

I. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)

A. Définition

Ce terme regroupe deux pathologies inflammatoires intestinales chroniques, d'étiologie inconnue dont la présentation clinique et morphologique est différente : la maladie de Crohn (MC) et la recto-colite ulcéro-hémorragique (RCUH). Elles affectent des sujets jeunes et évoluent par poussées suivies de rémissions. Une troisième entité peut être ajoutée, la « colite indéterminée », présentant les caractéristiques d'une colite idiopathique pour laquelle l'ensemble des examens réalisés ne permet pas de trancher entre maladie de Crohn et recto-colite (Figure 1).

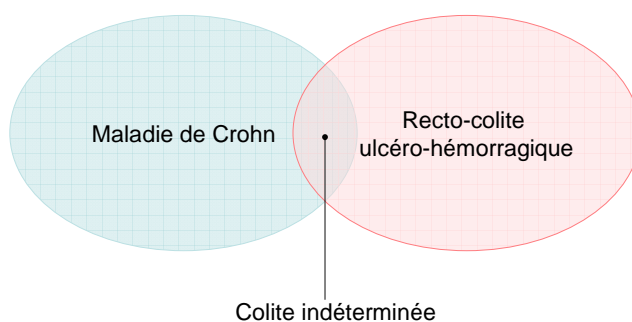


Figure 1. Représentation des pathologies reprises sous le terme de MICI.

B. Historique

Les maladies inflammatoires intestinales affectent très certainement l'être humain depuis des siècles. Certaines descriptions anatomo-cliniques remontant à l'Antiquité sont compatibles avec le diagnostic de MICI. Elles ont été décrites dès le deuxième siècle après J.-C. par les médecins grecs Soranus et Aretaeus de Cappadocia. En 870, le roi Alfred d'Angleterre (849 -901) souffrait de douleurs abdominales, de malaises et de diarrhées chroniques, attribués à l'époque à de la sorcellerie ou au châtement divin suite à ses infidélités, mais probablement dus à une MICI. Louis XIII (1601-1643), mort après six semaines de coliques et vomissements, était

vraisemblablement atteint de la maladie de Crohn et est probablement mort de ses traitements : trente-quatre saignées, mille deux cents lavements et deux cent cinquante purges auraient été effectués durant ses deux dernières années de vie. En 1612, l'autopsie d'un jeune garçon rapporte des ulcérations intestinales semblables à celles présentes dans les MICI (Fielding, 1988). En 1913 le Docteur T.K. Dalziel publie le résultat d'autopsie de 13 patients souffrant d'obstruction intestinale. Tous les patients présentaient une inflammation intestinale transmurale, caractéristique de la maladie de Crohn (Dalziel, 1989).

La maladie de Crohn a été décrite en 1932 dans « Journal of the American Medical Association » par les Docteurs B. Crohn, L. Ginsberg et G.D. Oppenheimer comme iléite terminale (atteignant l'iléon). L'extension des lésions à d'autres segments du tube digestif a ensuite été rapportée et le nom de maladie de Crohn attribué à cette pathologie.

Quant à la recto-colite ulcéro-hémorragique, le premier cas décrit de RCUH fut reporté par Sir S. Wilks dans « London Medical Times and Gazette » en 1859 suite à l'autopsie d'une jeune femme, Isabella, dont le décès avait été attribué à un empoisonnement (Wilks, 1859). En 1875, Wilks et Moxon furent les premiers à la présenter comme pathologie non infectieuse (Wilks S, 1875).

C. Epidémiologie

Les maladies inflammatoires intestinales touchent principalement les adolescents et les adultes jeunes (15-30 ans, avec une recrudescence à 50 ans pour la RCUH). En Belgique, leur prévalence est estimée à 0.1% pour la MC et 0.05% pour la RCUH. Elles touchent principalement les caucasiens, avec un gradient décroissant nord-sud, et particulièrement la population juive chez qui elle est de trois à huit fois plus fréquente (Binder, 2004; Calkins *et al.*, 1986). Leur incidence a augmenté au cours de ces 20 dernières années et est supérieure en zones urbaines par rapport aux zones rurales (Calkins *et al.*, 1986; Houghton *et al.*, 1958).

D. La maladie de Crohn (MC)

a. Manifestations cliniques

La maladie de Crohn se présente habituellement chez un jeune adulte par des douleurs abdominales accentuées après les repas, de la diarrhée, de la fatigue, un amaigrissement et un état subfébrile. Elle évolue par poussées inflammatoires dont l'intensité et la fréquence varient selon les patients. La perte sanguine chronique, due à l'inflammation intestinale, peut se manifester sous forme de rectorragie en cas d'atteinte colique et peut, en étant associée à un apport alimentaire déficient, entraîner une anémie. La malnutrition, la malabsorption et la perte de poids sont fréquentes à tous les stades de la maladie de Crohn. Environ 10 % à 15 % des patients consultent dans le cadre d'une atteinte périanale, de fièvre ou suite à une manifestation extra-intestinale et ne présenteront des douleurs abdominales et des diarrhées que par la suite. Le syndrome inflammatoire est marqué au niveau sanguin par une hyperleucocytose avec polynucléose et une augmentation des protéines inflammatoires. Ces protéines, dont la C-réactive protéine (CRP), servent de marqueurs de l'activité et de l'évolution de la pathologie. Un taux sérique de CRP augmenté est associé à une MC active, observable en colonoscopie, ou annonce une rechute de la maladie lorsqu'elle est associée à une stabilité clinique. Une hypoalbuminémie, une thrombocytose ainsi qu'une anémie sont également typiquement associées.

Outre les manifestations intestinales de la MC, 6-47% des malades présentent des manifestations extra-intestinales. Celles-ci peuvent être difficiles à différencier des complications extra-intestinales de la MC dues par exemple à la malnutrition, à l'inflammation chronique ou à des effets secondaires de la thérapeutique (Table 1) (Danese *et al.*, 2005; Rothfuss *et al.*, 2006). Ces manifestations extra-intestinales et semblent être liées à une prédisposition génétique. En effet, un taux élevé de concordances entre jumeaux (80%) et apparentés (68%) suggère la présence d'un terrain génétique prédisposant (Satsangi *et al.*, 1996).

Table 1. Symptômes extra-intestinaux dans les MICI (adapté de World Journal of Gastroenterology. Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases)

Manifestations extra-intestinales	Complications extra-intestinales
Maladies musculo-squelettiques	
Arthrite périphérique Spondylarthrite ankylosante Sacroiléite Maladie de Crohn métastatique	Ostéoporose et ostéonécrose pharmaco-induite Arthrite septique
Maladies mucocutanées	
Erythème noueux Pyoderma gangraenosum Stomatite aphteuse	Fissures anales Fistules Purpura Glossite Perte de cheveux Perlèche Candidoses Mucosites / stomatites Exanthème allergique
Maladies oculaires	
Uvéite Conjonctivite Episclérite	Kératopathie Infections opportunistes
Maladies hépatobiliaires	
Cholangite sclérosante primaire Hépatite granulomateuse	Cholélithiases Hépatite stéatosique
Maladies pancréatiques	
Pancréatite aiguë Pancréatite chronique	Pancréatite pharmaco-induite Pancréatite biliaire
Maladies vasculaires	
Thrombo-embolies	Anémie Thrombocytose; Leucocytose Hypercoagulation
Maladies rénales	
Protéinurie tubulaire	Lithiases rénales Néphrite interstitielle aiguë Insuffisance rénale Amyloïdose
Maladies bronchopulmonaires	
Bronchite chronique Laryngotrachéite Pleurésie	Fibrose pulmonaire Pleurésie Infections opportunistes
Maladies cardiaques	
Péricardite	Péricardite
Maladies neurologiques	
Maladies démyélinisantes Névrite optique	Neuropathies périphériques Leucoencéphalopathies

b. Anatomopathologie

Les lésions atteignent principalement la région iléo-colique mais peuvent toucher tout le tube digestif, de la bouche à l'anus (Figure 2).

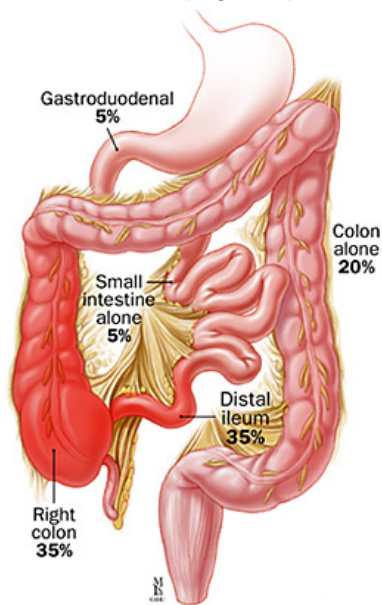


Figure 2 Localisation des lésions dans la maladie de Crohn.

D'après «The Johns Hopkins Medical Institutions. Gastroenterology &Hepatology Resource Center ».

Ces lésions se manifestent sous forme d'ulcérations accompagnées d'un processus inflammatoire qui s'étend à toutes les couches de la paroi intestinale (inflammation transmurale) et entraîne un épaissement pariétal. Le processus inflammatoire est souvent discontinu, des segments d'intestin normaux séparant des segments atteints. La surface de la muqueuse du segment atteint présente un aspect «pavimenteux » caractéristique (en pavés de chemin), du aux ulcérations profondes de la muqueuse et à l'épaississement nodulaire de la sous-muqueuse (Figure 3). L'examen histologique révèle un épaissement de la sous-muqueuse, une hyperplasie des follicules lymphoïdes, et plus tard une fibrose de la sous-muqueuse. On observe dans 40% des cas un granulome tuberculoïde non caséifiant, caractéristique de la pathologie.

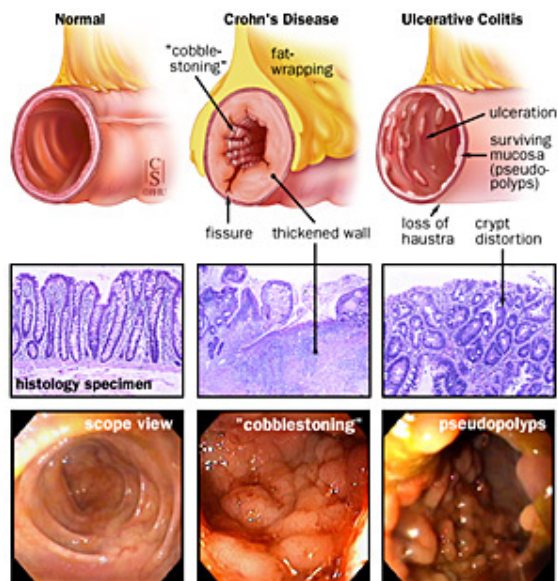


Figure 3. Aspect anatomopathologique de la maladie de Crohn et de la RCUH.

D'après «The Johns Hopkins Medical Institutions. Gastroenterology &Hepatology Resource Center ».

Certains critères ont été établis pour différencier les phénotypes de la MC (critères de Vienne ou de Montréal) et sont basés sur l'âge d'apparition de la maladie, sa localisation et les signes cliniques (Table 2). Ainsi, selon la classification de Vienne, on peut classer la MC en trois catégories: fistulisante, luminale ou inflammatoire (non fistulante, non sténosante) (Figure 4) (Gasche *et al.*, 2000).

Table 2. Classifications de Vienne et de Montréal pour la MC.

	Vienne	Montréal
Âge de diagnostic	A1 : < 40 ans A2 : > 40 ans	A1 : < 16 ans A2 : 17 < âge < 40 ans A3 : > 40 ans:
Localisation	L1 : iléal L2 : colon L3 : iléo-colique L4 : en amont du tiers distal de l'iléon	L1 : iléal L2 : colon L3 : iléo-colique L4 : en amont du tiers distal de l'iléon
Intensité	B1 : non fistulisante, non sténosante B2 : sténosante B3 : fistulisante	B1 : non fistulisante, non sténosante B2 : sténosante B3 : fistulisante P : atteinte périanales

Dans Montreal :

L4 peut être associé à L1 à 3 en cas d'atteinte concomitante du gros intestin, P peut être associée à B1 à 3 en cas d'atteinte concomitante.

Forme fistulisante :

L'inflammation de la séreuse et du mésentère entraîne l'adhésion par des bandes fibreuses des anses intestinales entre elles, pouvant aboutir à la formation de fistules caractéristiques de la maladie. Celles-ci prennent naissance dans des ulcérations, puis percent graduellement la séreuse et les organes adjacents. Ces fistules font communiquer les anses intestinales entre elles ou avec le côlon, la peau, le périnée, la vessie, le vagin. Elles peuvent aussi communiquer avec des abcès situés dans la cavité péritonéale, le mésentère ou les structures rétropéritonéales. La présence d'ulcères péri-anaux est également caractéristique de cette forme.

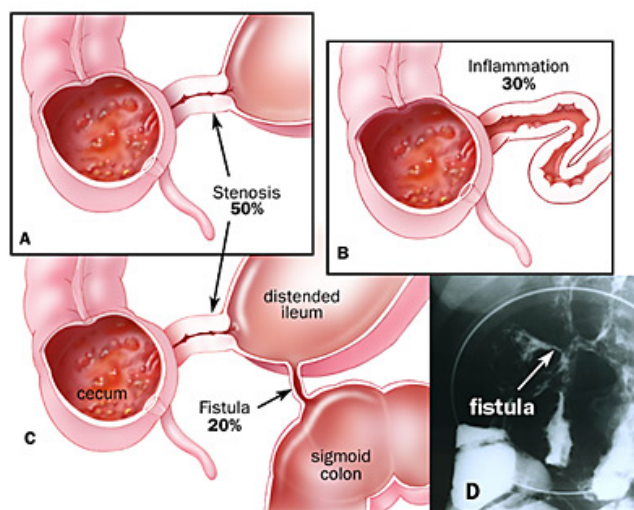


Figure 4. Représentations des fistules et sténoses dans la MC.

D'après "The Johns Hopkins Medical Institutions. Gastroenterology & Hepatology Resource Center ».

Forme sténosante:

La présence d'une inflammation, d'une fibrose cicatricielle et d'un oedème entraîne un rétrécissement de la lumière intestinale causant ainsi ballonnement, nausées, vomissement de matières fécales et constipation. Cette sténose peut devenir complète et entraîner une obstruction intestinale aiguë.

Non fistulisante non sténosante :

Il s'agit de formes purement inflammatoires, n'ayant jamais eu de complications au cours de la maladie, souvent localisées au colon.

Cependant ces classifications sont actuellement fortement remises en question étant donné que ces phénotypes sont liés à la localisation primaire des lésions et varient au cours de l'évolution de la maladie chez un même individu (Fedorak, 2004; Louis *et al.*, 2001).

c. Complications

Les complications intestinales de la MC sont souvent liées à leur localisation. Elles comprennent les sténoses et obstructions intestinales, les fistules et abcès, les hémorragies digestives et la cancérisation. Les cancers du colon sont trois fois plus fréquents chez les patients atteints de MC par rapport à la population générale (Friedman, 2006); ceux du grêle sont même jusqu'à 30 fois plus fréquents.

Les complications extra-intestinales liées à la maladie sont reprises dans la table 1.

d. Diagnostic

Le diagnostic de la MC repose sur des caractéristiques morphologiques ainsi que sur l'exclusion d'une maladie grêle ou colique spécifique.

On utilisera différentes techniques d'imagerie médicale (lavement baryté, endoscopie avec biopsies, tomodensitométrie) en fonction de la localisation probable des lésions. Les images observées sont celles décrites précédemment.

Des examens sériques et coprologiques sont réalisés en vue de rechercher une infection spécifique.

Un dosage des anticorps sériques peut être effectué afin d'orienter le diagnostic. En effet, les patients atteints de MC présentent plus fréquemment des anticorps périnucléaire anti-neutrophile (pANCA) et anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA) par rapport à la population générale, alors que dans la RCUH ce sont uniquement les pANCA qui sont présents. Les statuts sérologiques ANCA+/ASCA- pour la RCUH

et ANCA-/ASCA+ pour la MC peuvent apporter une aide à la classification des patients entre ces deux sous groupes, cependant ces tests restent peu sensibles.

Une évaluation du stade clinique de la maladie peut être effectuée selon différents critères. Un des index utilisé est l'index d'activité CDAI (Crohn's Disease Activity Index), basé sur des données cliniques et biologiques (Table 3) (Sostegni *et al.*, 2003).

Table 3. Paramètres définissant le score CDAI dans la MC

Nombre de selles liquides Douleur abdominale Bien-être Présence de symptômes liés à la pathologie (arthrite/arthralgie, uvéite, stomatite, fissure/fistule, fièvre) Traitement de la diarrhée Masse abdominale Taux d'hématocrite Perte de poids

e. Traitement

Le traitement de la maladie de Crohn dépend essentiellement de la sévérité de la maladie, de sa localisation, des complications et de la réponse aux précédentes thérapeutiques. Le but est de contrôler l'inflammation, de corriger les déficiences nutritives, et de palier aux symptômes tels que douleurs abdominales, diarrhées et rectorragie.

Le traitement symptomatique comprend des anti-diarrhéiques, des spasmolytiques, des pansements intestinaux et une alimentation sans résidus. Le suivi diététique et nutritionnel est important pour limiter les intolérances alimentaires et palier à une malnutrition. Durant les phases actives de la maladie une alimentation entérale liquide est utilisée, faisant place à une alimentation parentérale totale temporaire dans les formes graves.

