal dans cette population),
- Patient portant des verres de contact,
- Patient présentant une infection oculaire,
- Patient prenant un traitement immunosuppresseur dans les 3 derniers mois
- Patient ayant reçu des corticoïdes dans le mois précédent le prélèvement
- Femmes enceintes ou allaitantes
- Patient ne bénéficiant pas d'une couverture sociale

4.5.Critères de Jugement

- **Critère de jugement principal**, le critère de jugement est l'étude de la concordance entre le profil électrophorétique des larmes et celui du LCS : test Kappa.

Critères de jugement secondaires, les critères de jugement sont les suivants :

- Valeur d'un profil électrophorétique des larmes sur la conversion d'un SCI en SEP-RR définie selon les critères de McDonald révisés en 2005 : Calcul de la sensibilité/spécificité, valeur prédictive positive/négative, efficience et odds-ratio, rapports de vraisemblance,
- La méthode de lecture automatique des profils électrophorétiques est présentée dans l'annexe 5.
- Concordance entre une lecture visuelle et une lecture automatique (36-38) du profil électrophorétique des larmes : méthode du Kappa.

4.6. Calcul du nombre de sujets nécessaires

Un nombre total nécessaire de 242 patients est prévu pour la réalisation du projet de recherche. Cette taille d'échantillon est calculée à partir du test de significativité pour le coefficient Kappa, en se basant sur une concordance attendue supérieure à 60%, pour une sensibilité de 80% (marges = (0.8, 0.2)) et pour un risque de première espèce de 5% et une puissance de 90%.

4.7.Analyse statistique

La concordance sera évaluée par le test du Kappa.

La valeur diagnostique de l'IEF des larmes sera évaluée par la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive, la valeur prédictive négative, l'efficience, l'odds-ratio, le rapport de vraisemblance.

L'analyse statistique sera effectuée par la cellule de biostatistique du GHICL/FLM (sous la responsabilité du Pr Forzy) en collaboration avec la cellule de promotion de la DRM afin de réaliser le rapport final de l'étude et les publications.

5 Aspects médico-réglementaires et éthiques

5.1 Qualification juridique de l'étude

Cette étude est une étude de recherche biomédicale, multicentrique et prospective.

La recherche sera conduite conformément au protocole, aux bonnes pratiques cliniques et aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur.

L'investigateur est responsable du bon déroulement de l'essai dans son centre.

5.2. Promotion envisagée GHICL : Responsabilité du promoteur

Il est de la responsabilité du promoteur de déclarer à l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé et au Comité de Protection des Personnes concerné les EIG inattendus en fonction de la réglementation en vigueur.

5.3. Balance bénéfice/risque

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'intérêt de l'isoélectrofocalisation des larmes pour le diagnostic de sclérose en plaques chez les patients présentant un syndrome clinique isolé, avec ou sans lésion à l'IRM, afin de limiter dans le futur le nombre de ponctions lombaires nécessaires en utilisant à la place, chaque fois que cela sera possible, l'analyse des larmes. L'effet indésirable possible du au prélèvement des larmes est une irritation locale par le papier buvard.

5.4. CPP et autorités compétences

Autorisation de l'autorité compétente et avis du CPP Le promoteur soumet une demande d'autorisation auprès de l'Afsaps et recueille l'avis favorable du CPP avant le début de la recherche, conformément à l'article L1121-4 du Code de la Santé Publique.

Modifications au protocole :

Le promoteur (et par délégation la Direction de recherche médicale) est seul autorisé à modifier le protocole, en concertation avec l'investigateur Coordonnateur.

On entend par modifications substantielles, les modifications qui ont un impact significatif sur tout aspect de la recherche, notamment sur la protection des personnes, y compris à l'égard de leur sécurité, sur les conditions de validité de la recherche, sur l'interprétation des documents scientifiques qui viennent appuyer le déroulement de la recherche ou sur les modalités de conduite de celle-ci.

Une demande de modification substantielle est adressée par le promoteur soit à l'AFSSAPS, soit au CPP, soit à ces deux organismes, selon le cas, pour autorisation et/ou avis. Dès réception de l'autorisation et/ou de l'avis favorable, la version amendée du protocole est alors transmise à tous les investigateurs par le promoteur.

5.5 Contrôle et assurance de la qualité

La démarche Assurance Qualité qui sera mise en œuvre est basée sur l'application de Procédures Opératoires Standard permettant de prendre en charge des sujets se prêtant aux recherches dans les meilleures conditions de sécurité et de respect des règles médico-réglementaires.

5.6 Gestion des évènements indésirables

5.6.1 Définitions

Événement indésirable : toute manifestation nocive et non recherchée, subie par une personne participant à une recherche biomédicale quelle que soit la cause de cette manifestation et survenant entre l'inclusion (objectivée par la date de signature du consentement) et la fin des investigations prévues au protocole.

Événement ou effet indésirable grave : tout évènement ou effet indésirable qui :

- entraîne le décès :
- met en jeu le pronostic vital de la personne qui se prête à la recherche
- nécessite une hospitalisation ou la prolongation d'une l'hospitalisation
- provoque une incapacité ou un handicap important ou durable
- se traduit par une anomalie ou une malformation congénitale
- est jugé comme grave sur le plan médical par l'investigateur

Effet indésirable inattendu : tout effet indésirable dont la nature, la sévérité ou l'évolution ne concorde pas avec les informations relatives aux produits, actes pratiqués et méthodes utilisées au cours de la recherche.

5.6.2 Enregistrement et notification des événements indésirables

Tout événement indésirable grave (EIG) devra faire l'objet d'un rapport sur un formulaire standardisé figurant dans le cahier d'observation.

Notification des EIG

Tout événement indésirable grave (EIG) observé lors de la recherche et dans ses suites devra être retranscrit dans le cahier d'observation dans la section prévue à cet effet avec mention de tous les items listés pour un événement indésirable non grave.

Un seul événement doit être reporté par item. L'événement peut correspondre à un symptôme, un diagnostic ou à un résultat d'examen complémentaire jugé significatif. Tous les éléments cliniques ou para-cliniques permettant de décrire au mieux l'événement correspondant doivent être reportés.

Les investigateurs doivent notifier dans les 24 heures au promoteur GHICL les événements indésirables graves tels que définis ci-dessus par fax au 03 20 22 57 67

L'investigateur doit également informer l'ARC promoteur en charge de la recherche de la survenue de l'EIG.

L'évolution clinique ainsi que les résultats des éventuels bilans cliniques et des examens diagnostiques et/ou de laboratoire, ou toute autre information permettant une analyse adéquate du lien de causalité de l'EIG seront également rapportés :

- soit sur la déclaration initiale d'EIG s'ils sont immédiatement disponibles,
- soit ultérieurement et le plus rapidement possible, en envoyant par fax une nouvelle déclaration d'EIG complétée (et en précisant qu'il s'agit d'un suivi d'EIG déclaré et le numéro de suivi).

Toutes les déclarations faites par les investigateurs devront identifier chaque patient participant à la recherche par l'identifiant patient attribué à chacun d'entre eux.

En cas de décès notifié d'un sujet participant à la recherche, l'investigateur communiquera au promoteur tous les renseignements complémentaires demandés (compte-rendu d'hospitalisation, résultats d'autopsie, etc.).

L'EIG sera suivi par l'investigateur jusqu'à sa résolution, ce dernier étant tenu d'en informer le promoteur.

