

Table des Matières

I. Introduction

<u>1. « Inflammatory Bowel diseases » ou maladie de Crohn et rectocolite ulcéro hémorragique, deux pathologies hétérogènes</u>	
1.1. Nomenclature, tableaux cliniques et données épidémiologiques	1
1.2. Etiologie	2
1.2.1. Altérations de la barrière intestinale	5
1.2.2. Infections	7
1.2.3. La voie des TLRs ou récepteurs « Toll-like »	8
1.2.4. Les protéines NODs	12
1.2.5. Les cytokines	15
1.2.5.a. <i>TNFα ou facteur nécrosant des tumeurs α</i>	21
1.2.5.b. <i>Chémokines</i>	25
1.2.6. Plaquettes et IBD	27
1.2.7. Apoptose	37
1.2.8. Angiogenèse	37
1.2.9. Facteurs génétiques	38
1.3. Moyens diagnostiques	42
1.3.1. Tableau clinique et imagerie	42
1.3.2. Outils biologiques	45
1.3.2.a. <i>Protéines de phase inflammatoire aiguë</i>	45
<i>CRP ou « C reactive protein »</i>	45
<i>La calprotectine</i>	46
1.3.2.b. <i>Anticorps</i>	47
<i>Anticorps dirigés contre les hôtes symbiotiques ou certains pathogènes</i>	48
<i>Autoanticorps</i>	49
<i>Combinaison des tests ASCA et ANCA</i>	52
1.4. Traitements actuels et gestion des différentes phases de la maladie	53
1.4.1. Thérapies classiques	53
1.4.2. Thérapie biologique actuelle et en développement	54
1.4.3. Thérapie anti-TNF α	56
1.5. Vers un diagnostic précoce et un suivi personnalisé du patient	60
<u>2. Protéomique clinique, recherche de nouveaux biomarqueurs diagnostiques</u>	61
2.1. Protéomique et enjeux diagnostiques	61
2.3. Outils de protéomique différentielle	64
2.4. Techniques de protéomique dédiées à l'identification des biomarqueurs	65
2.5. Résultats obtenus avec la technique SELDI-TOF-MS	68
2.6. La protéomique et les IBDs	72

II. Matériel et Méthodes

<u>1. La spectrométrie de masse SELDI-TOF</u>	75
1.1. Principe de l'appareil	75
1.2. Stratégie utilisée	78
<u>2. Analyse statistique univariée et multivariée</u>	81
2.1. Analyse univariée : principe, avantages, limitations	81

2.2. Analyse multivariée : principe, avantages, limitations	82
3. Purification des biomarqueurs	85
3.1. Principes de base et méthodes utilisées.....	85
3.1.a. Purification sur résines protéines A-Agarose (Sigma)	86
3.1.b. Purification par chromatographie sur résines échangeuses d'ions.....	86
3.1.c. Purification par affinité avec anticorps spécifiques.....	88
3.1.d. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 1D.....	88
3.1.e. Traitements des protéines séparées sur gel d'acrylamide 1D.....	89
4. Identification par spectrométrie de masse des biomarqueurs purifiés	
4.1. Séquençage par LC/MS-MS.....	91
4.2. Séquençage par MALDI/ MS-MS.....	91
5. Visualisation et quantification des biomarqueurs	
5.1. « Westren blotting »	92
5.2. Dosages ELISA :	92
5.3. Détection de la présence d'anticorps ASCA et du statut pANCA	93
6. Sujets de l'étude	
6.1. Sérothèque et collecte des échantillons.....	93
6.2. Données épidémiologiques des sujets de l'étude	93
III. Buts du travail	95
IV. Résultats de la recherche de nouveaux biomarqueurs protéiques pour le diagnostic des pathologies IBD	
1. Sujets de l'étude	
1.1. Caractéristiques des sujets sains et patients sélectionnés.....	97
1.2. Données épidémiologiques des sujets de l'étude	97
2. Mise au point des conditions expérimentales et acquisition des spectres	
2.1. Mise au point des conditions expérimentales.....	101
2.2. Acquisition des spectres et spectres représentatifs obtenus	102
3. Analyse comparative des spectres de masse des sujets sains, IBD et contrôles inflammatoires	
3.1. Du spectre aux données numériques	104
3.2. Résultats avec l'incrémentation à pas variables.....	104
3.2.1. Incrémentation à pas variables	104
3.2.2. Analyse univariée	105
3.2.3. Analyse Multivariée.....	110
3.3. Résultats obtenus avec les pics intégrés	112
3.3.1. Pics intégrés	112
3.3.2. Analyse univariée	118
3.3.3. Analyse multivariée	118
3.4. Comparaison des résultats obtenus avec les deux manières de générer des données numériques : Pics intégrés versus incrémentation à pas variables.....	124
4. Classifications des patients suivant les tests ASCA et ANCA et comparaison avec les modèles multivariés obtenus à partir des spectres SELDI-TOF-MS	126
5. Analyse des biomarqueurs potentiels « pré-sélectionnés » par les deux méthodes statistiques : univariée et multivariée	