Le traitement conventionnel implique en première approche les aminosalicylés qui diminuent l'inflammation intestinale. Dans les formes sévères, l'inflammation peut être contrôlée par des corticostéroïdes (Otley *et al.*, 2005). Etant donné l'apparition

d'effets secondaires et de cortico-dépendance, les corticostéroïdes sont prescrits pour une période courte et pas en traitement d'entretien.

En cas de cortico-résistance, cortico-dépendance ou de formes fistulisantes, un traitement par immunomodulateurs (azathioprine, méthotrexate) peut être envisagé.

Depuis une dizaine d'années, les thérapies biologiques telles que des antagonistes et anticorps dirigés contre des interleukines ou contre le « tumor necrosis factor alpha » (TNF α) sont testées dans le cadre d'études randomisées. Actuellement, seul l'Infliximab (IFX) (un anticorps chimérique anti-TNF α) est utilisé dans le traitement de la maladie de Crohn active et réfractaire à d'autres traitements et dans les formes fistulisantes (Kuhbacher *et al.*, 2007). Deux autres anti-TNF, l'adalimumab et le certolizumab pegol sont proches de la commercialisation.

Le traitement chirurgical est proposé en cas d'échec du traitement médical et en présence de complications chroniques ou aiguës (perforations).

Des antibiotiques tels que le metronidazole ou la ciprofloxacine sont efficaces dans les localisations ano-périnéales de la MC.

E. La recto-colite ulcéro-hémorragique (RCUH)

a. Manifestations cliniques

La RCUH est caractérisée par une inflammation chronique évolutive touchant exclusivement le rectum et le colon. Elle se caractérise par des phases aiguës entrecoupées de périodes de rémission. Les manifestations cliniques principales de la RCUH sont la douleur abdominale et la diarrhée muco-sanglante. L'atteinte rectale isolée entraîne un tableau clinique de rectorragie, ténesme et parfois constipation. La majorité des patients atteints de RCUH présentent une maladie intermittente et d'une gravité allant de mineure à modérée. Chez les patients présentant une forme sévère, la totalité du colon est atteinte, menant à une diarrhée sanglante importante et à des symptômes systémiques tels que fièvre et amaigrissement. Comme pour la maladie de Crohn, des manifestations extra-intestinales sont associées à la RCUH (Table 1).

b. Anatomopathologie

Contrairement à la maladie de Crohn les lésions de la RCUH s'étendent de manière continue, sans intervalle de muqueuse saine, à partir de la ligne pectinéale pour atteindre une portion plus ou moins importante du rectum et du colon (Figure 5). La RCUH ne dépasse pas la valvule de Bauhin, cependant une iléite distale peut être observée lors d'une atteinte complète du colon (iléite de reflux) (D'Haens *et al.*, 1997). Le rectum est presque systématiquement atteint.

Les lésions n'atteignent que les couches superficielles de la paroi, la muqueuse et la sous-muqueuse, expliquant la rareté des fistules et sténoses. Au début de la maladie, la muqueuse est turgescence et présente de nombreuses petites ulcérations sanglantes. Lors de la cicatrisation de ces ulcères, des îlots de muqueuse peuvent former des pseudopolypes (Figure 3). L'inflammation chronique entraîne une fibrose de la sous-muqueuse avec une disparition des haustrations et un raccourcissement du colon.

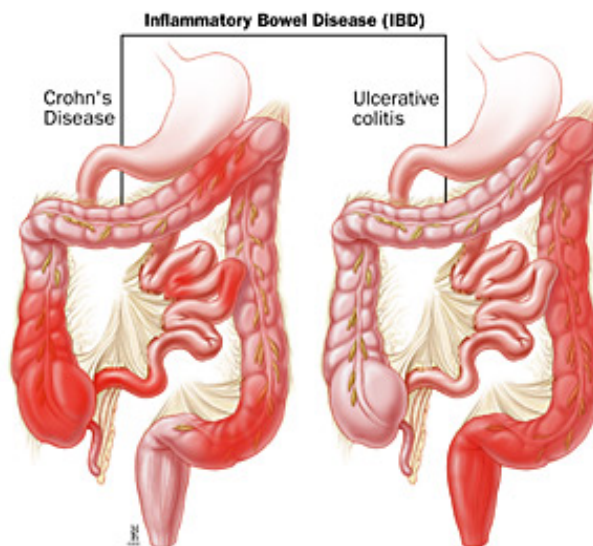


Figure 5. Localisation des atteintes intestinales dans la maladie de Crohn et la RCUH.
D'après «The Johns Hopkins Medical Institutions. Gastroenterology &Hepatology Resource Center ».

L'aspect microscopique de la muqueuse permet d'évaluer le stade évolutif de la pathologie (abcès cryptiques et cryptes régulières hypocrines en phase chronique active, raréfaction et déformation des cryptes hypocrines en phase de résolution, augmentation de la déformation cryptique, diminution de la congestion vasculaire au stade quiescent).

c. Complications

La complication la plus redoutable de la RCUH est la survenue d'un mégacolon toxique. Suite à l'extension de l'inflammation aux couches profondes de la paroi, celle-ci est fragilisée, pouvant entraîner une surinfection et une perforation. Des hémorragies massives nécessitant des transfusions sanguines sont rencontrées chez 3% des malades. La survenue d'un cancer colique est généralement précédée d'une dysplasie sévère. Le risque de développer un carcinome dépend de la durée de la maladie et de son degré d'extension au colon.

d. Diagnostic

L'exclusion d'une colite infectieuse est réalisée par un examen coprologique. Ensuite le diagnostic repose sur l'endoscopie, le lavement baryté et l'histologie. La colonoscopie met en évidence une hyperémie de la muqueuse saignant au contact ou des ulcérations dans les cas plus sévères. Un syndrome inflammatoire et une anémie sont mis en évidence par une biologie sanguine.

e. Traitement

Le traitement médical de la RCUH est similaire à celui de la maladie de Crohn. Le traitement chirurgical est indiqué lors d'une hémorragie sévère ne répondant pas au traitement, d'un mégacolon toxique, d'une perforation, d'une RCUH réfractaire au traitement médical ou du développement d'une dysplasie sévère ou d'un cancer colique. Depuis peu, l'IFX est également indiqué dans les cas réfractaires aux autres traitements.

F. Etiologie des MICI

L'étiologie des MICI reste inconnue malgré la démonstration de l'implication de facteurs génétiques et environnementaux (Figure 6).

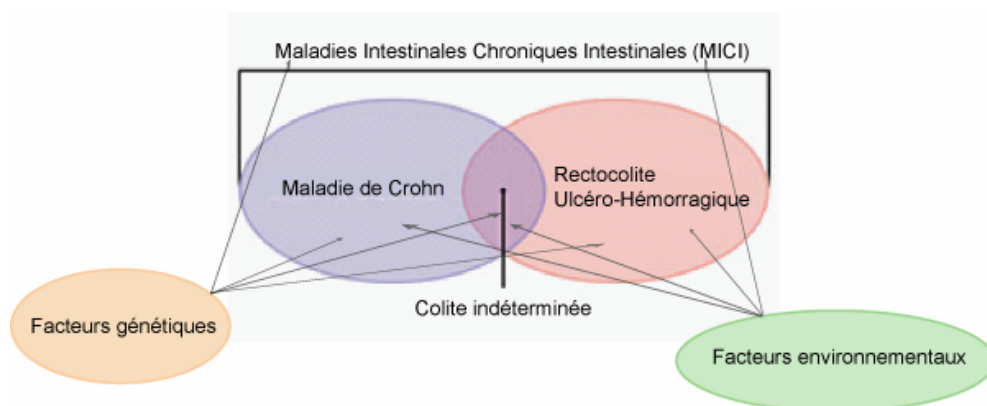


Figure 6. Modèle de la pathogénie des MICI.

L'influence de facteurs génétiques a été établie suite à la mise en évidence d'une agrégation familiale des cas de MICI, de prévalences différentes selon les groupes ethniques et d'une concordance de 40-50% de maladie de Crohn chez les jumeaux monozygotes. Ce pourcentage de concordance implique néanmoins une contribution égale de facteurs environnementaux aux MICI. En effet, une différence d'incidence des MICI est reportée selon l'âge, la région géographique et l'époque (Loftus, 2004).

Ainsi les MICI sont définies comme maladies complexes, c'est-à-dire ne présentant pas une transmission de type mendélienne (récessive, dominante, liée au chromosome X) et résultant de l'interaction de plusieurs gènes de susceptibilité et de facteurs environnementaux.

Ces derniers ont largement été étudiés, tels que le tabagisme, la contraception orale, l'appendicectomie, les habitudes alimentaires, le mode de vie et le stress. Cependant, vu les discordances obtenues entre études, seuls quelques uns sont actuellement admis comme facteurs de risque, à savoir que le tabagisme et

l'appendicectomie (facteurs de risque dans la maladie de Crohn et protecteurs dans la RCUH) (Calkins, 1989; Corrao *et al.*, 1998; Cottone *et al.*, 1994; Garcia Rodriguez *et al.*, 2005; Halfvarson *et al.*, 2006) (Hoie *et al.*) (Karban *et al.*, 2007) (Radford-Smith *et al.*, 2002; Russel *et al.*, 1997) (Loftus, 2004; Radford-Smith *et al.*, 2002).

Le rôle respectif de ces facteurs génétiques et environnementaux et le *primum movens* de la pathogénie sont encore peu compris.

Différentes théories sont émises quant à l'étiologie de la MC et de la RCUH (Chamberlin *et al.*, 2006).

Selon une première hypothèse, les MICI seraient dues à une réponse immunitaire inappropriée à la flore intestinale normale.

Une autre approche est envisagée par certains auteurs prônant une réponse immunitaire secondaire à une infection spécifique. L'implication de différents pathogènes (*Mycobacterium paratuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli*, *Cytomegalovirus*, *Saccharomyces cerevisiae*...) est étudiée depuis de nombreuses années. Certains d'entre eux ont été mis en évidence au niveau de la muqueuse intestinale, de granulomes intestinaux (MC) ou de la lamina propria, mais actuellement aucune association claire n'a pu être mise en évidence entre un germe et les MICI (Hugot *et al.*, 2003; Lakatos *et al.*, 2006; Sechi *et al.*, 2001).

Facteurs génétiques et MICI

Une prédisposition génétique aux MICI a été suspectée suite à l'observation d'une incidence supérieure de MICI dans les familles ayant un membre atteint d'une de ces pathologies par rapport à la population générale (Orholm *et al.*, 1991; Probert *et al.*, 1993). En effet, de 2 à 14% des malades atteints de MC présentent une histoire familiale de MC ou de RCUH. On peut quantifier le degré de regroupement familial d'une pathologie par le rapport entre le risque de développer la maladie chez un apparenté sur la prévalence de la maladie dans la population générale (Risque relatif : R.R.). Le risque relatif de développer la MC pour un parent au premier degré d'un sujet atteint de MC est compris entre 15 et 42 et le risque relatif de développer

une RCUH est situé entre 7 et 17, pour un parent au premier degré d'un sujet atteint de RCUH (Kuster *et al.*, 1989; Meucci *et al.*, 1992; Orholm *et al.*, 1991). Les études de jumeaux ont largement contribué à l'identification de la contribution relative des facteurs génétiques et environnementaux. Une maladie purement génétique aura une concordance de 100% chez des jumeaux monozygotes (MZ) et de 50% chez des dizygotes (DZ). Si aucun facteur génétique n'est impliqué, ces concordances seront identiques dans chaque type de jumeaux. Dans la MC, les larges études réalisées en Suède, Danemark et Grande-Bretagne ont montré un taux de concordance pour les jumeaux MZ de 20 à 50% alors que les taux de concordances pour les jumeaux DZ avoisinent les 10% (Halfvarson *et al.*, 2003; Orholm *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 1996; Tysk *et al.*, 1988). Dans la RCUH, le taux de concordance entre jumeaux MZ est de 13-19% et de 0-5% entre jumeaux DZ (Orholm *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 1996; Tysk *et al.*, 1988). Ces données confirment une forte contribution génétique à la pathogénie des MICI, plus importante dans la MC que dans la RCUH.

De nombreuses études ont été réalisées afin d'identifier les facteurs génétiques prédisposant aux MICI, dans un but diagnostique, préventif et thérapeutique.

Découverte du premier gène

La première étude « génome entier » pour la maladie de Crohn a été effectuée par Hugot *et al.* en 1996, mettant en évidence une association entre une région péri-centromérique du chromosome 16 (IBD1) et la maladie de Crohn (Hugot *et al.*, 1996). Cette association fut ensuite confirmée par une large étude européenne (Curran *et al.*, 1998). Cette découverte fut la première confirmation moléculaire d'une contribution génétique à la MC. De nombreuses études ont, par après, largement validé cette association qui est spécifique de la MC et qui n'a pas été retrouvée dans le cadre de la RCUH (Cavanaugh, 2001; Cavanaugh *et al.*, 1998; Curran *et al.*, 1998; Ohmen *et al.*, 1996). Une étude plus fine de la région (Hugot *et al.*, 2001) ainsi qu'une étude d'un gène localisé dans cette région et codant pour une protéine pouvant être impliquée dans la reconnaissance bactérienne (Ogura *et al.*, 2001a) ont permis d'identifier le premier gène prédisposant à la MC : NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain 2). NOD2, rebaptisé par la suite

CARD15, code pour une protéine comprenant un domaine carboxy-terminal riche en leucine (Leucine Rich Region : LRR) impliqué dans la reconnaissance des motifs muramyl-dipeptide (MDP) de la paroi bactérienne, deux domaines impliqués dans l'oligomérisation de la protéine (NOD et NAD) et deux domaines CARD (Caspase Recruitment Domain) permettant la liaison à RIP2 (Figure 7) (Inohara *et al.*, 2003; Ogura *et al.*, 2001).

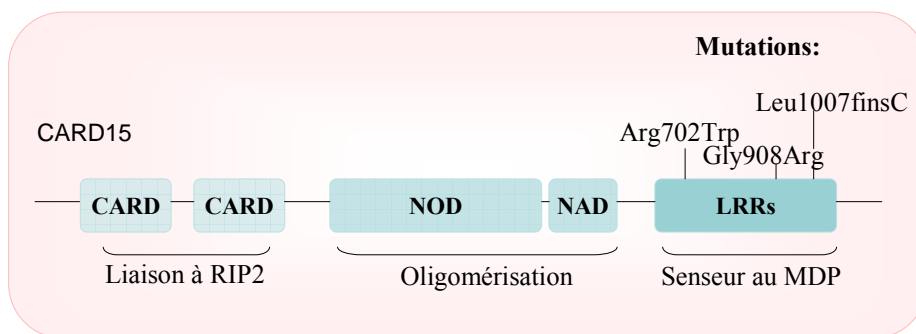


Figure 7. Représentation de la protéine CARD15 avec ses différents domaines et localisation des mutations les plus fréquentes. (RIP2 : receptor interacting protein, NOD : nucleotide oligomerization domain, NAD : NACHT-associated domain)

Trois mutations (R702W, G908R, et 1007fs) sont prépondérantes au niveau de ce gène (Lesage *et al.*, 2002) et sont présentes chez environ 50% des patients atteints de MC, contre une fréquence de 10-20% dans la population générale ou chez les patients RCUH (Lesage *et al.*, 2002). Il s'agit là des fréquences retrouvées en France et en Belgique. Ces fréquences sont significativement plus basses dans d'autres régions européennes et dans certaines régions du monde, notamment en Asie, où elles sont quasi nulles (Nagamu *et al.*, 2002).

Le risque relatif de développer une MC est de 2,20 à 4,09 chez les sujets hétérozygotes pour l'une de ces mutations et environ de 17,1 pour les homozygotes ou les hétérozygotes composites (Economou *et al.*, 2004). Ces mutations, ainsi que la plupart (93%) des mutations actuellement décrites, sont localisées dans le domaine LRR de la protéine, et entraîneraient une perte de reconnaissance des motifs MDP de la paroi bactérienne (Girardin *et al.*, 2003; Netea *et al.*, 2005). La mutation 1007fs aboutit à la production d'une protéine tronquée de 33 acides

aminés, résultant en une perte d'activation du facteur de transcription NFκB (Nuclear Factor kappa B) et à une diminution de production de cytokines pro-inflammatoires (Figure 8).

L'implication de ce gène dans la susceptibilité génétique à la MC confirme ainsi l'importance des bactéries endoluminales et de la réponse immunitaire. Cependant nous sommes encore loin de comprendre les causes et la pathophysiologie de la MC (Yamamoto-Furusho *et al.*, 2006). De plus, les mutations de CARD15 n'expliqueraient que 20% de la prédisposition génétique à la MC et d'autres gènes sont donc impliqués dans cette prédisposition.

Les autres gènes

Depuis l'identification d'IBD1 de nombreuses études ont été réalisées afin d'identifier d'autres gènes impliqués dans la prédisposition génétique aux MICI. Ces études ont permis de mettre en évidence certaines régions chromosomiques associées spécifiquement à la maladie de Crohn, à la RCUH ou aux MICI en général (Figure 9). Seules certaines de ces associations ont été répliquées et confirmées.