Déclaration des EIG aux autorités compétentes

Pour chaque évènement ou effet indésirable grave, le promoteur GHICL évalue la gravité et lien de causalité entre l'évènement ou l'effet indésirable et le(s) produit(s) à l'étude, ou le protocole, ainsi que le caractère inattendu.

Le promoteur, et par délégation la Direction de la Recherche Médicale GHICL a la responsabilité de déclarer à l'AFSSAPS et au CPP les évènements indésirables graves et inattendus imputables au(x) produit(s) de l'étude et/ou aux procédures utilisés dans un délai de 15 jours (7 jours en cas de décès et de mise en jeu du pronostic vital).

Le promoteur GHICL informera tous les investigateurs de l'étude concernant des évènements ou effets indésirables graves qui pourraient avoir un impact défavorable sur la sécurité des personnes qui se prêtent à la recherche.

Rapport annuel de sécurité

Une fois par an pendant toute la durée de l'essai, ou sur demande, le promoteur GHICL transmet à l'AFSSAPS et au CPP un rapport de sécurité. Ce rapport de sécurité comprendra notamment une analyse globale du profil de sécurité du protocole de l'étude prenant en compte toutes les nouvelles données pertinentes de sécurité. Les informations de sécurité apparaîtront sous forme de tableaux de synthèse résumant les évènements ou effets indésirables graves survenus dans la recherche biomédicale.

Ce rapport est fait en collaboration avec l'Investigateur Coordonnateur de l'étude.

5.7 Traitement des données et conservation des documents et données relatives à la recherche

Déclaration à la CNIL :

Les données personnelles recueillies au cours de l'étude seront enregistrées dans un cahier d'observation et rendues totalement anonymes avant leur transmission sous la forme d'un fichier informatique pour l'analyse statistique. Il s'agit ici d'une étude soumise aux dispositions des articles L1121-1 et suivants du Code de la Santé Publique. Celle-ci rentre donc dans le champ d'application de la méthodologie de référence (MR06 001) concernant les traitements de données personnelles mis en œuvre dans le cadre des recherches biomédicales. Dans la mesure où ces recherches sont conduites dans le cadre d'exigences législatives et réglementaires strictes (loi Huriet du 20 décembre 1988 modifiée par la loi du

9 août 2004) selon des méthodologies standardisées, la CNIL a estimé qu'il était possible de simplifier la procédure en adoptant une méthodologie de référence en application de l'article 54, 5ème alinéa de la loi informatique et libertés modifiée. (homologation le 5 janvier 2006). Le traitement des données mis en œuvre suivra la procédure du référentiel CNIL n°1 (MR06 001. Seules les personnes directement impliquées dans l'étude seront habilitées à intervenir sur ces fichiers. Un droit d'accès et de rectification des données pourra s'exercer à tout moment par l'individu auprès d'un des médecins référents de l'étude.

Recueil et stockage de données :

Un cahier d'observation devra être complété pour chaque participant inclus dans l'étude. Toutes les données des épreuves et questionnaires de l'évaluation neuropsychologique seront ainsi recueillis via ce document. Le cahier d'observation sera anonymisé de façon à assurer la confidentialité des données des images et données de chacun des participants. Toutes les données et l'ensemble des résultats issus de cette recherche seront stockés de manière informatique et conservés pendant une durée minimum de 15 ans.

5.8 Contrat d'Assurance

Le promoteur a contracté une police d'assurance auprès de la compagnie AXA (Contrat N° 5248492304) couvrant les participants à cette étude conformément à l'article L-1121-10 du Code la santé publique aux risques encourus par les sujets pendant la durée de l'étude. Cette assurance couvre tous les intervenants à la recherche. Une copie de l'attestation de l'assurance sera remise à l'investigateur et conservée dans le classeur investigateur.

6 Logistique de l'étude

6.1. La Direction de la Recherche Médicale du GHICL (Cellule de Promotion de la DRM)

La cellule de promotion de la DRM du GHICL sous la responsabilité du Dr Iliescu est garante des démarches médico-réglementaires et éthiques du projet. Elle intervient de la conception du projet, aux démarches qualité et aux Bonnes Pratiques Cliniques (BPC) selon la Directive Européenne CE 2001 jusqu'à la publication des résultats de la recherche.

En outre, Chaque Investigateur Principal s'engage à respecter les BPC dans son centre.

Le chef de projet ou attaché de recherche clinique désigné par la DRM, sera chargé de s'assurer que :

- ↳ L'investigateur principal dispose des tous les outils nécessaires à l'élaboration d'un projet conforme à la législation et à la réglementation en vigueur
- ↳ Les droits, la protection et la sécurité des personnes qui se prêtent à la recherche sont satisfaits
- ↳ Les données rapportées, liées à la recherche sont exactes, complètes et cohérentes avec les données sources
- ↳ La recherche est conduite conformément au protocole en vigueur et aux dispositions législatives et réglementaires.
- ↳ Les autorisations requises dans tous les domaines, y compris en ce qui concerne les données à caractère personnel sont présentes. Ces autorisations seront obtenues avant la mise en œuvre de l'étude par la DRM.

Il assurera les liens entre le promoteur et tous les investigateurs.

Suivi des essais par la cellule de promotion de la DRM :

- Déroulement de l'essai

Les données concernant l'étude seront reportées sur les cahiers d'observation prévus pour l'étude, selon les Bonnes Pratiques Cliniques, reprenant les différentes étapes de la prise en charge du patient dans le protocole. Tout écart au protocole sera notifié ainsi que sa raison. Le recueil des données devra être exhaustif et sera régulièrement vérifié par un Assistant de Recherche Clinique selon les procédures du protocole.

- Monitoring de l'étude

Le monitoring de l'essai sera effectué à intervalle régulier ou sur déclenchement spécifique par un ARC de la DRM du GHICL. Il sera fonction des inclusions réalisées dans l'étude. Une réunion de mise en place avec l'investigateur principal aura lieu avant le début de l'essai (rappel des BPC, organisation de la recherche, monitoring prévu). Une procédure standard est défini a cet effet.

Lors des visites de monitoring sur site, les ARC devront pouvoir consulter :

- les cahiers de recueil de données des patients inclus
- les dossiers médicaux et infirmiers des patients
- le classeur investigateur

Le monitoring de base vérifiera les 5 points suivants :

- la présence des consentements éclairés signés
- le respect des critères d'inclusion
- le critère principal de jugement
- la surveillance et la déclaration des EIG
- le signalement de faits nouveaux (amendements)

Lors du monitoring, la totalité des dossiers seront évalués à 100%.

- Clôture de l'étude

A la fin de l'étude des procédures de clôture seront effectuées, avec classement de tous les documents et des données sources, et gel des bases de données. Une fois l'analyse finale effectuée et validée, l'ensemble du dossier et des données sont scellés et archivés selon des procédures spécifiques dans des locaux sécurisés. La sécurisation de ces locaux est assurée par badges électroniques et des codes d'accès.

- Comité Scientifique

Un comité scientifique constitué des personnes suivantes :

Professeur Gérard Forzy du Laboratoire de biologie du GHICL

Professeur Patrick Hauteceur chef de service Neurologie du GHICL

Dr. Stéphane Allouche du laboratoire de biologie du CHU de Caen

Dr. Bernadette Hennache du laboratoire du CHRU de Lille

Dr. Catalina Iliescu, directrice de la recherche médicale du GHICL

Mr.Foued Derraz (Enseignant-chercheur) de la Faculté Libre de Médecine de l'université catholique de Lille (responsable de l'analyse d'images)

Professeur Christian Confavreux du CHU de Lyon.