5.1. Analyse sur tous les biomarqueurs.....	132
5.2. Recherche de biomarqueurs potentiels statistiquement pertinents et non directement liés à l'inflammation.....	134
6. Purification et identification de biomarqueurs potentiels	137
6.1. Utilisation du logiciel TagIdent afin de prédire l'identification de biomarqueurs potentiels	138
6.2. Purification et identification de biomarqueurs potentiels	139
7. Modèles simplifiés à partir des biomarqueurs identifiés	171
8. Corrélations entre les biomarqueurs purifiés	175
9. Corrélations entre les biomarqueurs identifiés et caractéristiques des patients ...	179

V. Etude préliminaire sur la réponse au traitement Infliximab

1. Cadre et buts de cette étude préliminaire	185
2. Plan expérimental	188
3. Résultats	188
4. Conclusions et perspectives	196

VI. Pertinence des biomarqueurs identifiés dans le contexte de la physiopathologie des IBD

199

VII. Conclusions et discussion générale

1. La technique SELDI-TOF-MS	219
2. Le diagnostic à partir d'une signature protéique	219
3. Traitement bioinformatique des données	220
4. Conclusion et perspectives sur la recherche de nouveaux biomarqueurs spécifiques des IBDs	222

VIII. Références

225

IX. Annexes.....

249

Abstract

Background and aims

Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) known as inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic immuno-inflammatory pathologies of the gastrointestinal tract. These diseases are multifactorial, polygenic and of unknown etiology. Clinical presentation is non specific and diagnosis is based on clinical, endoscopic, radiological and histological criteria. Novel biomarkers are needed to improve early diagnosis and classification of these pathologies as well as to monitor or predict the effects of therapy.

Methods

We performed a study with 120 serum samples collected from patients classified in 4 groups: 30 CD, 30 UC, 30 inflammatory controls (IC) and 30 healthy controls (HC), according to accredited criteria. We compared protein sera profiles obtained with a Surface Enhanced Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometer (SELDI-TOF-MS). Data analysis with an original multivariate statistical method based on multiple decision trees algorithms allowed us to select new potential biomarkers. Eight of them were purified and identified by mass spectrometry and antibody based methods. Moreover, a similar analysis was applied on sera taken from patients before and after treatment with Infliximab. We obtained multivariate models based on biomarkers able to predict the response and monitor changes in protein profiles before and after therapy. One biomarker was identified by an antibody based method and is able to predict clinical response to anti-TNF therapy.