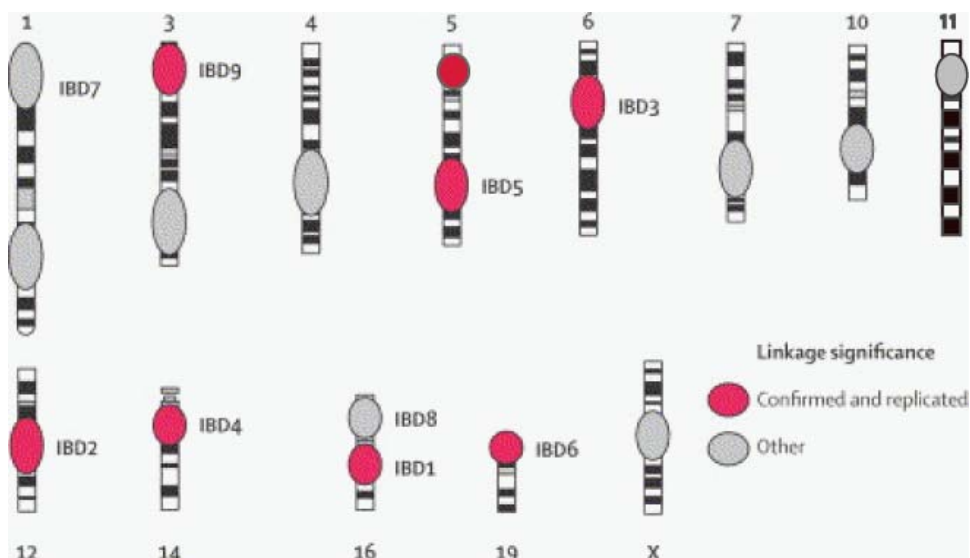


Figure 9. Régions chromosomiques associées aux MICI identifiées par des études « génome entier ». D'après le : *Lancet. New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases?*

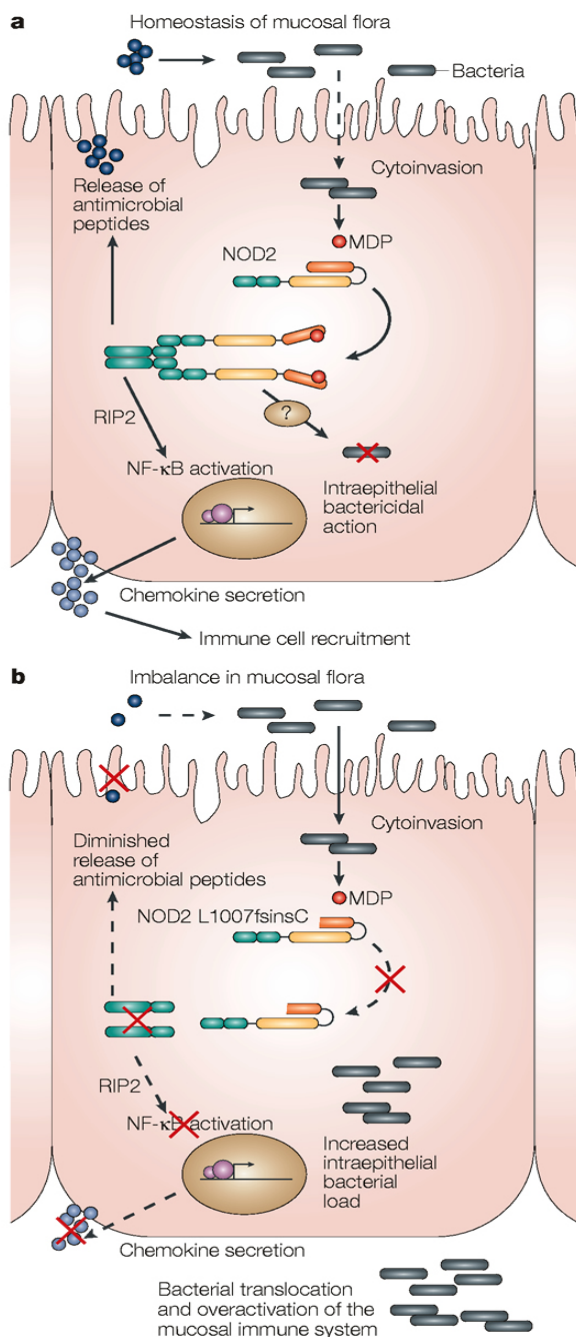


Figure 8. Fonction de CARD15 et la barrière épithéliale intestinale. a. La reconnaissance intracellulaire du MDP de la paroi bactérienne par le domaine riche en leucine de CARD15 entraîne une oligomérisation de CARD15 et une activation du facteur de transcription NF κ B par RIP-2 (receptor interacting protein). Un rôle bactéricide direct pour CARD15 a été proposé. Une régulation de la sécrétion de chémokines et de libération de défensines contribue à l'homéostasie de la muqueuse. b. Les variants CARD15 associés à la maladie de Crohn ont une réponse cellulaire épithéliale déficiente aboutissant à une perte de la fonction de la barrière épithéliale et une augmentation de l'exposition à la flore bactérienne. Un déficit dans la reconnaissance du MDP entraîne une diminution de l'expression de chémokines et de défensines. De plus CARD15 pourrait fonctionner comme modificateur endogène de la voie de signalisation des Toll-like récepteurs (TLR). La déficience de CARD15 pourrait aggraver l'inflammation intestinale par une activation secondaire excessive du système immunitaire de la muqueuse intestinale. *D'après Nature Reviews Genetics 2005. Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease.*

Une étude plus fine de certaines de ces régions (par l'étude d'un plus grand nombre de marqueurs génétiques dans cette région) ou une approche par gène candidat (un gène localisé dans cette région est choisi en considérant la fonction de sa protéine), ont permis de mettre en évidence des gènes impliqués dans cette prédisposition génétique (Table 4). Cependant, pour plusieurs de ces régions, les gènes impliqués n'ont pas encore été identifiés. De plus, les études réalisées par une approche par gènes candidats ont, elles aussi, permis l'identification d'associations entre ces pathologies et certains gènes. Nombre d'entre elles n'ont cependant pu être répliquées. Etant donné que de nombreux variants impliqués dans la prédisposition génétique aux MICI sont susceptibles de conférer un risque relatif faible pour ces pathologies, des études de populations plus larges sont nécessaires pour permettre l'identification des gènes impliqués dans ces pathologies. De plus, des études fonctionnelles doivent être réalisées en complément des études génétiques.

Applications cliniques

De nombreux facteurs génétiques et environnementaux sont très certainement impliqués dans la MC. Actuellement, ceux-ci ne sont pas tous connus et les risques relatifs rapportés pour les variants associés sont peu élevés. Actuellement, aucun test génétique diagnostique ou prédictif ne peut être proposé et de plus, aucune action préventive (hormis des mesures anti-tabac) ne pourrait être appliquée. Des corrélations phénotypes-génotypes CARD15 ont été rapportées avec une apparition plus précoce de la MC, une localisation préférentiellement iléale et un phénotype sténosant observé plus souvent chez les patients ayant deux mutations par rapport aux patients non porteurs de mutations CARD15 (Heresbach *et al.*, 2004; Lesage *et al.*, 2002; Radford-Smith *et al.*, 2006; Yamamoto-Furusho, 2006). Cependant, ces corrélations ne permettent pas une prise en charge spécifique selon les génotypes mis en évidence. En conclusion, actuellement il n'y a pas d'intérêt, en pratique clinique courante, à génotyper les patients pour les gènes prédisposant à la maladie de Crohn.

Table 4. Régions et gènes associés aux MICI.					
Région	Chr.	Gène	Variants	Pathologie	Epistasie
IBD1	16q	CARD15 (NOD2) (Hugot <i>et al.</i> , 2001)	Arg702Trp, Gly908Arg, 1007fs	MC	DLG5 OCTN1/2
IBD2	12q				
IBD3	6p		HLADRB1*0103	RCUH	
IBD4	14				
IBD5	5q	OCTN1/2 SLC22A4/A5 (Peltekova <i>et al.</i> , 2004)	Leu53Phe/ G207C	MC et RCUH	CARD15 (Newman <i>et al.</i> , 2005)
IBD6	19p				
IBD9	3p				
	7q	ABCB1/MDR1 (Ho <i>et al.</i> , 2005)	C3435T A2677G/T	RCUH	
	10q	DLG5 (Stoll <i>et al.</i> , 2004)	Arg30Gln	MC – Homme (Friedrichs <i>et al.</i> , 2006)	CARD15
	9q	TLR4 (Franchimont <i>et al.</i> , 2004)	Asp299Gly	MC et RCUH	CARD15
	9q	TNFSF15 (Yamazaki <i>et al.</i> , 2005)		MC	CARD15, IBD5
	5p	PTGER4		MC	
	7p	NOD1/CARD4 (McGovern <i>et al.</i> , 2005)	ND1 + 32656	MC	
	2q	ATG16L1	Ala197Thr (Hampe <i>et al.</i> , 2007)	MC	CARD15 IBD5 IL23
	11p	Nell1 (Franke <i>et al.</i> , 2007)		MC et RCUH	
	1p	IL23R (Duerr <i>et al.</i> , 2006)		MC et RCUH	IBD5

II. Génétique

A. Variants génétiques

Deux génomes humains pris au hasard dans la population présentent des séquences d'ADN identiques à 99%. Le pourcentage restant comprend des variations structurales et des variations de séquence. La majorité de cette variation génétique est due aux variations du nombre de copie de certains segments du génome (Copy Number Variations, CNVs) et aux « Single Nucleotides Polymorphisms » (SNPs) (Redon *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 1998). Les autres variations comprennent les insertions ou délétions de plus d'une base, les polymorphismes de répétitions de séquences et les réarrangements.

a. Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

Les SNPs sont les variants génétiques le plus fréquemment rencontrés dans le génome humain (Collins *et al.*, 1998). Ces polymorphismes sont définis par une différence d'une base entre les deux allèles à un endroit déterminé du génome (Figure 10).

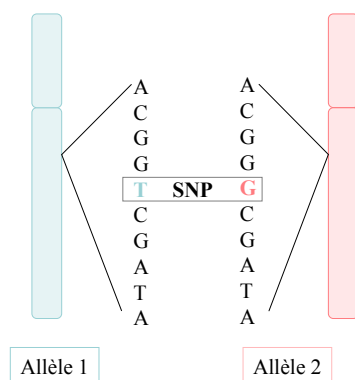


Figure 10. Représentation schématique d'un « Single Nucleotide Polymorphism ».

Ces SNPs sont présents dans la population générale et ont une fréquence allélique mineure supérieure ou égale à 1%. Ces SNPs sont presque exclusivement bi-alléliques et ont un taux de mutation faible.

Ces variants constituent une des sources majeures de variation inter-individuelle génétique et phénotypique. Ils sont associés à la diversité entre les populations, aux différences de sensibilité aux maladies et aux médicaments. Les SNPs peuvent être localisés au niveau d'exons, d'introns, de régions non traduites (UTR) ou de régions intergéniques. Les SNPs peuvent entraîner une altération protéique par une substitution d'acide aminé (SNPs non synonymes), par une altération de l'épissage ou de la régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle.

Les SNPs sont répartis le long du génome humain avec une densité d'environ 1/ 300 paires de bases (pb). Leurs caractéristiques en font de puissants outils pour les études génétiques : leur densité est suffisante pour permettre une étude de la structure haplotypique de notre génome et leur caractère binaire les rend adaptés aux techniques de génotypage à grande échelle. De plus, leur faible taux de mutation par rapport aux autres polymorphismes permet leur utilisation dans les études de population.

De nombreux efforts ont été mis en œuvre par des organismes privés et académiques afin d'identifier ces SNPs au niveau du génome humain et de permettre un accès public à ces données ; notamment par la formation du « SNP consortium » (<http://snp.cshl.org>). Actuellement, 11.811.594 SNPs sont référencés dont 5.689.286 validés (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/build/127>, 08 mars 2007). Cette collection de SNPs est utilisée pour construire une carte haplotypique du génome humain (<http://www.hapmap.org>)

Ils sont actuellement les marqueurs génétiques de choix dans les études de maladies complexes et de pharmacogénétique.

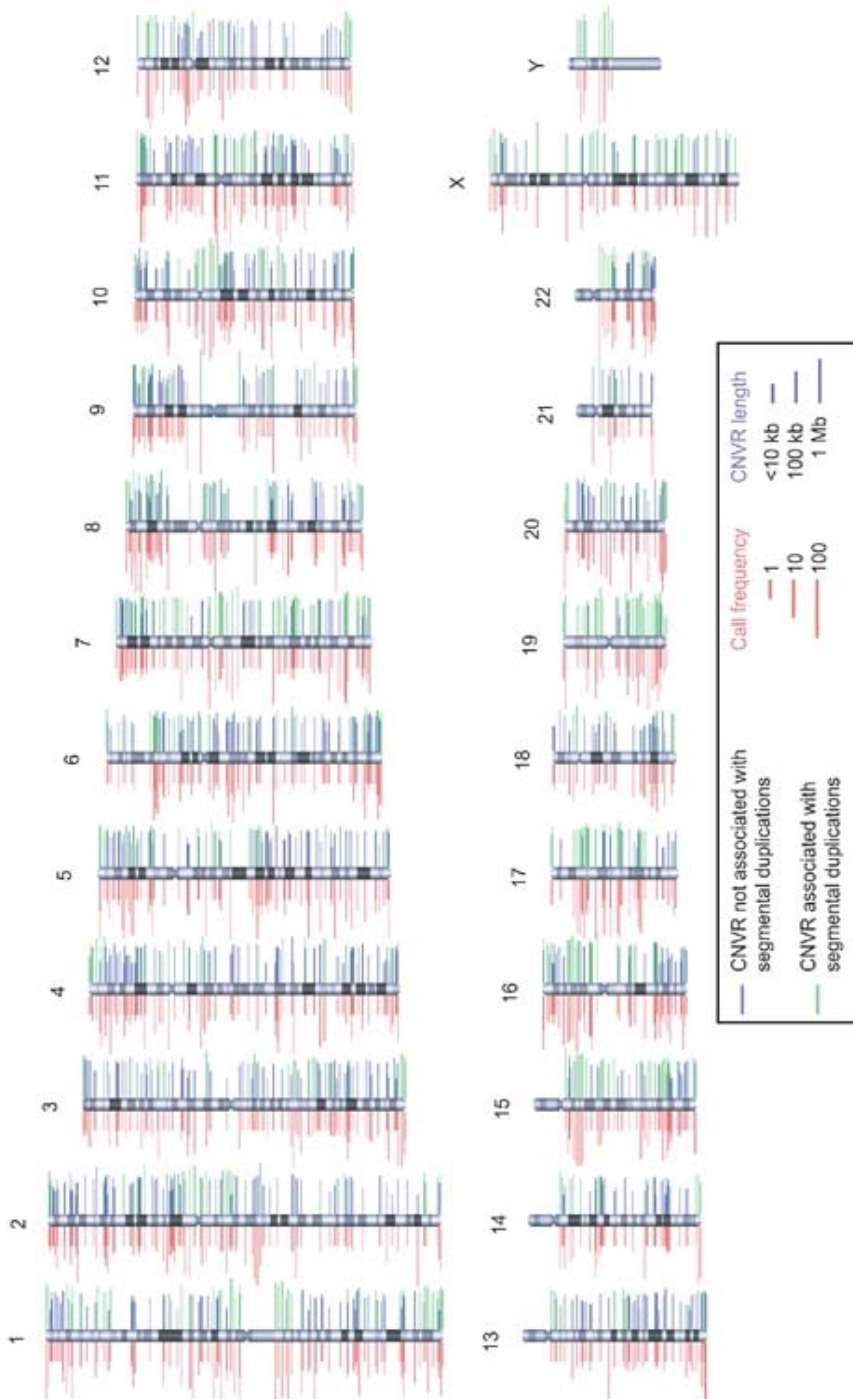


Figure 11. Répartition des CNVs au niveau du génome Humain.
D'après Nature. Global variation in copy number in the human genome

b. Les Variations du Nombre de Copies (CNVs).

Les CNVs sont définies par des segments d'ADN longs d'au moins 1kb et présentant une variation dans leur nombre de copie par rapport à un génome de référence (Feuk *et al.*, 2006). Les CNVs couvrent environ 12% de notre génome et bien qu'elles soient réparties de façon hétérogène, il n'y a pas de larges régions de notre génome qui en soient dépourvues (Figure 11) (Redon *et al.*, 2006).

Ces CNVs sont préférentiellement localisées en dehors des gènes et des éléments hautement conservés de notre génome (Bejerano *et al.*, 2004). Elles influencent l'expression des gènes et la variation phénotypique en perturbant la séquence de gènes et en altérant leur dosage (Figure 12) (Buckland, 2003). Elles sont également impliquées dans la prédisposition aux maladies complexes comme la susceptibilité aux infections par le VIH-1 (Gonzalez *et al.*, 2005) et la glomérulonéphrite (Aitman *et al.*, 2006).

c. Les insertions/délétions

Les insertions/délétions (indel) pourraient représenter de 15-25% des polymorphismes génétiques (Dawson *et al.*, 2001). Elles peuvent être définies en 5 catégories majeures (Table 5). Elles sont distribuées au niveau du génome humain avec une densité moyenne d'une indel /7.2 kb d'ADN et 36% de ces indel sont localisées dans les promoteurs, introns et exons de gènes connus ; elles pourraient par conséquent jouer un rôle important dans la variation phénotypique (Mills *et al.*, 2006). Elles semblent en fort déséquilibre de liaison avec les SNPs et ont une distribution semblable dans les différentes populations.