Ce comité se réunit deux fois par an minimum. Une rencontre du comité aura lieu avant la mise de l'étude afin de définir les modalités de la conduite du projet ainsi que le plan d'analyse d'images des prélèvements de l'étude, le plan statistique et les modalités d'anonymisation des données spécifiques de l'étude. Le comité validera le rapport final de l'étude avant toute publication.

6.2. Les investigateurs dans les différents centres

6.2.1 Les 15 centres impliqués et les différents investigateurs principaux figurent dans le tableau suivant

Tableau : Centres et investigateurs

Centres	Investigateurs
Lille GHICL	Pr Hautecoeur
Lille CHRU	Pr Vermersch
Nice	Dr Lebrun-Fresnay
Strasbourg	Pr De Sèze
Dijon	Pr Moreau
Clermont-Ferrand	Pr Clavelou
Poissy	Dr Heinzlef
Lyon	Pr Confavreux
Nancy	Dr Debouverie
Marseille	Pr Pelletier
Bordeaux	Pr Brochet
Caen	Pr Defer
Nantes	Dr wiertlewski
Valenciennes	Dr Verier
Rouen	Dr. Bourre

6.2.2 Responsabilités de l'investigateur

L'investigateur est responsable du déroulement de l'essai. Il s'engage à garder des données sources ainsi que les documents administratifs relatifs au protocole et à ne pas inclure de volontaire avant la réception des avis officiels du CCP et de l'envoi de la déclaration aux autorités, à respecter le protocole, à conduire l'étude suivant les principes moraux,

réglementaires, éthiques et scientifiques qui régissent la recherche clinique. Il s'engage également à recueillir le consentement éclairé et écrit de chaque volontaire et à rapporter tout événement indésirable grave attendu ou inattendu (EIG, EIGI).

6.2.3 Information des sujets et recueil du consentement éclairé

Les sujets auront une information complète orale et écrite précisant le déroulement de l'étude. Une lettre d'information devra être remise au participant par l'investigateur ou le médecin qui le représente avant son inclusion dans l'étude.

Un consentement éclairé (fourni en annexe du protocole) signé sera recueilli pour chaque participant avant leur entrée dans l'étude. La lettre d'information et le formulaire de consentement seront signés en 3 exemplaires dont un exemplaire sera remis au sujet ayant donné son accord. Aucune procédure correspondant au protocole ne devra commencer sans l'accord signé du patient.

6.2.4 L'investigateur devra faxer le formulaire des EIG sans délai au promoteur.

Dans le cadre de cette recherche, il n'y a pas d'évènement indésirable grave attendu.

6.2.5 Droit d'accès aux données et documents sources

L'investigateur garantit l'accès aux données sources pour le moniteur, l'auditeur ou l'inspecteur de l'autorité administrative compétente.

Il s'engage à accepter les contrôles du promoteur et à fournir l'accès aux données sources (dossiers médicaux, fichiers informatiques, documents de l'étude,...).

Des visites de monitoring seront effectuées dans chaque centre selon une fréquence défini par la Direction de Recherche Médicale du GHICL. Lors de ces visites sur site en accord avec l'investigateur, les éléments suivants sont revus :

- respect du protocole et des procédures qui y sont rattachées,
- assurance qualité des données recueillies dans le cahier d'observation : exactitude, données manquantes, cohérence des données, contrôle des documents sources.

6.3. Déroulement, lieu et durée de l'étude

Une fiche d'inclusion sera remplie lors de la 1^{ère} visite (voir annexe 6) après signature du consentement libre et éclairé par le patient et par le médecin.

Le patient sera ensuite revu à 2 reprises par le neurologue l'ayant inclus dans l'étude à 1 an et 2 ans, avec à chaque fois une fiche de suivi à remplir (voir annexe 7).

La décision de réaliser une (ou plusieurs) IRM cérébrale et/ou médullaire de contrôle pendant la durée du suivi sera laissée à l'appréciation du neurologue ayant inclus le patient.

Un contrôle de l'IEF des larmes par rapport à celle du sang sera réalisé au terme du suivi de 2 ans.

Schéma de l'étude :

	Visite 1 (inclusion)	Visite 2 (1 an)	Visite 3 (2 ans)
Lettre d'information et recueil du consentement	X		
Examen clinique	X	X	X
IRM cérébrale	X	X (facultatif)	X (facultatif)
IRM médullaire	X (facultatif)	X (facultatif)	X (facultatif)
Prélèvement de sang	X		X
Prélèvement de LCS	X		
Prélèvement de larmes	X		X
Evénements indésirables et traitements concomitants	X	X	X

6.4. Expérience de l'équipe dans le domaine

Notre équipe possède déjà une expérience conséquente en ce qui concerne l'analyse lacrymale dans la SEP. Nous avons ainsi déjà mené plusieurs études dans ce domaine par le passé (32, 33). La dernière comparait l'analyse des larmes et du LCS dans les SCI chez 82 patients (35) et objectivait une concordance satisfaisante.

La recherche en ce domaine de la SEP et le recrutement des patients est facilitée par la collaboration au sein du Groupe Septentrional d'Etude et de Recherche sur la SEP (GSEP) et du club francophone de la sclérose en plaques.

6.5. Recueil, conditionnement, transport, analyse, interprétation et conservation des prélèvements

Les méthodes utilisées pour le recueil, le conditionnement, le transport, l'analyse l'interprétation et la durée de conservation des prélèvements figurent en annexes 2 à 6. De plus chaque méthode sera validée obligatoirement lors des réunions du comité scientifique.

6.6. Gestion et analyse des données

Les observations médicales seront conservées dans le dossier du patient, les données concernant l'étude seront reportées sur les cahiers d'observation prévus pour l'étude, selon les bonnes pratiques cliniques, reprenant les différentes étapes de la prise en charge du patient dans le protocole. Tout écart au protocole sera notifié ainsi que sa raison. Le recueil des données devra être exhaustif et sera vérifié lors du monitoring par un Assistant de Recherche Clinique (ARC) selon les procédures standards.

Un rapport de monitoring sera envoyé chaque fois aux investigateurs.

Le traitement des données sera réalisé dans les conditions de confidentialité définies par la loi du 6 janvier 1978 modifiée relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés (CNIL). Le traitement des données sera effectué conformément aux exigences de la méthodologie de référence MR 06001 de la CNIL.

A la fin de l'essai, des procédures de clôture seront appliquées, avec classement de tous les documents et des données sources. Une fois l'analyse finale effectuée et validée, l'ensemble

du dossier et des données sont archivés pendant au moins 15 ans selon des procédures spécifiques dans des locaux sécurisés.

Le comité scientifique qui se réunit deux fois par an ou plus si nécessaire, assurera la bonne conduite du projet et supervisera la lecture des images en aveugle effectuée par les laboratoires du GHICL, du CHU de Lille, du CHU de Caen et du CHU de Lyon. Une comparaison des lectures des 4 laboratoires et la vérification de la technique d'IEF seront réalisées avant la validation finale de chaque prélèvement.

6.7. Rapport final et publication

Conformément à l'article R 5121-13 du Code de la Santé Publique, les essais ne peuvent faire l'objet d'aucun commentaire écrit ou oral sans l'accord conjoint de l'investigateur et du promoteur. Toute publication doit mentionner que le GHICL est promoteur. En tout état de cause, le GHICL, promoteur de l'étude, a la maîtrise de la première publication. L'investigateur adresse une copie de ses publications au promoteur.