Results

Multivariate analysis generated models that could classify samples with good sensitivity and specificity (minimum 80%) discriminating IBD *versus* HC and IC or CD *versus* UC. The discrimination of these multivariate models and those of some identified combined biomarkers were compared to ASCA and ANCA tests and showed better or equivalent power

of discrimination. Eight biomarkers were purified and identified: Platelet aggregation Factor 4 (PF4), the Myeloid Related Protein 8 (MRP8), the Fibrinopeptide A (FIBA), the Haptoglobin α 2 subunit (Hp α 2). They were detected in sera by classical methods, when available. Unique decision tree was built with these biomarkers and correlations with characteristics of patients and between biomarkers were calculated. Finally, we also adressed with a similar strategy predictor of response to Infliximab therapy.

Conclusions

SELDI-TOF-MS technology combined with the use of the multiple decision trees method, as robust statistical tool, led to the selection of protein biomarker patterns and of specific biomarkers which could be helpful for diagnosis of inflammatory bowel diseases and prediction of therapy effects as well as understanding of these diseases pathophysiology.

Résumé

Buts

La maladie de Crohn (CD) et la rectocolite ulcéro-hémorragique (UC), désignées conjointement sous le nom « Inflammatory Bowel Disease » (IBD), sont deux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Ces pathologies n'ont pas une étiologie formellement identifiée et semblent être multifactorielles et polygéniques. Leurs présentations cliniques sont aspécifiques et leur diagnostic est actuellement basé sur les données cliniques, endoscopiques, radiologiques et histologiques. Ainsi, de nouveaux marqueurs spécifiques et sensibles de ces pathologies sont nécessaires afin d'améliorer le diagnostic précoce et la classification de ces pathologies, ainsi que pour suivre, voire prédire la réponse aux traitements.

Méthodes:

Une étude protéomique a été réalisée sur 120 échantillons sériques provenant de patients classés en 4 groupes (30 CD, 30 UC, 30 IC et 30 HC), suivant les critères accrédités. Nous avons comparé les profils protéiques obtenus par « Surface Enhanced Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometer » (SELDI-TOF-MS). L'analyse des données avec une méthode statistique multivariée originale, basée sur la construction d'arbres de décisions multiples, nous a permis de sélectionner certains biomarqueurs potentiels. Huit d'entre eux ont été identifiés par spectrométrie de masse et des techniques de reconnaissance spécifique par anticorps. De plus, une analyse similaire a été effectuée sur des échantillons provenant de patients avant et après traitement par Infliximab. Nous avons obtenu à partir des profils protéiques, des modèles de classification statistiques multivariés et finalement certains biomarqueurs potentiels de prédiction de la réponse au traitement. De plus, un biomarqueur a été identifié par reconnaissance via un anticorps spécifique.

Résultats

L'analyse multivariée a généré des modèles de classification présentant de bonnes sensibilités et spécificités (minimum 80%) pour la discrimination des patients IBD *versus* contrôles ou encore, CD *versus* UC. Les résultats ont été comparés avec ceux des tests ASCA et ANCA et montrent une efficacité équivalente ou supérieure. Huit biomarqueurs ont été purifiés et identifiés : le facteur d'agrégation plaquettaire 4 (PF4), la protéine MRP8 ou «Myeloid Related Protein 8», le fibrinopeptide A (FIBA), la sous-unité $\alpha 2$ de l'haptoglobine (Hpa2). Ces protéines et peptides ont été détectés, lorsque possible, dans le sérum par les méthodes classiques. Un arbre de décision multiple a été construit sur base de ces biomarqueurs. Les corrélations entre ceux-ci et avec les caractéristiques des patients ont été également évaluées.

Conclusions

La technique SELDI-TOF-MS combinée à l'utilisation des arbres de décisions multiples en temps que méthode d'analyse statistique robuste, a mené à l'obtention de signatures protéiques caractéristiques et à la sélection de biomarqueurs spécifiques qui peuvent se révéler utiles au diagnostic des pathologies IBD, au suivi, comme à la prédiction des effets des thérapies et à la compréhension de la physiopathologie de ces maladies