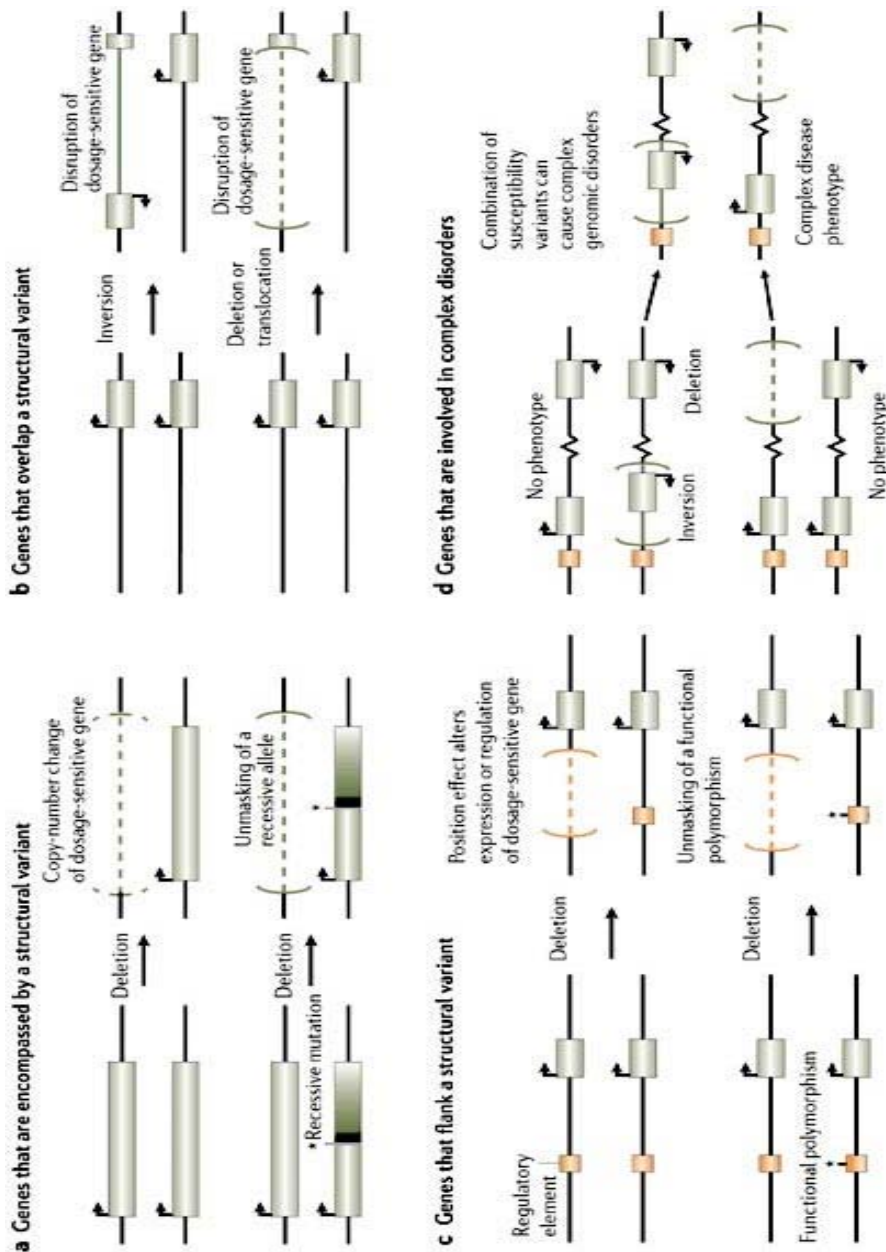


Figure 12. Influence des variants structuraux sur les phénotypes. Certains gènes peuvent, du fait de leur proximité avec des variants structuraux, être influencés de différentes façons. **a.** Des gènes sensibles au dosage inclus dans un variant structural peuvent entraîner une pathologie par une duplication ou une délétion, des gènes non sensibles au dosage peuvent également entraîner dans ce cas une pathologie en dévoilant une mutation récessive sur le chromosome homologue. **b.** Des gènes chevauchant des variants structuraux peuvent être désorganisés par inversion, translocation ou délétion. **c.** Des variants structuraux proches d'un gène peuvent affecter son expression par un effet de position. Par exemple une délétion, une inversion ou une translocation affectant des éléments régulateurs importants, peut altérer l'expression de gènes. Une délétion d'un élément fonctionnel peut également dévoiler un polymorphisme qui pourrait avoir un effet sur la fonction du gène. **d.** Des variants structuraux peuvent fonctionner comme allèles de susceptibilité, ou une combinaison de plusieurs facteurs génétiques peut être nécessaire pour produire un phénotype. D'après Nature Reviews Genetics Structural variation in the human genome.

Table 5. Classification des insertions/délétions

Cinq classes majeures d'Indel sont définies :

(1) insertions et délétions d'une seule paire de bases, (2) extension de pb monomérique, (3) multiples extensions de répétitions de 2–15 pb, (4) insertion de transposon et (5) indel contenant appariement des séquences d'ADN aléatoire. D'après *Genome Research. An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome.*

INDEL Class	
Single bases (29.1%)	120,938
A	50,556
T	50,621
C	9816
G	9945
Repeat Expansions (29.5%)	122,458
Monomeric (4/4)	77,047
(A)n	36,978
(T)n	36,972
(C)n	1576
(G)n	1521
Dimeric (12/12)	29,460
(AC)n	4727
(GT)n	4578
(TG)n	4142
(CA)n	4032
(TA)n	4385
(AT)n	4553
(CT)n	698
(AG)n	699
(GA)n	741
(TC)n	808
(GC)n	56
(CG)n	41
Trimeric (56/60)	5454
(AAT)n	810
(TTA)n	703
(ATT)n	427
(TAA)n	357
(AAG)n	325
(TTC)n	334
(TAT)n	297
(AAC)n	246
(ATA)n	288
(TTG)n	245
(CAA)n	117
Other (NNN)n	1309
Tetrameric (176/252)	7456
Pentameric (237/1020)	1456
Hexameric (227/4092)	558
Heptameric (152/16,380)	293
Octameric (150/65,532)	325
Nonameric (98/262,140)	205
Decameric (110/1,048,572)	204
Transposons (0.59%)	2433
Other (40.8%)	169,607
Total	415,436

d. Les répétitions de séquences

Les microsatellites sont des répétitions en tandem de courtes séquences montrant fréquemment un polymorphisme multi-allélique. Ils ont largement été utilisés comme marqueurs génétiques notamment dans les études de liaison ainsi qu'en médecine légale. Ces microsatellites ont évolué plus rapidement chez les humains que chez les primates, aboutissant à des répétitions plus longues et plus polymorphes chez les humains, notamment pour les répétitions dinucléotidiques (Rubinsztein *et al.*, 1995). Ces microsatellites et minisatellites (définis par des répétitions de séquences plus longues) affectent l'expression génique en agissant comme séquences régulatrices reconnues par des facteurs de transcription (Kashi *et al.*, 2006). Les microsatellites peuvent affecter la structure de la chromatine et la conformation de l'ADN. Ils sont impliqués dans de nombreuses pathologies telles que le Syndrome X-fragile, la maladie de Freidreich, la maladie de Steinert...

B. Maladies complexes

Plus d'un millier de gènes responsables de maladies rares, mendéliennes, ont été identifiés, pour lesquelles l'atteinte d'un seul gène est une condition nécessaire et suffisante pour développer la pathologie.

Par contre, il est nettement plus difficile de trouver les variants génétiques prédisposant aux pathologies fréquentes. Ces maladies complexes ou multifactorielles ne sont pas transmises selon les lois de Mendel et résultent de l'interaction de différents déterminants génétiques et de facteurs environnementaux.

L'implication des SNPs dans la prédisposition aux maladies complexes a été confirmée par la mise en évidence du rôle de certains gènes dans ce type de pathologies : APOE4 et maladie d'Alzheimer (Anwar *et al.*, 1993), KCNJ11 et diabète de type 2 (Gloyn *et al.*, 2003), PTPN22 et arthrite rhumatoïde, lupus érythémateux disséminé, diabète de type 1...(Lee *et al.*, 2007), CTLA4 et thyroïdite auto-immune, diabète de type 1(Kavvoura *et al.*, 2007; Marron *et al.*, 1997), NOD2 et maladie de Crohn (Hugot *et al.*, 2001)... Ces SNPs peuvent être situés partout dans le génome, aussi bien au niveau des régions codantes que non-codantes et nombre d'entre eux n'affectent pas la fonction protéique. Il est probable que dans la majorité de ces maladies complexes, ce ne soit pas une perte de fonction protéique qui soit impliquée mais plutôt un cumul d'effets plus subtils tels que des altérations de régulation au niveau de la transcription ou de la traduction.

Récemment, le rôle de CNVs dans la prédisposition aux maladies complexes a été souligné (Beckmann *et al.*, 2007). En effet, ces CNVs affectent une large portion du génome humain (allant du kilobase au mégabase) et potentiellement de nombreux gènes, impliquant un rôle fonctionnel potentiel (Beckmann *et al.*, 2007). Ces CNVs ont par exemple été associés à la maladie de Crohn (Fellermann *et al.*, 2006) et au lupus érythémateux disséminé (Yang *et al.*, 2007).

C. Pharmacogénétique

La réponse thérapeutique à un médicament est extrêmement variable selon les individus, tant au niveau de son efficacité qu'au niveau de sa toxicité. Ces différences de réponse représentent un problème médical et de santé publique important. En effet, en Europe environ 10% des malades hospitalisés le sont suite à un accident d'origine médicamenteuse. La limitation de l'utilisation de certains médicaments, les effets secondaires rencontrés et le coût des soins de santé en découlant, ont motivé la recherche de facteurs déterminant cette variabilité. Ces facteurs peuvent être d'origine physiologique (âge, grossesse, pathologies associées...), environnementale (tabac, médicaments...) ou génétique.

La pharmacogénétique étudie les déterminants génétiques impliqués dans la variation interindividuelle à la réponse au traitement afin de permettre l'identification des individus à risque de développer une réponse thérapeutique anormale.

D. Etudes des maladies complexes et pharmacogénétique

Les études visant à déterminer les variants génétiques impliqués dans les pathologies complexes ou dans les différences de réponse aux médicaments se définissent principalement selon deux grands axes : les études de liaison et les études d'association.

a. Notion de déséquilibre de liaison

Un individu porteur d'un certain allèle au niveau d'un locus présentera des allèles déterminés au niveau de loci adjacents. Cette corrélation est connue sous le nom de déséquilibre de liaison (DL). Le déséquilibre de liaison est objectivé par le calcul des valeurs de D' et de r^2 (Figure 13). Tous deux prennent des valeurs entre 0 et 1. Lorsque D' entre deux loci est égal à 1, ces deux loci sont complètement liés, ils sont hérités ensemble sur le même segment chromosomique ; aucune recombinaison

n'est apparue entre eux. Ils peuvent avoir des fréquences alléliques différentes. r^2 décrit la corrélation entre deux loci, et lorsque $r^2 = 1$, les deux loci sont parfaitement corrélés, avec la même fréquence allélique. Le génotypage de l'un donne ainsi toute l'information de l'autre (Carlson *et al.*, 2004).

Soient les allèles de deux variants génétiques (A,a) et (B, b) avec $f(X)$ représentant la fréquence de l'allèle X.

- D mesure la déviation des fréquences haplotypiques par rapport à l'équilibre.

$$D = f(AB) - f(A)f(B)$$

Ainsi plus D est élevé plus les deux variants sont en déséquilibre de liaison (DL).

- D' est le rapport entre D et sa valeur maximale D_{max}

$$D' = D / D_{max} \quad D_{max} = f(A)f(B)$$

$D' = 1$ indique un DL complet entre les deux variants.
Un déséquilibre de liaison (DL) est présent lorsque $D > 0$.
La présence d'une recombinaison entraîne une diminution du D' .

$$r^2 = (D')^2 \times [f(a)f(b)/f(A)f(B)]$$

- r^2 est un coefficient de détermination, il mesure la corrélation entre une paire de variables. Cette mesure n'est cependant pas ajustée aux différences de fréquences alléliques entre loci.

Figure 13. Définition du D' et r^2

b. Etudes de liaison

Les études de liaison cherchent à mettre en évidence des régions du génome présentant une quantité d'allèles partagés entre individus malades au sein d'une même famille supérieure à la quantité attendue. Ce type d'étude nécessite de larges familles comprenant plusieurs individus atteints (Figure 14). Elles ont permis la mise en évidence de nombreux gènes dans le cadre des maladies mendéliennes pour lesquelles les mutations causales sont rares et hautement pénétrantes. Cependant,

malgré la découverte de loci impliqués dans les MC (Hugot *et al.*, 1996), la schizophrénie (Stefansson *et al.*, 2002) et le diabète de type 1 (Nistico *et al.*, 1996), les succès de cette approche sont nettement plus rares dans le cadre des maladies complexes.

Le peu de résultats obtenus par les études de liaison dans l'étude des pathologies complexes est du à l'interaction de différents variants génétiques dans l'étiologie de la maladie et au faible effet qu'ont ces variants sur la pathologie. Il est ainsi difficile d'établir la généalogie du trait.

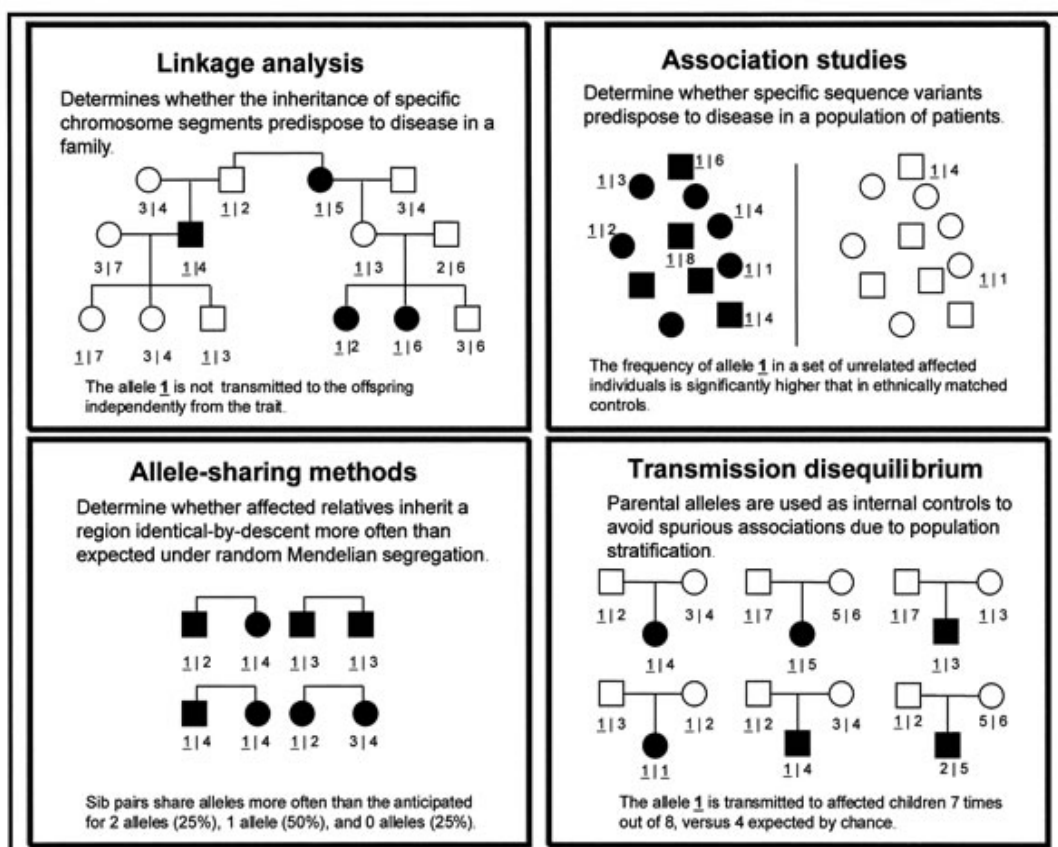


Figure 14. Représentations des différents types d'études génétiques.

D'après "Journal of Rehabilitation Research and Development". *New insights into the genetics of multiple sclerosis*

c. Etudes d'association

Les études d'association comparent la fréquence allélique d'un polymorphisme, ou d'un ensemble de polymorphismes, chez des patients et chez des contrôles sains afin d'identifier des marqueurs pour lesquels ces fréquences sont significativement différentes entre les deux groupes.

On peut classer ces études en études directes, indirectes ou comme une combinaison des deux en fonction du choix des variants étudiés et de leur implication potentielle dans le phénotype étudié (Figure 15). Les études directes sont basées sur l'étude de SNPs ayant un rôle fonctionnel potentiel ou connu alors que les études indirectes sélectionnent des SNPs pouvant capturer l'information d'autres SNPs avec lesquels ils sont parfaitement corrélés (en parfait déséquilibre de liaison). Un SNP peut ainsi servir de « proxy » pour de nombreux autres. Lorsque le DL d'une région est connu, on peut dès lors sélectionner quelques uns de ces SNPs pouvant, individuellement ou en combinaison avec d'autres (haplotypes), capturer la majorité de la variation d'une région (Gabriel *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2001). Ceux-ci sont dénommés « tag SNPs ».