Toute publication doit mentionner que le GHICL est promoteur (N° d'identification interne, dans ce cas précis RC-P0021) et que cette étude a obtenu un soutien financier des PHRC.

Le promoteur est le propriétaire de la base des données et des résultats de l'étude en accord avec l'investigateur coordonnateur. Ces résultats, ainsi que toutes les données relatives à la recherche, ne doivent en aucun cas être transmises à un tiers, sans contrepartie négociée préalablement par le GHICL et par délégation par la Direction de la Recherche Médicale du GHICL. Toute sollicitation de ce type doit être transmise le plus tôt possible à la Direction de la Recherche Médicale.

Les informations confidentielles ne pourront être divulguées qu'après la fin de la recherche et après le rapport final sous réserve de citer le GHICL en qualité de promoteur et de tenir compte des autres dispositions de la charte investigateur.

L'Investigateur coordonnateur s'engage à adresser à la DRM un rapport intermédiaire annuel et un rapport final de la recherche citée.

Il s'oblige à fournir le rapport définitif de l'étude avant toute publication. Ce rapport adressé à la Direction de la recherche médicale est porté à la connaissance du COPIRM (Comité de Pilotage de la Recherche Médicale). A défaut de publication, il s'engage à rendre public les

résultats du projet de recherche ou du traitement de tout sujet participant à cette recherche, et ce à des fins pédagogiques et de recherche interne:

Toutes les données, résultats, inventions et découvertes résultant de l'essai deviendront automatiquement la propriété du promoteur qui pourra utiliser ces informations de la manière qu'il jugera convenable.

*** Cas Particulier :**

Ce projet de recherche a obtenu un financement sur 4 ans suite à la réponse aux appels d'offres PHRC 2011. Un rapport annuel de l'avancement du projet ainsi que des frais financiers sera réalisé par l'investigateur coordonnateur dans le cadre du suivi du PHRC

*** Obligation de publication :**

Tous les résultats d'une étude clinique financée par la GHICL ou par un appel d'offre sont sous la responsabilité scientifique de l'Investigateur Coordonnateur et ces résultats doivent être rendus publics s'ils ont une validité scientifique suffisante.

Toute requête pour cacher des résultats, changer et atténuer le contenu du rapport final et de la publication sera rejetée par le promoteur.

Les publications doivent décrire de façon honnête et équilibrée tous les aspects de l'étude sans tenir compte d'autres intérêts, notamment non scientifiques. Les auteurs des publications doivent se conformer aux règles des journaux de qualité.

6.8. Cahier d'observation

Toutes les informations recueillies par le praticien assurant le suivi des patients seront retranscrites dans le cahier d'observation. Les données seront 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.

7. Financement de l'étude

Le projet est financé par l'appel d'offre du PHRC 2011 et est co-financé avec la société SEBIA.

8. REFERENCES

1. Fromont A, Binquet C, Sauleau EA, Fournel I, Bellisario A, Adnet J, Weill A, Vukusic S, Confavreux C, Debouverie M, Clerc L, Bonithon-Kopp C, Moreau T. Geographic variations of multiple sclerosis in France. *Brain*. 2010 Jul; 133 (Pt 7): 1889-99.
2. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001 Jul; 50(1):121-7.
3. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol*. 2005 Dec; 58 (6): 840-6.
4. Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2000 Nov 16; 343(20): 1430-8.
5. Miller D, Barkhof F, Montalban X, Thompson A, Filippi M. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Lancet Neurol*. 2005 May; 4(5): 281-8.
6. Mowry EM, Pesic M, Grimes B, Deen SR, Bacchetti P, Waubant E. Clinical predictors of early second event in patients with clinically isolated syndrome. *J Neurol*. 2009 Jul; 256(7): 1061-6.
7. Fisniku LK, Brex PA, Altmann DR, Miszkiel KA, Benton CE, Lanyon R, Thompson AJ, Miller DH. Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain*. 2008 Mar; 131(Pt 3): 808-17.
8. Barkhof F, Filippi M, Miller DH, Scheltens P, Campi A, Polman CH, Comi G, Adèr HJ, Losseff N, Valk J. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain*. 1997 Nov; 120 (Pt 11): 2059-69.
9. Tintoré M, Rovira A, Brieva L, Grivé E, Jardí R, Borrás C, Montalban X. Isolated demyelinating syndromes: comparison of CSF oligoclonal bands and different MR imaging criteria to predict conversion to CDMS. *Mult Scler*. 2001 Dec; 7(6): 359-63.
10. Tintoré M, Rovira A, Río J, Nos C, Grivé E, Sastre-Garriga J, Pericot I, Sánchez E, Comabella M, Montalban X. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: application in first demyelinating episode. *Neurology*. 2003 Jan 14; 60(1): 27-30.
11. Korteweg T, Tintoré M, Uitdehaag B, Rovira A, Frederiksen J, Miller D, Fernando K, Filippi M, Agosta F, Rocca M, Fazekas F, Enzinger C, Matthews P, Parry A, Polman C, Montalban X, Barkhof F. MRI criteria for dissemination in space in patients with clinically isolated syndromes: a multicentre follow-up study. *Lancet Neurol*. 2006 Mar; 5(3): 221-7.
12. Masjuan J, Alvarez-Cermeño JC, García-Barragán N, Díaz-Sánchez M, Espiño M, Sádaba MC, González-Porqué P, Martínez San Millán J, Villar LM. Clinically isolated syndromes: a new oligoclonal band test accurately predicts conversion to MS. *Neurology*. 2006 Feb 28; 66 (4): 576-8.
13. Tintoré M, Rovira A, Río J, Nos C, Grivé E, Téllez N, Pelayo R, Comabella M, Sastre-Garriga J, Montalban X. Baseline MRI predicts future attacks and disability in clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2006 Sep 26; 67(6): 968-72.
14. Villar LM, García-Barragán N, Sádaba MC, Espiño M, Gómez-Rial J, Martínez-San Millán J, González-Porqué P, Alvarez-Cermeño JC. Accuracy of CSF and MRI criteria for dissemination in space in the diagnosis of multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2008 Mar 15; 266 (1-2): 34-7.
15. Brochet B. Aspects physiopathologiques, cliniques, thérapeutiques et actuels de la sclérose en plaques. *Encyclopédie médico-chirurgicale*. 1995 n°17-074-B-10.
16. Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol*. 2006 Nov; 180(1-2): 17-28.

17. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, Ohman S, Racke MK, Sharief M, Sindic CJ, Sellebjerg F, Tourtellotte WW. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol*. 2005 Jun; 62(6): 865-70.
18. Lunding J, Midgard R, Vedeler CA. Oligoclonal bands in cerebrospinal fluid: a comparative study of isoelectric focusing, agarose gel electrophoresis and IgG index. *Acta Neurol Scand*. 2000 Nov; 102(5): 322-5.
19. Fortini AS, Sanders EL, Weinshenker BG, Katzmann JA. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis. Isoelectric focusing with IgG immunoblotting compared with high-resolution agarose gel electrophoresis and cerebrospinal fluid IgG index. *Am J Clin Pathol*. 2003 Nov; 120(5): 672-5.
20. Bourahoui A, De Seze J, Gutierrez R, Onraed B, Hennache B, Ferriby D, Stojkovic T, Vermersch P. CSF isoelectrofocusing in a large cohort of MS and other neurological diseases. *Eur J Neurol*. 2004 Aug; 11(8): 525-9.
21. Caudie C. Protéines du liquide céphalo-rachidien. *Encyclopédie médico-chirurgicale Biologie Clinique*. 2004 n°90-10-0780.
22. Tintoré M, Rovira A, Río J, Tur C, Pelayo R, Nos C, Téllez N, Perkal H, Comabella M, Sastre-Garriga J, Montalban X. Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology*. 2008 Mar 25; 70(13 Pt 2): 1079-83.
23. Zipoli V, Hakiki B, Portaccio E, Lolli F, Siracusa G, Giannini M, Pantoni L, Pescini F, Sorbi S, Amato MP. The contribution of cerebrospinal fluid oligoclonal bands to the early diagnosis of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2009 Apr; 15(4): 472-8.
24. Vilming ST, Kloster R. Pain location and associated symptoms in post-lumbar puncture headache. *Cephalalgia* 1998; 18: 697-703.
25. Vilming ST, Kloster R, Sandvik L. The importance of sex, age, needle size, height and body mass index in post-lumbar puncture headache. *Cephalalgia* 2001; 21: 738-43.
26. Armon C, Evans RW; Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. Addendum to assessment: Prevention of post-lumbar puncture headaches: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2005 Aug 23; 65(4): 510-2.
27. Coyle PK, Sibony PA. Tear analysis in multiple sclerosis. *Neurology*. 1986; 36(4): 547-50.
28. Coyle PK, Sibony P, Johnson C. Oligoclonal IgG in tears. *Neurology*. 1987; 37(5): 853-6.
29. Mavra M, Thompson EJ, Nikolic J, Krunic A, Ranin J, Levic Z, Keir G, Luxton R, Youl BD. The occurrence of oligoclonal IgG in tears from patients with MS and systemic immune disorders. *Neurology*. 1990; 40(8): 1259-62.
30. Liedtke W, Weller M, Wiethölter H, Dichgans J. Immunological abnormalities in the tears of multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand*. 1992; 85(3): 228-30.
31. Martino G, Servalli C, Filippi M, Buscemi M, Martinelli V, Furlan R, Comi G, Grimaldi LM. Absence of oligoclonally restricted immunoglobulins in tears from multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*. 1993; 44(2): 149-55.
32. Forzy G, Gallois P, Hautecoeur P. Multiple sclerosis and oligoclonal bands in tears. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1999 Mar-Apr; 57(2): 240.
33. Devos D, Forzy G, de Seze J, Cailleux S, Louchart P, Gallois P, Hautecoeur P. Silver stained isoelectrophoresis of tears and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2001 Aug; 248(8): 672-5.
34. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH, Tourtellotte WW. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol*. 1983 Mar; 13(3): 227-31.
35. Calais G, Forzy G, Crinquette C, Mackowiak A, de Seze J, Blanc F, Lebrun C, Heinzlef O, Clavelou P, Moreau T, Hennache B, Zephir H, Verier A, Neuville V, Confavreux C, Vermersch P, Hautecoeur P. Tear analysis in clinically isolated syndrome as new multiple sclerosis criterion. *Mult Scler*. 2010 Jan; 16(1): 87-92.

36. M. Rogers and J. Graham, "Robust and Accurate Registration of 2-D Electrophoresis Gels Using Point-Matching", IEEE Trans. Image. Processing, vol. 16, no. 3, pp. 624-635 March 2007.
37. Pierre Marie Nugues, "Two-Dimensional Electrophoresis Image Interpretation", IEEE. Trans. Biomedical Engineering. Vol. 40. no. 8, pp. 760-770, August, 1993.
38. C.Y. Lin, Y.-T. Ching, and Y.L. Yang, "Automatic Method to Compare the Lanes in Gel Electrophoresis Images", IEEE Trans. Information Techno. In Biomed., vol. 11, no. 2, pp. 179-189, March 2007.
39. Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, Fredrikson S, Gallo P, Grimaldi LM, Grønning M, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1994 Aug;57(8):897-902.

9. Annexes

9.1. Annexe 1 : Critères de McDonald révisés en 2005 pour le diagnostic de sclérose en plaques

Présentation clinique	Données supplémentaires nécessaires au diagnostic de SEP
<p>≥ 2 poussées</p> <p>Et ≥ 2 lésions objectivées à l'examen clinique</p>	Aucune
<p>Au moins 2 poussées</p> <p>Et 1 lésion objectivée à l'examen clinique</p>	<p>Dissémination spatiale démontrée par :</p> <p>IRM (1)</p> <p>Et/ou ≥ 2 lésions IRM évocatrices de SEP avec un LCS positif (2)</p> <p>Et/ou ≥ 1 poussée ultérieure dans un site différent</p>
<p>1 poussée</p> <p>Et ≥ 2 lésions objectivées à l'examen clinique</p>	<p>Dissémination temporelle démontrée par :</p> <p>IRM (3)</p> <p>Et/ou ≥ 1 poussée ultérieure</p>
<p>1 poussée</p> <p>Et 1 lésion objectivée à l'examen clinique</p>	<p>Dissémination spatiale démontrée par :</p> <p>IRM (1)</p> <p>Et/ou ≥ 2 lésions IRM évocatrices de SEP avec un LCS positif (2)</p> <p>Et/ou ≥ 1 poussée ultérieure dans un site différent</p> <p>Et dissémination temporelle démontrée par :</p> <p>IRM (3)</p> <p>Et/ou ≥ 1 poussée ultérieure</p>

(1) Critères IRM de dissémination spatiale :

Au moins 3 des 4 critères de Barkhof *et al.* (1997) :

Au moins 1 lésion rehaussée par le gadolinium et/ou au moins 9 lésions hypersignal en T2,

Au moins 1 lésion infratentorielle,

Au moins 1 lésion juxta corticale,

Au moins 3 lésions périventriculaires.

Une lésion médullaire peut être considérée comme équivalente à une lésion cérébrale infratentorielle.

Une lésion médullaire rehaussée par le gadolinium peut être considérée comme équivalente à une lésion cérébrale infratentorielle.

Chaque lésion médullaire peut contribuer, comme une lésion cérébrale, à atteindre le nombre requis de lésions hypersignal en T2.

(2) LCS positif :

Le LCS est considéré comme positif s'il existe des bandes oligoclonales (BOC) surnuméraires d'immunoglobulines G (IgG) dans le LCS par rapport au sérum à l'isoélectrofocalisation (IEF) et/ou si l'index IgG est augmenté (Freedman *et al.*, 2005).

(3) Critères IRM de dissémination temporelle :

Au moins 1 des 2 critères suivants :

Au moins 1 lésion rehaussée par le gadolinium, au moins 3 mois après le début de l'évènement clinique initial, dans un site différent,

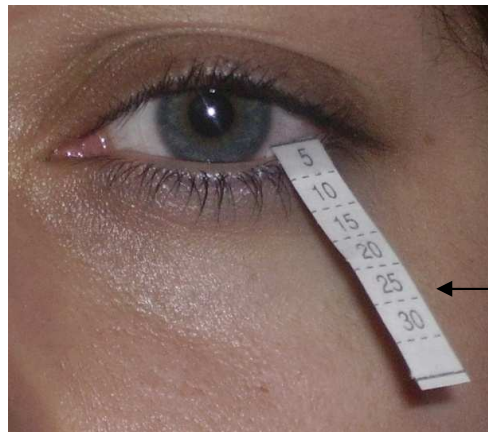
Au moins 1 nouvelle lésion hypersignal en T2, à n'importe quel moment, en comparaison avec une IRM cérébrale de référence réalisée au moins 30 jours après le début de l'évènement clinique initial.

9.2. Annexe 2 : Recueil des prélèvements

a) Prélèvement de larmes

Un prélèvement de larmes d'environ 25 μ L est effectué à l'aide d'une bandelette de Schirmer (1 à 2 graduations) placée dans le cul de sac externe de la paupière inférieure de chaque oeil . La principale cause de non-interprétabilité de l'IEF des larmes étant la dilution, le temps de prélèvement doit être au maximum d'une voire deux minutes pour un recueil idéal de 1 à 2 graduations (5 à 10 mm). En effet, une sécrétion lacrymale réflexe et donc une dilution des protéines survient au delà. Une fois le prélèvement lacrymal effectué, la partie de la bandelette humide doit être découpée puis placée dans un tube sec. Le prélèvement doit ensuite être congelé à -20°C en attente de son analyse. Ce prélèvement doit être réhydraté par 50 μ l d'eau physiologique avant réalisation de l'électrophorèse.

Figure 3 : Technique de prélèvement des larmes



Bandelette de Schirmer
(graduée en mm)

b) Prélèvement de LCS

Le recueil de LCS s'effectue par PL recueillant 12 gouttes par tube sur 1 tube secs.

Ce tube doit être ensuite congelé à -20°C.

Nota Bene : Le prélèvement de LCS se fera sur le petit tube enchâssé sur le grand tube. Surtout bien refermer le bouchon sur le petit tube pour éviter les problèmes de fuites.

c) Prélèvement sanguin

Le prélèvement sanguin (5cc) quant à lui se fait sur sang veineux périphérique, dans un tube sec avec gel séparateur, pour isolement du sérum et des éléments figurés, avant

analyse ou éventuelle congélation. Puis, il est nécessaire de centrifuger le prélèvement dans l'heure qui suit avant de conserver les tubes à -20°C.

9.3. Annexe 3 : Conditionnement et transport des prélèvements

Les tubes seront placés dans un emballage rigide individuel pour chaque patient. Chaque kit contient donc 3 tubes : 1 tube sec contenant la bandelette de Schirmer, le deuxième les 12 gouttes de LCS et le 3ème le sang centrifugé. Les prélèvements seront envoyés de façon groupée : chaque série d'envoi contiendra 5 prélèvements de patients différents. Comme les prélèvements sont congelés, leur transport se fera dans de la carboglace. Les prélèvements seront alors envoyés au laboratoire central du GHICL uniquement le lundi ou le mardi. Le promoteur prendra en charge le coût du transport des prélèvements et leur envoi sera coordonné par l'ARC promoteur du GHICL. Dès réception par le laboratoire centrale du GHICL, les prélèvements seront conditionnés en vue de l'analyse.

Important :

- Le sang ne doit pas être congelé avant centrifugation pour éviter l'hémolyse.
- L'ensemble des tubes et l'emballage doivent être étiquetés avec les références du patient.

9.4. Annexe 4 : Analyse des prélèvements

La recherche est faite par IEF sur gel d'agarose, avec constitution d'un gradient de pH et migration des protéines sous l'effet d'un champ électrique jusqu'à leur point isoélectrique (neutralité électrique obtenue à un pH donné pour chaque type de protéine), celui des immunoglobulines se situant entre pH=8 et pH=9,2, puis révélation par immunoblot.

Les gels et réactifs sont ceux des laboratoires *Helena Biosciences®*, *United Kingdom*.

Le déroulement de la procédure est le suivant :

- Dosage des IgG dans le LCS et le sérum,
- Dépôt sur le gel d'agarose de 5 µL de LCS non concentré et de 5 µL de sérum avec ajustement sur la concentration d'IgG (dilution du sérum afin d'obtenir la même concentration d'IgG que celle du LCS),
- Dépôt de 10 µL de larmes sans ajustement,
- Mise en place des tampons de pH à chaque extrémité du gel (gradient de 3 à 10),

- Migration des protéines pendant une heure sous un voltage progressif de 390 à 600 volts, avec refroidissement de la plaque de gel,
- Transfert passif des protéines sur une membrane de nitrocellulose,
- Blocage de la migration par une solution à base de protéines de lait bovines,
- Immunoblot avec un antisérum de chèvre anti-IgG humaine conjugué à une peroxydase,
- Révélation par application de chromogène additionné de peroxyde d'oxygène,
- Séchage à température ambiante.

9.5. Annexe 5 : Lecture des profils électrophorétiques

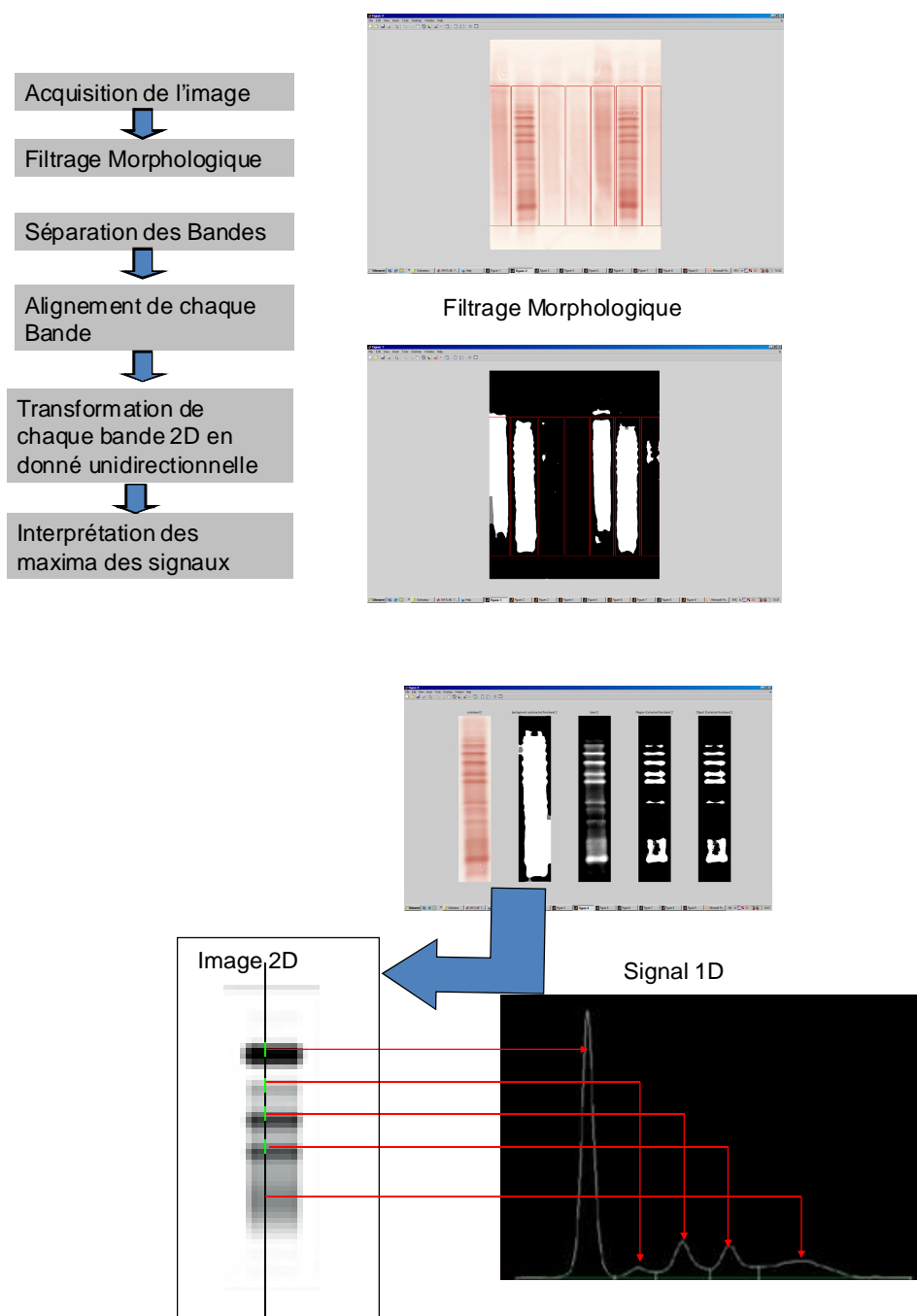
Immédiatement après l'analyse des prélèvements, les profils électrophorétiques sont numérisés par caméra et séparés. Les profils sont lus par les biologistes appartenant à 4 centres différents (Lille GHICL, Lille CHRU, CHU de Caen, CHU de Lyon), en aveugle les uns par rapport aux autres et n'ayant pas de renseignements concernant le patient. Les profils électrophorétiques des larmes et du LCS sont interprétés séparément. Un profil est considéré comme oligoclonal quand au minimum 3 bandes surnuméraires d'IgG sont détectées dans les larmes ou le LCS par rapport au sérum. En cas de désaccord sur l'interprétation, une concertation est engagée.