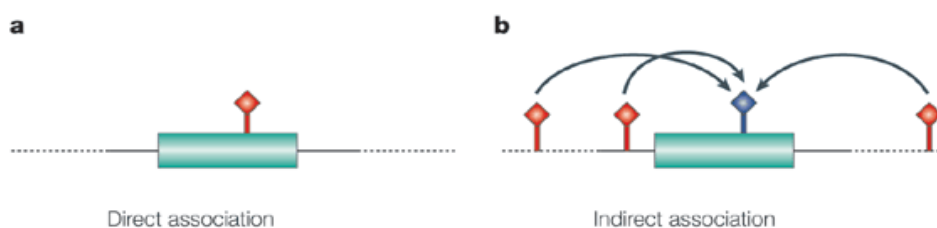


Figure 15. Représentation des différents types d'étude d'association en fonction du choix des marqueurs étudiés.

a-Association directe : L'association entre le phénotype et le marqueur étudié (rouge) est directement testée. Cette stratégie implique une connaissance préalable du rôle fonctionnel de ce marqueur. Le marqueur étudié est testé directement pour son association avec le trait.

2- Les variants étudiés (rouge) sont sélectionnés sur base de leur déséquilibre de liaison permettant de fournir une information sur le plus de variants possibles. Dans ce cas, le marqueur bleu (variant causal) est testé de façon indirecte pour son association avec le phénotype, car il est en DL avec les trois autres marqueurs. *D'après Nature Reviews Genetics Genome-wide association studies for common diseases and complex traits.*

Ces études peuvent être basées sur des études familiales ou des études de cas-contrôles comprenant des individus non apparentés.

Les études de cas-contrôles

Ces études comparent des individus non apparentés. Cependant ces individus ont un ancêtre commun dont le lien de parenté est impossible à déterminer parce que lointain. La transmission du phénotype au cours des générations est ainsi impossible à déterminer et l'on se base alors sur les corrélations mises en évidence entre les phénotypes et génotypes actuels. Les recombinaisons apparues entre générations cassent l'association entre le phénotype et les variants, sauf pour les variants hautement liés au variant causal (en fort DL) (Figure 16).

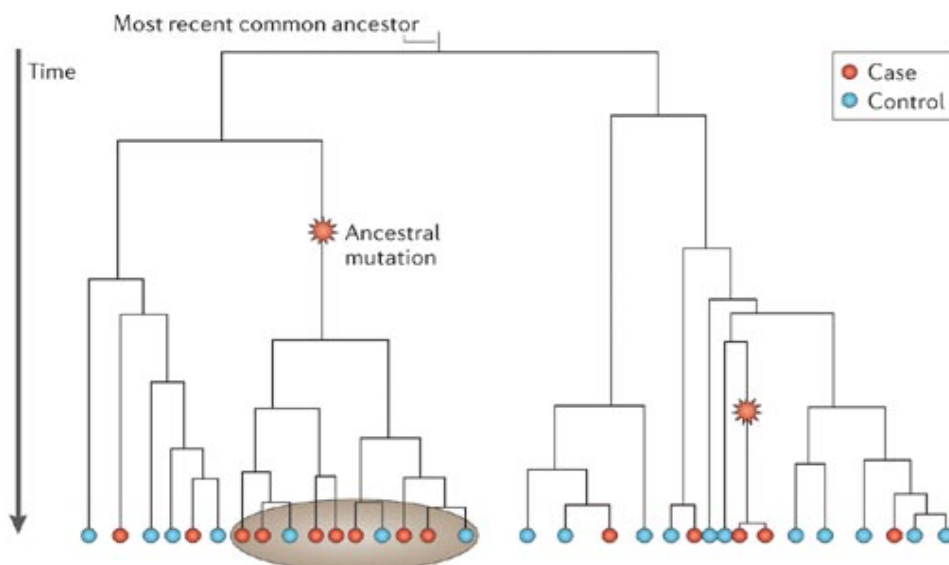


Figure 16. Illustration du principe sous-tendant les études d'associations.

Le cas présent assume une haploïdie. Les cercles colorés indiquent les allèles observés. Les allèles compris dans le cercle sombre descendent tous d'un allèle muté augmentant un risque et apparu des centaines de générations plus tôt (étoile rouge). Il y a ainsi un excès d'allèle muté dans le groupe de patients par rapport au groupe contrôle, ainsi que pour les allèles en fort déséquilibre de liaison avec celui-ci. La figure montre également une deuxième mutation qui peut ne pas être détectable parce qu'elle ne contribue qu'à de rares cas.

D'après Nature Reviews Genetics A tutorial on statistical methods for population association studies

Les études cas-contrôles ont comme avantage de pouvoir assembler un nombre suffisamment large de patients sans devoir mettre à contribution d'autres membres de la famille des patients recrutés. Cependant, ces études nécessitent le génotypage d'un plus grand nombre de marqueurs génétiques par rapport aux études de liaison et la présence d'une population non homogène (stratification) peut engendrer des résultats faussement positifs ou négatifs (Figure 17).

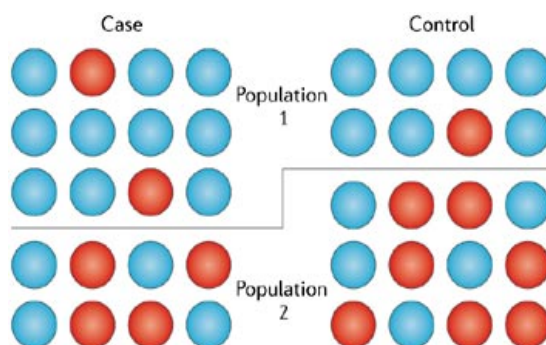


Figure 17. Exemple de stratification. Les cercles représentent les allèles d'un variant (SNP). Deux populations sont présentes, la population 1 présente une fréquence de l'allèle mineur (rouge) inférieure à celle de la population 2. L'allèle bleu est sur-représenté dans la cohorte de patients (cas) et pourrait être l'allèle causal. Cette surreprésentation pourrait également être due à une stratification de la population entraînant une plus grande proportion de population 2 dans le groupe contrôle. Cette stratification peut ainsi engendrer des faux positifs mais également aboutir à une perte du signal venant de vrais positifs et passant inaperçu dans le flot de signaux présents. *D'après Nature Reviews Genetics A tutorial on statistical methods for population association studies*

Études familiales

Les études familiales, comprenant l'étude de jumeaux monozygotes ou de trio (parents et enfants) avec enfants atteints, ont l'avantage d'avoir le même background génétique. De plus, les familles ont une exposition environnementale plus homogène. Cependant, les tests utilisés (tels que le « transmission disequilibrium test » ou TDT), classant les allèles parentaux en transmis et non transmis aux enfants atteints, se basent sur les génotypes des parents hétérozygotes pour les marqueurs étudiés, aboutissant à une perte de puissance statistique (Figure 18). De plus, la

difficulté de réunir suffisamment d'individus correctement caractérisés pour ces études familiales rend ces études moins utilisées.

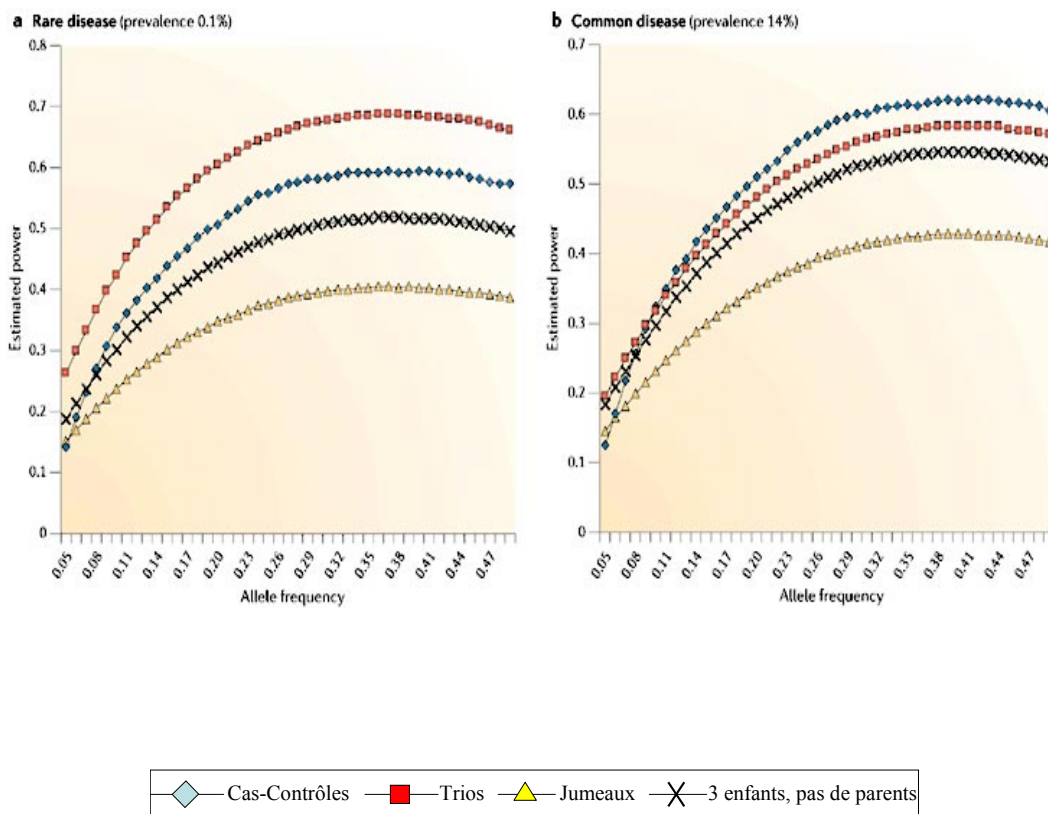


Figure 18. Comparaison de puissances entre les études cas-contrôles et les études familiales.

Estimation du niveau de puissance pour une étude comprenant 200 contrôles et 200 patients en comparaison avec celui de diverses études familiales : 200 trios (un enfant atteint et ses parents) ; 200 jumeaux (un atteint et un non atteint) ; 200 progénitures discordantes (3 enfants dont au moins un atteint et un non-atteint, pas de parents). Les études de jumeaux ont 50% de puissance en moins par rapport aux études cas-contrôles. a - Pour les maladies rares, les études avec trios sont plus puissantes que les études cas-contrôles. b - pour les maladies fréquentes, les études cas-contrôles sont légèrement plus puissantes que les études par trios et les études avec 3 progénitures discordantes. D'après: *Family-based designs in the age of large-scale gene association studies. Nature review genetics*

Les études d'association sont largement utilisées pour étudier les facteurs génétiques prédisposant aux maladies complexes, cependant nombre d'entre elles génèrent des associations faussement positives. Les erreurs les plus fréquemment rencontrées dans ces études d'associations sont reprises dans la table 6.

La conception de ces études et les résultats obtenus doivent, dès lors, être étudiés avec précaution (Cardon *et al.*, 2001).

Table 6. Erreurs fréquemment rencontrées dans les études d'association.

Erreurs fréquemment rencontrées dans les études d'association	Solutions envisageables
Echantillonnage faible	Augmentation de la taille de la cohorte
Analyse de sous-groupes (phénotypiques ou génotypiques) - Tests multiples	Correction pour tests multiples – analyse de nouvelles cohortes
Erreur aléatoire	
Groupe contrôle faiblement corrélé – stratification	Cohorte de contrôles prospective – études familiales
Pas de réplication	Cohortes de confirmation. Etudes de liaison. Etudes fonctionnelles
Incapacité à mettre en évidence un déséquilibre de liaison avec des loci adjacents.	Augmentation des marqueurs étudiés et de la région – étude de diverses populations
Surinterprétation des résultats	
Déclaration de gène candidat après la mise en évidence d'une association avec une région arbitraire	Définir les hypothèses de départ

Approche par gènes candidats

La plupart des études d'association ont été menées par une approche par « gène candidat », c'est-à-dire qu'un gène potentiellement intéressant par sa fonctionnalité ou par sa localisation (dans une région identifiée comme associée au phénotype) est spécifiquement étudié. Cette approche est évidemment réductrice considérant la quantité de gènes pouvant être explorés. L'étude la plus complète de gènes candidats se fait par un reséquençage complet du gène chez les patients et les contrôles, cherchant à mettre en évidence un variant réparti différemment dans un de ces groupes. Cependant étant donné la complexité et le coût de cette approche, elle est souvent limitée à l'étude de petits gènes et de leur partie codante et bordures introniques, limitant ainsi son potentiel. Ces études sont donc habituellement effectuées par le génotypage de SNPs choisis pour leur répercussion fonctionnelle potentielle ou comme « tag » SNPs (Cardon *et al*, 2001). Cependant le développement récent des techniques de reséquençage pourrait changer, dans un avenir proche, la conception des études d'associations.

Approche « génome entier »

Suite aux avancées technologiques énormes dans le domaine de la biologie moléculaire et aux nombreux polymorphismes référencés ces dernières années, les études génome entier sont de plus en plus réalisées. Cette approche cherche à mettre en évidence une association entre un phénotype et une série de marqueurs génétiques par l'étude de centaine de milliers de marqueurs répartis sur l'ensemble du génome. La recherche de variants causaux est ainsi effectuée sans présumer préalablement de leurs localisations ou de leur fonctions potentielles. Le problème le plus important lié aux études « génome entier » est la quantité d'hypothèses testées vu le grand nombre de marqueurs étudiés et les tests statistiques potentiels pouvant en découler. En effet, considérant le nombre de SNPs testés, la diminution du seuil de signification en découlant (correction pour tests multiples) entraîne la nécessité d'étudier des cohortes comprenant plusieurs milliers d'individus pour identifier des variants ayant un effet et une fréquence allélique modeste.

Pour pallier ce problème, une approche par plusieurs étapes est proposée dans le cadre des études cas-contrôles : le nombre de génotypes testés est réduit à chaque stade de l'étude afin d'arriver à un niveau de signification « génome entier » étape par étape (Figure 19).

Cette approche permet de mettre en évidence une région associée au phénotype étudié. Une étude plus complète sera ensuite réalisée par une étude d'association en augmentant le nombre de variants étudiés ou par une approche par gène candidat.

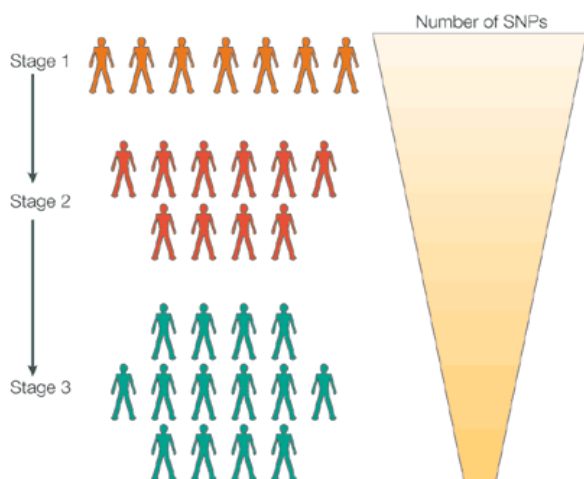


Figure 19. Approche en plusieurs étapes pour ne pas perdre de puissance dans les études d'association génome entier. Lors de la première étape, un ensemble complet de SNPs sont génotypés dans une fraction d'échantillons et une valeur de p libérale est utilisée pour identifier un sous groupe de SNPs pouvant être associés. Aux étapes ultérieures, un nombre SNPs potentiellement associés sont retestés sur un nombre accru d'échantillons avec des valeurs de p plus sévères
D'après Nature Reviews Genetics. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits.

Notion d'haplotype.

La combinaison d'allèles spécifiques au niveau d'un locus hérité d'un parent est dénommée haplotype (Figure 20).

La détermination des différents haplotypes présents dans une population peut être évaluée à partir des génotypes mis en évidence.

Dans les études d'association, la fréquence de ces haplotypes peut ainsi être comparée entre les deux groupes (cas versus contrôles). L'utilisation d'haplotypes dans les études d'association permet une plus grande informativité par rapport à l'utilisation de SNPs individuels, de plus, elle reflète le déséquilibre de liaison de la région et peut permettre l'identification d'une combinaison optimale de SNPs.

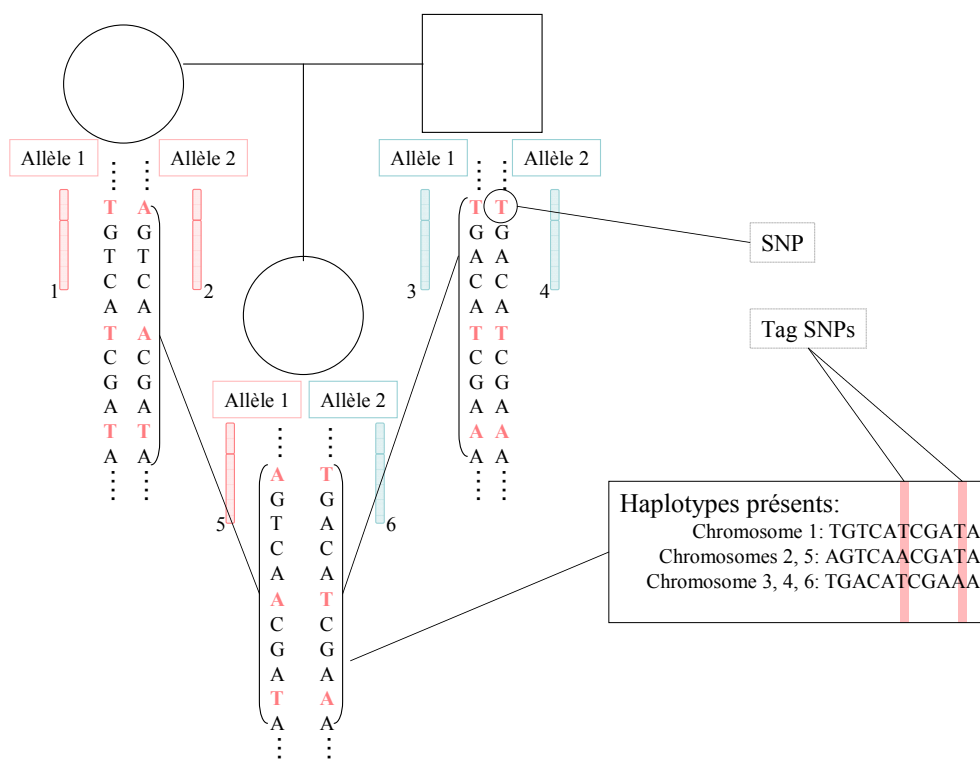


Figure 20. Illustration de la définition d'un haplotype et de « Tag » SNPs. Un arbre généalogique est représenté. Une paire de chromosome est représentée par individu avec une partie de séquence correspondante. Les SNPs sont représentés par des lettres roses. Les haplotypes présents chez les individus sont représentés. Les « tag » SNPs (surlignés en roses) capturent l'information génétique présente dans ces haplotypes.

Le traitement de la maladie de Crohn repose essentiellement sur des agents thérapeutiques diminuant de façon non spécifique l'inflammation et la réaction immunitaire, tels que les stéroïdes et immunosuppresseurs.

Depuis quelques années, des thérapies biologiques sont développées, ciblant spécifiquement des molécules essentielles à l'inflammation. Parmi ces agents thérapeutiques, l'Infliximab (IFX), un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre le TNF-alpha humain, est reconnu par la « Food and Drug Administration » dans le traitement de la maladie de Crohn. Cependant, environ 30% des patients traités ne répondent pas à ce traitement (Targan *et al.*, 1997; van Dullemen *et al.*, 1995). Bien que l'IFX représente un apport important dans la prise en charge de la maladie de Crohn, un ciblage des individus répondeurs au traitement est indiqué étant donné son coût et sa toxicité potentielle. Les facteurs influençant cette réponse au traitement sont dès lors activement recherchés. La reproductibilité dans le temps de la réponse ou de la non-réponse au traitement chez un patient donné laisse à penser que des facteurs génétiques sont impliqués dans cette différence de réponse thérapeutique inter-individuelle.

La première partie de cette étude a pour but de mettre en évidence des facteurs génétiques prédisposant à la réponse au traitement par IFX.

Une étude d'association par gènes candidats a dès lors été entreprise. Trois gènes ont été sélectionnés selon leurs rôles potentiels dans la réponse à l'IFX : LTA, TNF et ADAM17.

La deuxième partie de ce travail est dédiée à une étude de la prédisposition génétique aux MICI. Certains gènes ou loci prédisposant aux MICI ont déjà été identifiés. Cependant la contribution de chacun d'entre eux dans la pathogénie des MICI reste limitée. L'identification d'autres gènes impliqués dans ces pathologies est nécessaire afin d'établir au mieux l'ensemble des facteurs génétiques responsables de la susceptibilité génétique aux MICI. L'étude de ces gènes, de leurs interactions (épistasie) et de leur rôle dans la pathogénie des MICI permettra une meilleure connaissance de ces maladies, aboutissant à une approche diagnostique et préventive plus performante et au développement de nouvelles thérapeutiques.

Une étude d'association a été réalisée afin de déterminer le rôle potentiel du gène IRF5 dans la prédisposition génétique aux MICI. Ce gène code pour un facteur de transcription impliqué non seulement dans la voie de l'interféron mais également dans la production de cytokines et de chémokines jouant un rôle dans les processus inflammatoires.

I. Introduction

A. Le Tumor necrosis factor alpha (TNF- α)

L'origine du terme TNF vient d'observations de nécroses hémorragiques au niveau de tumeurs après une infection bactérienne. Le facteur sérique responsable de cette nécrose tumorale fut nommé TNF (1975) puis TNF- α (1985) pour le différencier d'un autre facteur cytotoxique homologue, la lymphotoxine alpha (ou TNF- β). Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire faisant partie de la superfamille des ligands TNF (TNFS). Celle-ci comprend des cytokines qui, par interaction avec leurs récepteurs membranaires spécifiques, sont intégrées dans les voies de signalisation essentielles aux réponses inflammatoires et immunitaires.

Ces ligands ont en commun une structure de protéine transmembranaire de type 2, s'assemblant en trimères compacts biologiquement actifs (Tang *et al.*, 1996) tant sous forme transmembranaire que sous forme soluble. Le TNF- α est exprimé de façon constitutive par les cellules NK, mais son expression est également induite dans de nombreux types cellulaires (monocytes, macrophages, lymphocytes, mastocytes...). Il est essentiel au recrutement et à l'activation de différentes cellules immunitaires tels que les neutrophiles, les cellules dendritiques et les macrophages ainsi que les lymphocytes B et T (Nilsen *et al.*, 1998).

Le TNF- α est produit sous forme d'un précurseur transmembranaire de 26kDa qui, après clivage au niveau du domaine extracellulaire par une métalloprotéase (ADAM17, « A Disintegrin And Metalloprotease 17 ») est sécrété sous-forme de TNF- α mature. Le clivage, au site Ala76-Val77, entraîne la libération de la partie N-terminale, qui représente la forme soluble de 17kDa. Ce TNF- α soluble peut se lier à ses deux récepteurs, le TNFR1 et TNFR2 avec une liaison plus stable vis-à-vis du TNFR1 (Moss *et al.*, 1997). La plupart des cellules possèdent des récepteurs TNFR1 alors que l'expression de TNFR2 est limitée aux tissus lymphoïdes. Ces récepteurs sont formés de glycoprotéines transmembranaires.

La fixation du TNF- α soluble au TNFR1 entraîne une trimérisation puis une internalisation très rapide du complexe TNF- α /récepteur et l'activation des voies de signalisations sous-jacentes, inflammatoires ou apoptotiques (Figure 21).

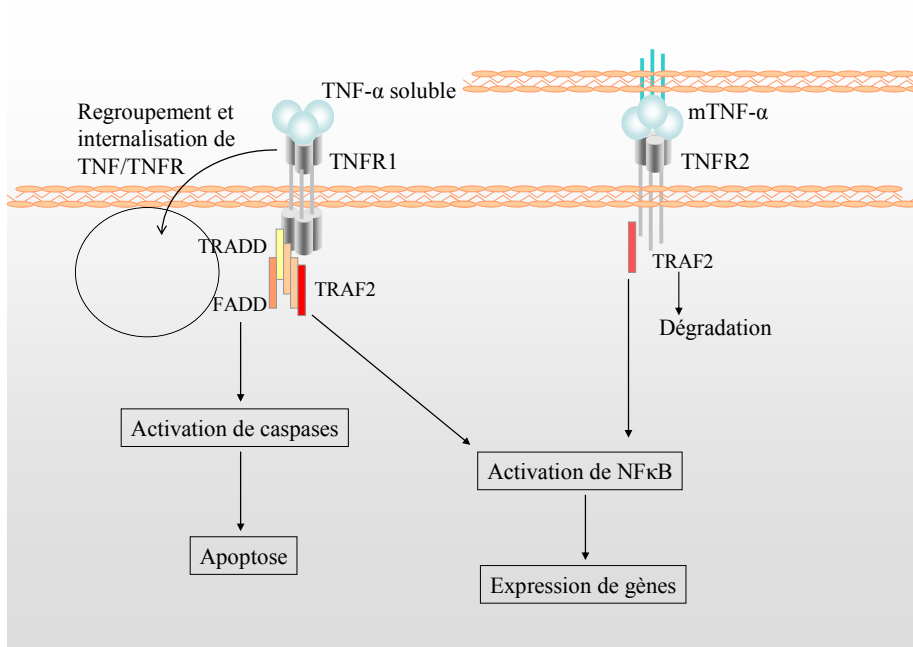


Figure 21. Représentation schématique des voies de signalisation TNFR1 et TNFR2

La fixation du TNF- α à son récepteur TNFR2 entraîne quant à elle l'activation d'une autre voie de signalisation aboutissant à la production de cytokines et à l'expression de protéines intracellulaires régulatrices.

De plus, une voie de signalisation inverse via le TNF- α membranaire (mTNF- α) a également été décrite (Watts *et al.*, 1999b). En effet, outre la fixation du TNF- α soluble à ses récepteurs, le mTNF- α peut également se lier à ceux-ci, préférentiellement au TNFR2, suite à un contact cellulaire direct (Rossol *et al.*, 2007) et entraîner l'activation d'une voie de signalisation inverse au niveau des cellules exprimant le mTNF- α (Watts *et al.*, 1999) (Figure 22). Cette voie de signalisation peut entraîner la production de cytokines, une mobilisation du calcium et une expression de sélectines (Watts *et al.*, 1999).

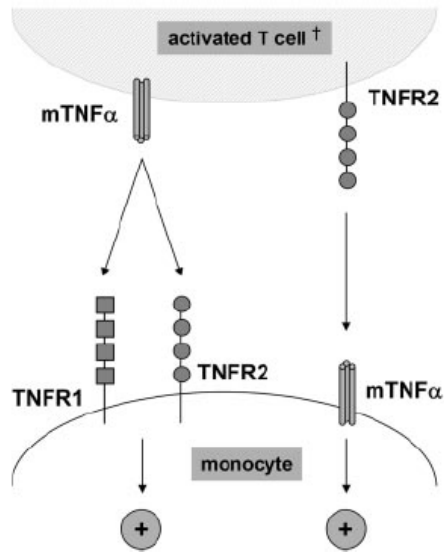


Figure 22. Modèle d'interaction mTNF- α /TNFR durant un contact cellulaire monocyte-lymphocyte T. TNFR1 et TNFR2 présents à la surface monocyttaire sont stimulés par la liaison du mTNF- α ancré sur la membrane des lymphocytes T. Ceci résulte en l'activation d'un signal intracellulaire au niveau des monocytes. De même, le TNFR2 présent à la surface des cellules T activées lie le mTNF- α entraînant l'activation d'une voie de signalisation inverse. *D'après Journal of Immunology. Interaction between Transmembrane TNF and TNFR1/TNFR2 mediates the activation of monocytes by contact with T cells.*

B. Implication du TNF- α dans la maladie de Crohn

La maladie de Crohn est caractérisée par une inflammation chronique de la muqueuse intestinale. Cette inflammation résulte de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules du système immunitaire en réponse à une agression vraisemblablement infectieuse. Il s'ensuit une amplification de la cascade inflammatoire entraînant la sécrétion de médiateurs inflammatoires, d'enzymes et de radicaux libres aboutissant à une destruction tissulaire responsable des symptômes de la maladie de Crohn.

Le TNF- α joue un rôle central dans la MC. Une surexpression de TNF- α au niveau sérique, dans les selles et dans la muqueuse intestinale de patients Crohn (Dionne *et al.*, 1997) a été rapportée. L'augmentation du taux de TNF- α induit la production d'autres médiateurs inflammatoires entraînant une fragilisation de la barrière épithéliale intestinale, permettant la pénétration d'antigènes et l'activation d'un

processus inflammatoire chronique. De plus, le développement d'un phénotype similaire à la maladie de Crohn chez des souris surexprimant le TNF- α (Kontoyiannis *et al.*, 1999), ainsi que la réponse thérapeutique fulgurante observée chez les patients Crohn après traitement par IFX (Targan *et al.*, 1997) plaident en faveur du rôle essentiel joué par le TNF- α dans cette pathologie. Après traitement par anti-TNF- α , une réduction importante de l'inflammation intestinale est observée ainsi que la restauration d'une barrière épithéliale fonctionnelle entraînant une nette amélioration clinique (Suenart *et al.*, 2002).

C. Infliximab

L'Infliximab (IFX) est utilisé dans le traitement des formes réfractaires ou fistulisantes de MC.

a. Mécanisme d'action

L'IFX est un anticorps chimérique constitué de parties constantes humaines et variables murines, se liant spécifiquement au TNF- α pour former un complexe relativement stable (Figure 23)

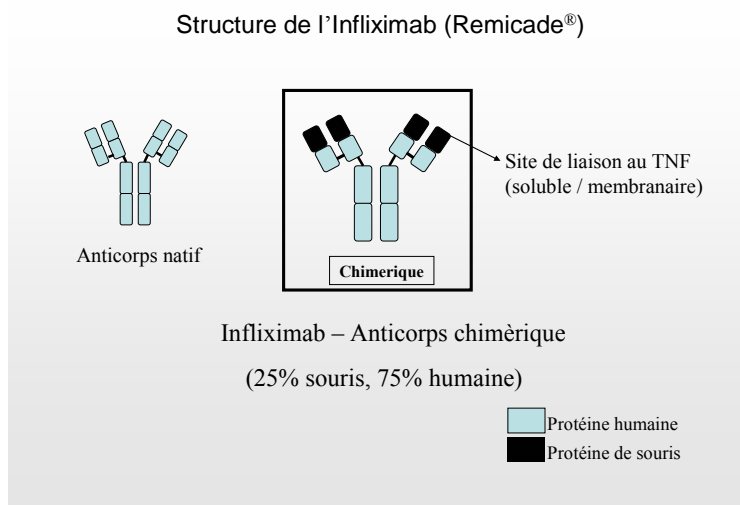


Figure 23. Structure de l'Infliximab

Chaque molécule d'IFX est capable de lier deux molécules de TNF- α et peut fixer le TNF- α membranaire ainsi que sa forme soluble, neutralisant ainsi son action. L'IFX se différencie des autres anti- TNF- α par la stabilité et la spécificité de sa liaison vis-à-vis du TNF- α membranaire et soluble (Hiroki *et al.*, 2005; van den Brande *et al.*, 2005) (Figure 24).

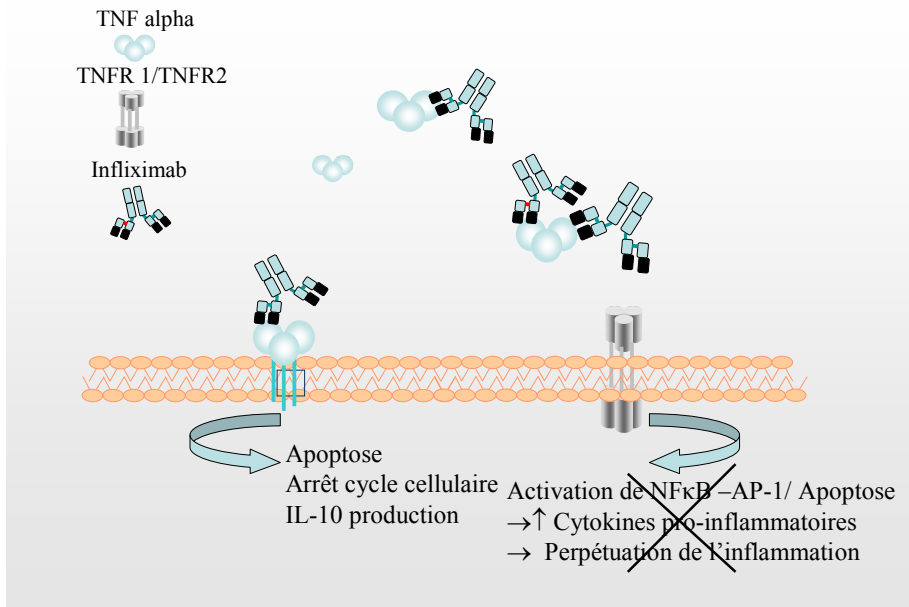


Figure 24. Mécanisme d'action de l'Infliximab. L'IFX se lie au TNF- α soluble, diminuant le taux de TNF- α circulant et sa fixation aux récepteurs TNFR1 et TNFR2. L'IFX lie également le mTNF- α , entraînant l'activation de la voie de signalisation inverse.

L'injection intra-veineuse d'IFX induit une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires au niveau sérique et au niveau tissulaire chez les individus atteints de la maladie de Crohn. Cette diminution est due non seulement à la fixation du TNF- α soluble, mais également à une diminution du nombre de cellules mononuclées produisant du TNF- α et de l'INF γ au niveau de la lamina propria (Agnholt *et al.*, 2001).

L'IFX agit à différents niveaux. Cet agent diminue la migration cellulaire vers le site inflammatoire par une réduction des chémokines chémotactiques mais également

par une diminution de l'expression de molécules d'adhésion endothéliales (Danese *et al.*, 2006; Torikai *et al.*, 2007).

La liaison de l'IFX au mTNF- α entraîne *in vitro* une apoptose et un arrêt du cycle cellulaire des monocytes et des lymphocytes activés (Lügering *et al.*, 2001; Ringheanu *et al.*, 2004) par l'activation d'une voie de signalisation inverse impliquant la c-Jun N-terminal kinases (JNK) (Hiroki *et al.*, 2005). Cet effet n'a pas été mis en évidence après traitement des cellules par Etanercept, une protéine de fusion associant la fraction p75 de deux TNFR liées au fragment Fc de l'immunoglobuline IgG1 humaine (TNFR/IgG1 Fc) (Jan *et al.*, 2003; Tilg *et al.*, 2007; Van den Brande *et al.*, 2007), efficace dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde mais pas dans la maladie de Crohn. Cette différence d'efficacité entre l'IFX et l'Etanercept suggère ainsi un rôle important de la voie de signalisation inverse dans le mécanisme d'action de l'IFX.

L'IFX induit également une amélioration fonctionnelle de la barrière épithéliale. Une diminution du taux d'apoptose de cellules épithéliales est observée après deux semaines de traitement et pourrait être une première étape vers la réparation de la muqueuse intestinale (Zeissig *et al.*, 2004).