L'interprétation des profils électrophorétiques se fera selon les cinq types définis par le consensus international (39).

9.6 Conservation et destruction des prélèvements :

Les prélèvements seront détruits un an après la fin de la recherche.

Pour rendre l'interprétation des données plus robustes et reproductible, une analyse semi-automatique sera utilisée. La méthode générale d'analyse est décrite dans les figures suivantes :



Les images électrophorétiques à 2 dimensions sont converties en signaux à une dimension (profils électrophorétiques).

9.7. Annexe 6 : Fiche d'inclusion

Inclusion			
Etude n°	Initiales du patient*	Centre n°	Patient n°
_ _	_ _ / _ _ Nom / Prénom	_ _	_ _ _

Date d'inclusion	
Date d'inclusion	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ Jour Mois Année
Information et consentement du patient	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Données démographiques	
Sexe	Femme <input type="checkbox"/> Homme <input type="checkbox"/>
Date de naissance	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ Jour Mois Année
Critères d'inclusion	
Patient de plus de 18 ans	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Syndrome cliniquement isolé évocateur de sclérose en plaques	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Datant de moins de 3 mois	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Critères de non inclusion	
Sclérose en plaques de forme rémittente-récurrente	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Sclérose en plaques de forme progressive primaire	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Origine ethnique asiatique	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Port de verres de contacts lors du prélèvement	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Infections oculaires	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Patients ayant reçu un immunosuppresseur dans les 3 derniers mois.	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Patient ayant reçu des corticoïdes dans les 30 derniers jours.	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Syndrome clinique isolé	
Date de début du syndrome clinique isolé	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ Jour Mois Année
Traitement par bolus de corticoïdes après prélèvement	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Topographie lésionnelles suspectée (<u>une seule réponse possible</u>)	
Névrite optique rétrobulbaire	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Atteinte du tronc cérébral	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Myélite	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>

Atteinte plurifocale	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Autres : à préciser	
IRM cérébrale initiale	
Réalisée	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Date de l'examen	<div> <div> <div></div><div></div> </div> <div> <div></div><div></div> </div> <div> <div></div><div></div><div></div><div></div> </div> </div> <div> <div> <div></div> </div> <div> <div></div> </div> <div> <div></div> </div> </div>

*** 3 premières lettres du nom et 2 premières lettres du prénom du patient**

9.8. Annexe 7 : Lettre d'information

L'apport de l'isoélectrofocalisation des larmes pour le diagnostic de Sclérose en Plaques chez les patients présentant un syndrome clinique isolé (SCI) avec ou sans lésion à l'IRM.

POLAR (Profil OLigoclonal des LARmes)

Numéro Protocole : RC-P0021

Numéro IDRCB : «2011-A01269-32»

Promoteur : Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique, Hôpital St Philibert 115 rue du Grand But, BP 249, 59462 Lomme

Investigateur coordonnateur : Pr Gérard Forzy, Laboratoire de Biochimie, Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille (GHICL), 115 rue du Grand But, BP 249, 59 462 Lomme cedex

Téléphone : 03 20 22 50 12 ou 54 42

Courriel: forzy.gerard@ghicl.net

Madame, Monsieur,

Votre médecin vous propose de participer à une étude de recherche biomédicale nommée « Intérêt de l'isoélectrofocalisation des larmes pour le diagnostic de sclérose en plaques chez les patients présentant un syndrome clinique isolé avec ou sans lésion à l'IRM » conduite par le Pr Gerard Forzy.

Merci de lire attentivement cette lettre d'information et de demander à votre neurologue de vous expliquer tout ce que vous n'auriez pas compris. Il vous fournira alors toutes les informations dont vous auriez besoin.

Quel est l'objectif de cette étude de recherche clinique ?

Vous présentez des symptômes pouvant faire évoquer un syndrome clinique isolé. Afin de préciser ce diagnostic, une ponction lombaire est nécessaire pour rechercher la présence d'anomalies spécifiques.

Celle-ci permet de recueillir le liquide cérébro-spinal qui entoure le système nerveux central. En comparant les résultats d'un test appelé « isoélectrofocalisation » de ce liquide cérébro-spinal et du sang, on peut rechercher s'il existe dans votre système nerveux central une réaction inflammatoire.

Dans une étude préliminaire, les investigateurs ont montré que l'analyse des larmes pourrait apporter des informations similaires à celle du liquide cérébro-spinal dans les syndromes cliniques isolés.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'intérêt de l'isoélectrofocalisation des larmes pour le diagnostic de sclérose en plaques chez les patients présentant un syndrome clinique isolé, avec ou sans lésion à l'IRM, afin de **limiter dans le futur le nombre de ponctions**

lombaires nécessaires en utilisant à la place, chaque fois que cela sera possible, l'analyse des larmes.

Quel est le nombre de patients participants et quelle est la durée de l'étude ?

Un total de 242 personnes participera à cette étude dans 15 centres en France.

La durée de l'étude est de 2 ans par patient. L'étude s'effectue dans l'hôpital où vous êtes pris(e) en charge. Par rapport aux soins habituels, seul un prélèvement de larmes par papier buvard, ainsi que quelques gouttes de plus de liquide cérébro-spinal et de sang sont ajoutés.

Quels sont les effets indésirables et les contraintes prévisibles ?

Une irritation locale par le papier buvard est possible.

Les données sont-elles confidentielles

Les données médicales vous concernant feront l'objet d'un traitement informatique destiné à l'évaluation scientifique de l'étude. Elles ne seront transmises dans des conditions garantissant leur confidentialité, c'est-à-dire de manière anonymisée, qu'au(x) destinataire(s) suivant(s) : le promoteur, ainsi que le cas échéant aux autorités sanitaires habilitées. En vertu des articles 39, 40 et 56 de la loi n° 78-17 du 06 Janvier 1978 modifiée par la loi 2004-801 du 06 août 2004 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, vous pourrez exercer vos différents droits dont celui d'accès, d'interrogation, de rectification et d'opposition concernant la levée du secret professionnel auprès du médecin qui vous propose de participer à l'étude ou auprès du Pr Gérard Forzy. Par ailleurs, conformément à l'article L.1111-7 du Code de la Santé Publique, les données de santé vous concernant peuvent vous être communiquées par le médecin de l'étude, selon votre choix, directement ou par l'intermédiaire d'un médecin que vous désignerez à cet effet.