Une autre conséquence de la diminution des cytokines pro-inflammatoires, est une réduction de production des protéines de la phase aiguë de l'inflammation, tels que la C-réactive protéine (CRP) et le fibrinogène (Arvidson *et al.*, 2007).

b. Efficacité

L'IFX a été reconnu par la FDA pour sa capacité à réduire les symptômes et signes cliniques et à induire et maintenir une rémission clinique, chez des patients souffrant de MC modérée ou sévère qui ne répondent pas à une thérapie conventionnelle. Plusieurs études randomisées avec contrôles placebo ont montré que l'IFX diminue significativement l'index d'activité de la maladie dans le cadre de MC réfractaires et diminue le nombre de fistules dans les formes fistulisantes (Present *et al.*, 1999; Targan *et al.*, 1997).

c. Facteurs prédictifs de la réponse thérapeutique.

Le traitement par IFX est habituellement bien toléré (Wojciech Blonski, 2007), cependant des effets secondaires importants sont mis en évidence chez 3 à 6% des patients (Colombel *et al.*, 2003; Ljung *et al.*, 2004). Ces effets secondaires comprennent des infections sévères, des réactions infusionnelles, un lupus pharmaco-induit, des décompensations cardiaques, des démyélinisations, et peut-être des lymphomes dans de très rares cas. La présence d'anticorps anti-IFX est retrouvée chez près de 61% des patients traités par IFX selon un schéma non systématique, dit « à la demande » (Baert *et al.*, 2003) et peut entraîner une perte de réponse au traitement. Cette fréquence tombe à 10-15% lors d'un schéma de traitement systématique toutes les 8 semaines.

De plus, bien que l'utilisation d'IFX entraîne une réduction du nombre d'hospitalisations, de chirurgies et d'examen sous anesthésie, le réel bénéfice financier n'est actuellement pas établi (Gary *et al.*, 2005; Koelewijn *et al.*, 2006).

Toutes ces considérations montrent l'utilité de la mise en place d'une procédure permettant de cibler les patients répondeurs au traitement avant l'instauration de celui-ci.

De nombreuses études ont été réalisées afin de mettre en évidence des facteurs cliniques, biologiques ou génétiques prédictifs de la réponse au traitement.

Critères cliniques

Parmi les différents critères cliniques étudiés, une localisation colique, l'utilisation concomitante d'immunosuppresseurs, un jeune âge et l'absence de tabagisme ont été décrits comme prédictifs de la réponse à l'IFX. Cependant ces résultats n'ont pas été validés par des études de confirmation. Le manque de concordance entre les études dans la définition du trait étudié rend les résultats obtenus difficilement interprétables et des études complémentaires sont très certainement nécessaires (Chaudhary *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2005). Cependant, il est établi que l'utilisation d'IFX est plus efficace dans les formes montrant une inflammation active (avec un

taux élevé de CRP), chez les patients présentant une forme non-sténosante et n'ayant pas subi de chirurgie.

Marqueurs sériques

Outre la corrélation entre un taux de CRP élevé avant traitement et une meilleure réponse à l'IFX, aucun marqueur sérique prédictif de la réponse n'a été mis en évidence. Bien que le dosage sérique des anticorps pANCA et ASCA soient utiles au diagnostic de la pathologie, leur taux sérique n'est pas associé à la réponse au traitement par IFX (Esters *et al.*, 2002).

Facteurs génétiques

L'absence de réponse au traitement par IFX est un trait stable : un individu non-répondeur ne répondra pas à des doses ultérieures d'IFX. Cette caractéristique plaide en faveur d'une implication génétique dans la différence de réponse observée entre individus.

Plusieurs études pharmacogénétique ont donc été réalisées afin de mettre en évidence les polymorphismes génétiques impliqués.

Aucune association n'a pu être mise en évidence entre la réponse au traitement et les gènes CARD15 (Mascheretti *et al.*, 2002), CRP (Willot *et al.*, 2006), TNF, TNFRS1, TNFRS2 ((Mascheretti *et al.*, 2002; Pierik *et al.*, 2004). Une faible association entre la réponse biologique et le gène FCGR3A, codant pour FcγRIIIa, un récepteur aux IgG impliqué dans la cytotoxicité anticorps dépendante, a été mise en évidence (Louis *et al.*, 2004; Louis *et al.*, 2006) ; cependant aucune association n'a pu être établie avec la réponse clinique.

Plusieurs gènes impliqués dans l'apoptose ont récemment été étudiés sur une cohorte de 287 patients, mettant en évidence une association entre deux variants présents au niveau des gènes CASP9, FAS et FASL et la réponse au traitement par IFX (Hlavaty *et al.*, 2005). Cependant la confirmation de ces résultats sur une seconde cohorte est nécessaire afin de valider les résultats obtenus.

Une des premières études réalisées dans le domaine de la pharmacogénétique de l'IFX dans la maladie de Crohn fut réalisée par K.Taylor *et al.* en 2001 (Taylor *et*

al., 2001). Cette équipe a étudié l'implication du gène LTA (codant pour la lymphotoxine alpha) dans la réponse au traitement par IFX sur une cohorte nord américaine et a mis en évidence une association entre un haplotype (LTA 1-1-1-1, comportant l'allèle majeur des polymorphismes *NcoI*-TNFc-aa13L-aa26) à l'état homozygote et la non-réponse au traitement.

D. Choix des gènes candidats

a. Le gène LTA

La lymphotoxine alpha (LT α) est une cytokine de la superfamille des TNFs. Cette protéine est sécrétée après clivage de sa séquence signal et s'assemble également en homotrimères ou s'associe avec la lymphotoxine bêta, un autre membre de la superfamille des TNFs. Elles sont toutes deux produites par les lymphocytes activés. Les lymphotoxines alpha et bêta forment trois ligands distincts ; un homotrimère sécrété (LT α 3), et deux hétérotrimères liés à la membrane (LT α 1 β 2, LT α 2 β 1). LT α 3 et LT α 2 β 1 lient, comme le TNF- α , les deux récepteurs TNFR1 et TNFR2, alors que LT α 1 β 2, lie le récepteur LT β R. Malgré ce partage de récepteurs, chaque paire ligand-récepteur a un rôle propre et il n'y a pas de redondance mais plutôt une coopération dans le développement du système immunitaire (Ware *et al.*, 1995). Les cytokines apparentées à la lymphotoxine sont impliquées dans le développement et l'organisation de structures lymphoïdes secondaires.

La stimulation des récepteurs TNFR et LT β R aboutit, via l'activation de facteurs de transcription de la famille NF κ B (Nuclear Factor kappa B), à la transcription de gènes impliqués notamment dans la réaction pro-inflammatoire et la réponse immunitaire.

Le gène codant pour cette protéine est situé au niveau du chromosome 6, en 6p21.3, au centre du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), adjacent au gène TNF (Figure 25).



Figure 25. Représentation de la localisation et de l'orientation des gènes TNF et LTA au sein du CMH.

Ce gène est long de 2 kb et comprend 4 exons dont trois codants (Figure 26).



Figure 26. Représentation du gène LTA.

Les exons sont représentés par des rectangles (codants en rouge et non codants en bleu). (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

En 2001, Taylor *et al.* (Taylor *et al.*, 2001) mettent en évidence une association entre un haplotype au niveau du gène LTA et la non-réponse au traitement par IFX dans la maladie de Crohn. Le gène LTA fut choisi comme gène candidat par cette équipe pour diverses raisons. Tout d'abord le gène LTA est situé dans la région du CMH qui est associée à des réponses immunitaires altérées.

Ensuite deux SNPs au niveau du promoteur du gène TNF (-308 et -238), adjacent au gène LTA, sont respectivement associés à une production accrue de TNF- α (Louis *et al.*, 1998), à une réponse immunitaire altérée (McGuire *et al.*, 1994), à une hépatite C chronique (Thomas Höhler, 1998) et à une atteinte articulaire plus sévère dans la polyarthrite rhumatoïde (Kaijzel *et al.*, 1998). Par après, un étude réalisée par Martinez *et al.* montrait que certains variants au niveau de la région CMH pourraient être associés à la réponse à l'IFX dans la polyarthrite rhumatoïde (Martinez, 2004).

L'association entre le gène LTA et la non-réponse à l'IFX a été décrite par Taylor sur base d'une cohorte de 59 patients Crohn nord américains dont la réponse à l'IFX a été évaluée par le score CDAI et par le questionnaire IBDQ (« Inflammatory Bowel Disease Questionnaire ») (Guyatt *et al.*, 1989) aux semaines 2, 4, 8 et 12 après traitement. Les différents haplotypes présents dans cette population ont été déterminés après génotypage des patients pour 3 SNPs et un marqueur microsatellite. Les patients homozygotes pour l'haplotype comprenant l'allèle le plus fréquent pour chaque variant étaient non-répondeurs à l'IFX.

b. Le gène TNF

Le gène TNF est localisé sur le chromosome 6 (6p21.3), en 3' du gène LTA. Ces deux gènes sont régulés de façon indépendante par leurs propres promoteurs. Le gène TNF comprend 3,6 kb et est organisé en 4 exons et 3 introns (Figure 27).



Figure 27. Représentation du gène TNF. Les exons sont représentés par des rectangles (codants en rouge et non codants en bleu). (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

La région en 5' du gène TNF contient des séquences consensus de différents facteurs de transcription dont NFκB, PU.1 (purine-rich box), AP-1 (Activating protein-1), ATF-2, c-jun.... La régulation de l'expression du gène TNF est tissu – spécifique avec une activation de différents éléments du promoteur selon les stimuli. La région 3' de l'ARNm contient des éléments riches en AU (ARE), le pentanucléotide AUUUA, contrôlant la régulation post-transcriptionnelle du gène, notamment la répression de la traduction (Kontoyiannis *et al.*, 1999a).

Le TNF-α étant la cible spécifique de l'IFX, il nous semblait important de réaliser une étude complète du gène TNF afin d'évaluer l'implication de celui-ci dans la réponse thérapeutique à l'IFX. En effet, une modification de la séquence de ce gène responsable d'une altération de la protéine ou de son niveau d'expression pourrait entraîner une modification de la fixation de l'IFX au TNF-α. De plus, une altération du TNF-α pourrait entraîner une anomalie de son clivage par ADAM17 ou de sa voie de signalisation inverse.

c. Le gène ADAM17

ADAM17, nommée précédemment TACE (« TNF Alpha Converting Enzyme »), est un membre de la superfamille des « désintégrines et métalloprotéases ». Les protéines de cette famille contiennent en plus de leurs pro-domaine et domaine métalloprotéase, 4 autres domaines : les domaines désintégrine, riche en cystéine, membranaire et la queue cytoplasmique. ADAM17 présente un site catalytique contenant une séquence correspondant au motif « HEXXHXXGXXH(D) » hautement conservé chez les métalloprotéases Zinc-dépendantes. ADAM17 est synthétisée sous forme d'un précurseur ayant une activité protéolytique latente. Son prodomaine est impliqué dans la sécrétion de la protéine mais également dans l'inhibition de son activité.

ADAM17 fut identifiée pour ses capacités à cliver le proTNF- α . Par après, son implication dans la sécrétion d'autres molécules de signalisation et de récepteurs a été mise en évidence (Black, 2002).

Outre le TNF- α , ADAM17 clive également les récepteurs au TNF- α (p55 et p75), entraînant la sécrétion de formes solubles (sTNFR) qui se lient au sTNF- α et au mTNF- α . Le clivage des cytokines et de leurs récepteurs entraîne ainsi non seulement un relâchement des contraintes spatiales, mais peut également changer leurs activités biologiques. Le clivage des récepteurs membranaires peut rendre la cellule non-répondante à certains ligands mais les récepteurs ainsi sécrétés peuvent également moduler l'activité de leurs ligands.

Le gène ADAM17 codant pour cette métalloprotéase est situé en 2p25, il s'étend sur 66 kb et est constitué de 19 exons (Figure 28).

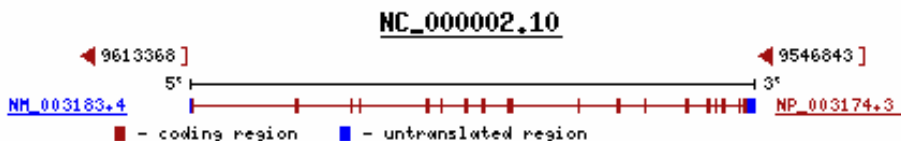


Figure 28. Représentation du gène ADAM17.

Les exons sont représentés par des rectangles (codants en rouge et non codants en bleu). (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Le rôle d'ADAM17 dans la voie de signalisation du TNF- α ainsi que dans les balances sTNF- α /mTNF- α et sTNFRs/TNFRs membranaires fait de son gène un candidat intéressant dans l'étude de la pharmacogénétique de l'IFX. En effet, la régulation de la sécrétion du TNF- α ainsi que la proportion de mTNF versus sTNF pourraient être impliquées dans l'échappement au traitement. De plus, le clivage des deux récepteurs aux TNF- α par ADAM17 entraîne la sécrétion de formes solubles de ces récepteurs, qui à l'état de dimères neutralisent l'apoptose cellulaire (Watts *et al.*, 1999). Ainsi une altération d'ADAM 17 pourrait également être impliquée dans la réponse au traitement via son rôle dans le clivage des récepteurs TNFR1 et TNFR2.

II. Etude du gène LTA

A. But de l'étude

En 2001, Taylor *et al.* (Taylor *et al.*, 2001) décrivaient une association entre un haplotype du gène LTA à l'état homozygote et la non-réponse au traitement chez les patients atteints de MC traités par Infliximab. Cette étude fut réalisée sur une cohorte relativement réduite et aucune étude ultérieure n'a été rapportée pour valider ce résultat.

Ce travail a été réalisé afin de déterminer l'implication réelle de cet haplotype au niveau du gène LTA dans la réponse à l'IFX par l'étude d'une plus large cohorte de patients caucasiens atteints de la maladie de Crohn.

B. Matériel et Méthodes

a. Patients

264 patients Crohn traités par IFX et inclus dans le BIEAP (« The Belgian IFX Expanded Access Program (Schering-Plough NV/SA, study 011246-1) ») ont été étudiés. Ce programme fut créé en 1998 et rassemblait les centres universitaires belges. Pour être inclus dans le BIEAP, les patients devaient signer un formulaire de consentement et répondre à au moins un des critères repris dans la table 7.

Bien que l'étude de Taylor ne comprenait que des patients présentant une forme luminale de MC, nous avons inclus dans notre étude des patients présentant une forme luminale ou une forme fistulisante de la pathologie afin de considérer les différentes formes traitées par IFX. Les patients ont reçu 5mg/kg d'IFX en une injection intraveineuse initiale (semaine 0) dans les formes lumineuses, et trois injections consécutives aux semaines 0, 2 et 6 dans les formes fistulisantes. Chez les patients présentant une forme luminale de MC, l'évaluation de la réponse clinique a été basée sur le score CDAI et la réponse biologique sur le dosage de la CRP, aux semaines 0, 4, 8 et 12. Dans les formes fistulisantes la réponse clinique a été évaluée

aux semaines 0, 2, 6, 10, 14 et 18 par l'évolution des fistules et la réponse biologique par le taux de CRP aux mêmes périodes.

Table 7. Critères d'inclusion au BIEAP

Critères d'inclusion au BIEAP
1. Une ou plusieurs fistules entéro-cutanées compliquant une maladie de Crohn résistante au traitement conventionnel depuis au moins trois mois.
2. Maladie de Crohn modérément ou sévèrement active depuis au moins 6 mois avec une colite, iléocolite ou iléite confirmée par radiographie ou endoscopie, ou une maladie de Crohn réfractaire aux autres traitements ou cortico dépendante (> 8 mg/j de prednisone ou équivalent).
3. Patient réfractaire ou intolérant aux agents immunosuppresseurs (methotrexate, azathioprine, 6-mercaptopurine, ou cyclosporine).

Réponse clinique

Ainsi que dans l'étude de Taylor *et al.* (Taylor *et al.*, 2001) et d'autres études randomisées (Present *et al.*, 1999), la réponse clinique et la rémission clinique complète ont été définies par, respectivement, une diminution de 70 points dans le score CDAI par rapport au score initial et un score CDAI inférieur à 150 points, après 4 semaines de traitement. Dans les formes fistulisantes, une réponse clinique a été définie par une diminution d'au moins 50% du débit des fistules après 10 semaines de traitement (Targan *et al.*, 1997).

Réponse biologique

La réponse biologique a été évaluée, chez les 139 patients ayant, avant l'instauration du traitement, un taux de CRP supérieur à au moins deux fois la limite supérieure de la valeur de référence. Elle a été définie par une diminution du taux de CRP de 25% après 4 semaines de traitement dans les formes luminales et après 10 semaines dans les formes fistulisantes (Louis *et al.*, 2004).

Des données cliniques complètes ont été collectées chez 150 patients présentant une forme luminale et 64 patients ayant une forme fistulisante.

b. Génotypage

L'haplotype étudié par Taylor *et al.* comprend un SNP altérant un site de restriction pour l'enzyme Nco1 (rs909253) au niveau de l'intron 1, une séquence microsatellite (rs5875327, TNFc) également au niveau de l'intron 1, et deux SNPs impliquant un changement d'acide aminé [« aa13 » (rs2857713), « aa26 » (rs1041981)] situés respectivement au niveau des exons 2 et 3 du gène LTA.