Les informations médicales que vous acceptez de fournir seront collectées et analysées. Celles-ci comprennent vos données cliniques ainsi que les questionnaires. En signant le consentement, vous autorisez le neurologue et son équipe à utiliser ces informations au cours de l'étude, et vous permettez au promoteur de l'étude, le Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille ou à ses représentants d'avoir accès à votre dossier médical en vue de contrôler les données.

Les résultats globaux de cette étude pourront être présentés lors de congrès ou faire l'objet de publications ; toutefois, votre identité ne sera pas révélée dans ces présentations. En aucune façon, votre nom ne sera utilisé sur des documents en relation avec les résultats de cette étude. De même, vos données médicales ou les résultats de vos tests ne seront pas divulgués à de tierces personnes.

Quels sont mes devoirs et droits en tant que participant à cette recherche ?

Afin de pouvoir participer à cette étude vous devez être affilié à un régime d'assurance maladie ou ayant droit d'un assuré social.

Votre participation à cette étude est entièrement volontaire.

Vous êtes libre de refuser d'y participer et vous pouvez arrêter votre participation à l'étude à tout moment sans que cela vous pénalise. Votre neurologue peut décider de vous sortir de l'étude s'il pense que cela est de votre intérêt.

De plus, le promoteur peut arrêter l'étude à tout moment pour des raisons administratives. Si vous sortez d'étude prématurément, votre neurologue discutera avec vous de la procédure de fin d'étude.

A qui dois-je m'adresser en cas de questions ?

Votre médecin traitant sera informé de votre participation à ce protocole de recherche. Si vous avez des questions concernant votre participation à cette recherche, s'il vous arrive des événements inhabituels durant votre participation, ou en cas d'urgence, vous devez contacter votre médecin investigateur référent aux coordonnées suivantes :

Dr
Adresse :
Téléphone :

Une assurance a été souscrite, conformément à la législation en vigueur, auprès de la société AXA 26 rue Drouot 75009 Paris, dont le n°de contrat est le n°524849 2304

Le protocole, version 5.1 du « 20/01/2012 » a été déclaré auprès de l'Autorité Compétente (Agence française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé - AFSSAPS) qui a donné son autorisation le « 07/02/2012 ».

Le Comité de Protection des Personnes (CPP Nord-Ouest IV) a rendu un avis favorable le « 13/03/2012 ».

Enfin, le protocole de recherche a été déclaré auprès de la CNIL (Commission nationale de l'informatique et des libertés) à la date du « ».

Le formulaire de la lettre d'information est destiné au patient.

Le formulaire de recueil du consentement est à signer en trois exemplaires : un exemplaire pour le patient, le deuxième pour le promoteur, et le troisième conservé par l'investigateur.

Formulaire de consentement

« L'apport de l'isoélectrofocalisation des larmes pour le diagnostic de Sclérose en Plaques chez les patients présentant un syndrome clinique isolé (SCI) avec ou sans lésion à l'IRM ». POLAR (Profil OLigoclonal des LARmes)

N°ID RCB: 2011-A01269-32

Promoteur

Groupe Hospitalier d' l'Institut Catholique de Lille
115 rue du Grand But
BP 249
59 462 Lomme

Investigateur coordonateur : Pr Gérard Forzy

Adresse : Laboratoire de Biochimie, Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille (GHICL), 115 rue du Grand But, BP 249, 59 462 Lomme cedex

Téléphone : 03 20 22 50 12 ou 54 42

Courriel : forzy.gerard@ghicl.net

Etude POLAR : Etude interventionnelle, multicentrique, prospective, ayant pour objectif d'évaluer l'intérêt de l'isoélectrofocalisation des larmes pour le diagnostic de sclérose en plaques chez les patients présentant un syndrome clinique isolé, avec ou sans lésion à l'IRM.

La durée de l'étude est de 2 ans par patient. L'étude s'effectue sur l'hôpital de prise en charge. Par rapport aux soins habituels, seul un prélèvement de larmes par papier buvard, ainsi que quelques gouttes de plus de liquide cérébro-spinal et de sang sont ajoutés, sans autre effet indésirable potentiel qu'une irritation locale par le papier buvard lors du prélèvement de larmes.

Je soussigné(e),

Mr/Mme/Mlle.....

Etre affilié(e) ou bénéficiaire d'un régime de sécurité sociale et déclare avoir été informé(e) par la personne dont la signature figure ci-dessous de la nature de l'étude interventionnelle « Intérêt de l'isoélectrofocalisation des larmes pour le diagnostic de sclérose en plaques chez les patients présentant un syndrome clinique isolé, avec ou sans lésion à l'IRM » ayant reçu l'avis CPP le 13/03/2012 et AFSSAPS le 07/02/2012.

J'ai reçu une copie de la note d'information destinée au patient et j'ai eu la possibilité de poser suffisamment de questions et je n'ai pas de questions supplémentaires pour l'instant.

Ma participation à cette étude est volontaire. Je peux, à tout moment, si je le souhaite mettre un terme à ma participation sans être désavantagé par la suite au niveau des soins

médicaux qui me seront dispensés. J'en informerai alors le neurologue. Il ne me sera pas demandé de donner les raisons de ma décision.

J'accepte que les données enregistrées à l'occasion de cette étude interventionnelle, et particulièrement les informations provenant des comptes-rendus médicaux identifiés par mes initiales (en d'autres termes sans mon nom complet), ma date de naissance et mon sexe puissent être, sous forme anonymisées, enregistrées, archivées et exploitées, transmises au Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille (le promoteur de l'étude). En vertu des articles 39, 40 et 56 de la loi n°78- 17 du 06 Janvier 1978 modifiée relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, je pourrai exercer mes différents droits dont celui d'accès, d'interrogation, de rectification et d'opposition concernant la levée du secret professionnel auprès du médecin qui me propose de participer à cette étude.

Conformément à l'article L.1111-7 du Code de la Santé Publique, j'ai bien noté que les données de santé me concernant peuvent m'être communiquées par le médecin de l'étude selon mon choix directement ou par l'intermédiaire d'un médecin que je désignerai à cet effet.

De plus, j'accepte que les données médicales me concernant puissent être examinées par les représentants de Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille. Ceci a pour but d'assurer un enregistrement complet et correct des données essentielles pour l'évaluation scientifique de l'étude et pour vérifier que l'étude a été menée correctement.

Fait à, le

Fait à, le

Nom du patient :

Nom du médecin :

Signature du patient :

Signature du médecin :

(Ou représentant légal)

Une assurance a été souscrite, conformément à la législation en vigueur, auprès de la société AXA 26 rue Drouot 75009 Paris, dont le n° de contrat est le n°5248492304

*Le protocole, **version 5.1 du « 20/01/2012 »** a été déclaré auprès de l'Autorité Compétente (Agence française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé - AFSSAPS) **qui a donné son autorisation le « 07/02/2012 »**.*

*Le Comité de Protection des Personnes (CPP Nord-Ouest IV) a rendu un avis favorable le « **13/03/2012** ».*

*Enfin, le protocole de recherche a été déclaré auprès de la CNIL (Commission nationale de l'informatique et des libertés) à la **date du « »**.*

Le formulaire de la lettre d'information est destiné au patient. Le formulaire de recueil du consentement est à signer en trois exemplaires : un exemplaire pour le patient, le deuxième pour le promoteur, et le troisième conservé par l'investigateur.