Les SNPs ont été étudiés par séquençage (Big Dye Terminator sequencing kit v3.1, Applied Biosystems). Le séquençage a permis de mettre en évidence deux autres SNPs dans le fragment analysé (rs746868 au niveau de l'intron 1 et rs3093543, un SNP non synonyme (His51Pro) au niveau de l'exon 3). Ceux-ci ont également été inclus dans l'analyse (Table 8).

Table 8. Propriété des SNPs étudiés au niveau du gène LTA.

Position	Nom	Fonction	Allèles	Résidu protéique	Position ac. Aminé
31648292	rs909253	Intronique	A/G		
31648408	rs746868	Intronique	C/G		
31648479	rs5875327	Intronique	-/TC		
31648535	rs2857713	non synonyme	C/T	Arg /Cys	13
31648736	rs3093543	non synonyme	C/A	Pro /His	51
31648763	rs1041981	non synonyme	C/A	Thr /Asn	60

L'étude du marqueur microsatellite a été réalisée par analyse de fragments (Genescan v3.7, Applied Biosystems) après une amplification (Polymerase Chain Reaction, PCR) réalisée avec des amorces fluorescentes.

Les haplotypes ont été reconstruits en utilisant le programme Phase version 2.1 (Stephens *et al.*, 2005; Stephens *et al.*, 2001). Les trois haplotypes prépondérants au

niveau de notre cohorte ont été étudiés, dont l'haplotype décrit par Taylor *et al.* (LTA1-1-1-1), présent chez 13% (27/214) des sujets.

c. Analyse statistique

Considérant la réponse clinique au traitement par IFX, les fréquences haplotypiques ont été comparées entre répondeurs et non-répondeurs en utilisant un test χ^2 ou un test exact de Fisher. La même procédure fut employée pour comparer les fréquences alléliques et génotypiques entre répondeurs et non-répondeurs pour chaque variant testé.

Afin d'évaluer les différences de réponses biologiques au traitement par IFX, les valeurs de CRP ont été normalisées et la variation du taux de CRP avant et après traitement a été comparée selon les haplotypes par un test U de Mann-Withney. Comme pour la réponse clinique, les différences de fréquences haplotypiques, alléliques et génotypiques entre les deux groupes ont été comparées par un test exact de Fisher.

C. Résultats et discussion

Une réponse clinique a été mise en évidence chez 65,4% et une réponse biologique chez 80% des patients de notre cohorte. Après étude des différents haplotypes rencontrés, aucune association n'a été mise en évidence entre ces haplotypes et la réponse au traitement par IFX (Table 9).

Considérant les patients homozygotes pour l'haplotype LTA 1-1-1-1, nous n'avons pu confirmer le résultat obtenu par Taylor. En effet, aucune association n'a pu être mise en évidence entre la non-réponse au traitement (clinique ou biologique) et l'haplotype 1-1-1-1 à l'état homozygote, considérant la cohorte complète ou chacun des deux sous-groupes, forme luminale/forme fistulisante (Table 10).

Table 9. Fréquences haplotypiques observées (%) (respectivement rs909253- rs746868-rs5875327-rs2857713- rs3093543-rs1041981, 1 correspondant à l'allèle majeur) et nombre d'allèles (n) chez les patients répondeurs et non répondeurs à l'IFX (réponse clinique, nombre total d'allèles = 388).

Haplotype	Non-répondeurs (n)	Répondeurs (n)	Valeurs de p
1_1_1_2_1_1	2.2 (3)	4.3 (11)	0.2146
1_1_2_2_1_1	17.8 (24)	18.6 (47)	0.8072
1_1_2_2_2_1	5.9 (8)	5.1 (13)	0.7637
1_2_1_1_1_1	38.5 (52)	38.4 (97)	0.9604
1_2_2_1_1_1	1.5 (2)	2.7 (7)	0.3336
2_1_1_1_1_2	31.8 (43)	29.6 (75)	0.7045
2_1_2_1_1_2	2.2 (3)	1.2 (3)	0.3533

Table 10. Fréquences de l'haplotype LTA 1-1-1-1 observées (%) (respectivement rs909253-rs5875327-rs2857713-rs1041981, 1 correspondant à l'allèle majeur) et nombre de patients (n) homozygotes selon les groupes répondeurs et non répondeurs à l'IFX, considérant les formes lumineuses, fistulisantes ou la cohorte complète (194 patients).

Réponse clinique			
	Répondeurs (n)	Non répondeurs (n)	Valeurs de p
Cohorte complète	16.9 (20)	10.4 (7)	0.22
Forme lumineuse	5.2 (9)	5.3 (6)	0.58
Forme fistulisante	12.6 (11)	3.4 (1)	0.16
Réponse biologique			
	Répondeurs (n)	Non-répondeurs (n)	Valeurs de p
Cohorte complète	3.8 (1)	10.6 (12)	0.40
Forme lumineuse	5 (1)	7 (6)	0.78
Forme fistulisante	0 (0)	22.2 (6)	0.22

De même, aucun variant ne peut individuellement être associé à la réponse thérapeutique à l'IFX, considérant les patients présentant une forme lumineuse, fistulisante ou l'ensemble de la cohorte (Table 11).

Table 11. Fréquences alléliques et valeurs de p pour chaque polymorphisme étudié en considérant la cohorte complète et les sous-groupes formes lumineales/fistulisantes (réponse clinique, nombre total d'allèles = 428).

Microsatellite ou SNP ID	Forme clinique	Fréquence de l'allèle mineur % (nombre d'allèles)		Valeurs de p
		Non-répondeurs	Répondeurs	
TNFc (GA) _{8/10}	Cohorte	28.4 (40)	28.2 (79)	0.145
	Luminale	28 (31)	29.6 (54)	0.303
	Fistulisante	30 (9)	24.5 (24)	0.099
rs909253 (A/G)	Cohorte	35.1 (53)	30.7 (86)	0.186
	Luminale	32.2 (39)	30.2 (55)	0.188
	Fistulisante	46.7 (14)	31.6 (31)	0.362
rs2857713 (A/G)	Cohorte	25 (37)	30 (84)	0.202
	Luminale	26.3 (31)	32.4 (59)	0.414
	Fistulisante	20 (6)	25.5 (25)	0.099
rs1041981 (A/C)	Cohorte	35.8 (53)	31.8 (89)	0.421
	Luminale	33 (39)	31.9 (58)	0.297
	Fistulisante	46.7 (14)	31.6 (31)	0.321
rs746868 (C/G)	Cohorte	37.8 (56)	39.6 (111)	0.370
	Luminale	38.1 (45)	37.4 (68)	0.505
	Fistulisante	20 (6)	41.8 (41)	0.026
rs3093543 (A/C)	Cohorte	5.4 (8)	5.7 (16)	0.535
	Luminale	6.8 (8)	6.6 (12)	0.567
	Fistulisante	0 (0)	4 (4)	0.347

L'étude réalisée par Taylor *et al.* suggérait une implication du gène LTA, ou du moins de la région du CMH, dans la réponse à l'IFX dans la maladie de Crohn. En effet, l'haplotype LTA 1-1-1-1 est en déséquilibre de liaison avec des marqueurs microsatellites répartis sur une région comprenant les gènes LTA, TNF et LTB. Cette région, comprenant de nombreux gènes impliqués dans la réponse immunitaire, pourrait contenir un variant génétique responsable d'une différence de réponse à l'IFX.

L'étude réalisée par Taylor *et al.* était basée sur un faible nombre de patients, rendant les résultats obtenus difficilement interprétables. Une seconde étude, sur une plus large cohorte, était donc nécessaire pour valider les résultats décrits avant d'aller plus en profondeur dans l'étude de cette région.

L'étude réalisée nous a permis d'exclure une implication majeure de l'haplotype LTA 1-1-1-1 dans la réponse à l'IFX, aussi bien clinique que biologique et en considérant indépendamment les formes luminales ou fistulisantes de cette pathologie.

III. Etude des gènes TNF et ADAM17

A. But de l'étude

Bien que l'étude du gène LTA ne nous ait pas permis de mettre en évidence une association entre cette région et la réponse à l'IFX, il n'en restait cependant pas moins intéressant de réaliser une étude approfondie du gène TNF. En effet, bien que le gène TNF soit proche du gène LTA et que certains de leurs marqueurs soient en déséquilibre de liaison, une étude complète du gène TNF nous semblait nécessaire pour évaluer le rôle de celui-ci dans la réponse à l'IFX.

Quelques études avaient été réalisées afin de mettre en évidence une association entre ce gène et la réponse à l'IFX ; cependant celles-ci se limitaient à l'étude de quelques polymorphismes au niveau du promoteur du gène. Afin d'exclure toute implication du gène TNF dans la réponse à l'IFX, un séquençage complet de ce gène a été réalisé.

Nous avons parlé de l'importance du TNF- α membranaire dans l'action thérapeutique de l'IFX. Pour compléter l'étude réalisée sur le TNF, nous avons étudié l'implication du gène codant pour la métalloprotéase responsable du clivage du TNF- α , le gène ADAM17.

B. Matériel et Méthodes

a. Patients

Les patients inclus dans cette étude sont également repris dans le programme BIEAP et ont été suivis comme précédemment. La cohorte comportait 222 patients atteints de la maladie de Crohn et traités par IFX, dont 160 présentaient une forme luminale et 62 une forme fistulisante. Les réponses clinique et biologique au traitement ont été évaluées comme pour l'étude précédente.

b. Génotypage

Le gène TNF et son promoteur (N° accès GenBank: AY066019, L11698) ont été entièrement séquencés (Big Dye Terminator sequencing kit v3.1, Applied Biosystems) après amplification de la région en 8 fragments se chevauchant. Les séquences ont été lues en utilisant le programme Seqscape software v2.1.1 (Applied Biosystems) et une confirmation par lecture manuelle des électrophorégrammes a été réalisée.

Pour l'étude de la région du gène ADAM17, 12 SNPs répartis sur une région de 107 kb et ayant une fréquence allélique mineure supérieure à 0.2 dans la population caucasienne ont été choisis (Table12). Le génotypage a été réalisé par la technique de discrimination allélique (Assay-On-Demand, Applied Biosystems) sur un 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). L'analyse des données a été réalisée en utilisant le SDS software v2.2 (Applied Biosystems).

Table 12. Caractéristiques des SNPs étudiés pour le gène ADAM17. MAF : Fréquence de l'allèle mineur.

SNPs	Type deSNP	MAF Cauc.	Contexte de séquence	Gène
rs2001658	Intergenique	0.48 (0.42)	TAAAT[C/T]GCTAA	ADAM17;CPSF3
rs12469362	Intergenique	0.26 (0.28)	TCTCC[C/T]TGACT	ADAM17;CPSF3
rs883399	Intron	0.47 (0.42)	TCCGC[A/G]TAATG	ADAM17
rs1048610	Faux_sens	0.47 (0.43)	CGGCC[A/G]GAAAG	ADAM17
rs2276338	Intron	0.47 (0.42)	GCCCA[C/T]TTAAG	ADAM17
rs1056204	Intron	0.26 (0.28)	TTGTC[A/C]TAAGA	ADAM17
rs10929587	Intron	0.31 (0.36)	ACCCT[A/T]TGTC	ADAM17
rs1880439	Intron	0.2 (0.17)	ATATC[A/C]TCCAT	ADAM17
rs10495565	Intron	0.27 (0.28)	TACTT[A/G]ACTAA	ADAM17
rs4464248	Intron	0.29 (0.28)	TAGCA[A/G]AACAC	ADAM17
rs11684747	Intergenique	0.20 (0.20)	TCTGA[A/G]GTATA	ADAM17
rs10929590	Intergenique	0.5 (0.48)	TAAAC[C/G]TTGGT	YWHAQ

c. Statistique

Gène TNF

Les fréquences alléliques et génotypiques ont été comparées entre répondeurs et non-répondeurs considérant la réponse clinique ainsi que la réponse biologique pour chaque SNP individuellement par un test de χ^2 . Une correction pour tests multiples fut appliquée par la réalisation d'un test de permutation. Les haplotypes ont été reconstruits par l'utilisation du logiciel Phase v2.1 en considérant les SNPs les plus fréquents (rs1799964, rs1800630, rs1799724, rs1800629, rs1800610, MAF >0.17). Les fréquences haplotypiques ont été comparées entre répondeurs et non-répondeurs par un test exact de Fisher.

Gène ADAM17

De même que pour le gène TNF, les haplotypes de la région ADAM17 ont été reconstruits avec le logiciel Phase v2.1, et les fréquences haplotypiques, alléliques et génotypiques comparées entre les groupes répondeurs/non-répondeurs par un test exact de Fisher ou un test χ^2 . Le seuil de signification a été abaissé à $\alpha = 0.00294$ après ajustement pour tests multiples (Bonferroni, n=17) considérant les différents gènes, les différentes réponses ainsi que les différents haplotypes et modèles testés sur cette cohorte. Chaque SNP a été également étudié comme variable indépendante et les fréquences alléliques et génotypiques comparées entre les répondeurs et non-répondeurs par un test χ^2 et permutations (n=10000).

C. Résultats et discussion

a. Caractéristiques de la cohorte

Table 13. Caractéristiques de la cohorte.

Statut clinique	Nombre de patients	Pourcentage
Forme luminale		
Réponse clinique	94	58.75
Rémission	29	40.28
Forme fistulisante		
Réponse clinique	49	79.03
Rémission	38	61.29
Cohorte complète		
Réponse clinique	143	64.41
Rémission	67	30.18
Réponse biologique	84	85.71

b. Gène TNF

Après séquençage du gène TNF sur notre cohorte de patients, 18 SNPs ont été mis en évidence. Trois variants non décrits dans les bases de données ont également été trouvés, chez des patients isolés. Aucune association n'a pu être mise en évidence entre ces SNPs (pris indépendamment) et la réponse (clinique ou biologique) au traitement (Table 14).

Parmi les SNPs étudiés étaient inclus les SNPs au niveau du promoteur du gène TNF (-238, -308, -376, -857, -1031), précédemment étudiés par Mascheretti *et al.* sur une cohorte exploratoire de 90 patients puis sur une cohorte de confirmation de 444 patients (Mascheretti *et al.*, 2002). Nos résultats confirment ceux obtenus par cette équipe. De plus une étude récente montre un déséquilibre de liaison entre l'haplotype LTA 1-1-1-1 et un SNP au niveau du promoteur du gène TNF (-857 C>T) (Ozeki *et al.*, 2006). Ces résultats corroborent ainsi nos deux premières études (étude de l'haplotype LTA 1-1-1-1 et étude du gène TNF). En effet, ces deux

marqueurs génétiques (haplotype et SNP), en fort déséquilibre de liaison, ne sont aucun des deux associés à la réponse à l'IFX.

Notre étude permet pour la première fois d'exclure tout variant du gène TNF comme facteur génétique prédisposant à une réponse à l'Infliximab dans la maladie de Crohn. Cependant, nous devons y apporter des restrictions. En effet, la cohorte étudiée est relativement large, mais ne permet pas d'exclure un effet qui ne serait pas majeur sur la réponse thérapeutique pour certains SNPs. Les SNPs ayant une fréquence allélique de l'allèle mineur inférieure à 0.04 sont peu représentés dans notre cohorte et nous n'avons, par conséquent, pas la puissance nécessaire pour exclure, pour ces marqueurs, un effet qui entraînerait une diminution de moins de 50% de la prévalence de réponse.

Table 14. Fréquences alléliques mineures et valeurs de p pour les SNPs du gène TNF.

A. Réponse clinique (MAF: fréquence de l'allèle mineur)

SNPs	Forme fistulisante (n=62)			Forme luminale (n=160)			Cohorte complète (n=222)		
	MAF Répondeurs	MAF Non- répondeurs	Valeurs de p	MAF Répondeurs	MAF Non- répondeurs	Valeurs de p	MAF Répondeurs	MAF Non- répondeurs	Valeurs de p
rs1799964	0.227	0.182	1	0.209	0.233	0.181	0.215	0.225	0.405
rs1800630	0.2	0.091	1	0.165	0.175	0.81	0.176	0.162	0.995
rs1799724	0.136	0.114	1	0.108	0.11	0.173	0.111	0.113	0.672
rs4248158	0.045	0	1	0.022	0.008	1	0.03	0.007	0.982
rs4248160	0	0	1	0.022	0.017	1	0.015	0.014	1
rs4248161	0	0	1	0.011	0	1	0.007	0	1
rs1800750	0.013	0.06	0.992	0.024	0.01	1	0.011	0.029	1
rs1800629	0.184	0.06	0.997	0.175	0.121	0.98	0.178	0.114	0.865
rs361525	0.052	0.062	1	0.037	0.072	0.981	0.042	0.071	0.969
rs3093661	0.044	0	1	0.030	0.059	0.995	0.035	0.049	1
rs4645839	0.011	0	1	0	0.008	1	0.003	0.007	1
rs1800610	0.078	0.125	1	0.113	0.102	0.47	0.101	0.105	0.639
rs4645841	0.011	0	1	0.012	0.025	1	0.011	0.021	1
rs1799769	0.067	0.042	1	0.053	0.017	0.963	0.058	0.021	0.953
rs4645842	0	0.083	0.134	0.017	0.042	0.999	0.011	0.021	0.387
rs3093662	0.065	0.083	1	0.049	0.106	0.628	0.054	0.103	0.859
rs3093664	0.066	0.041	1	0.038	0.092	0.581	0.047	0.084	0.615
rs3093665	0.01	0	1	0.011	0.04	0.893	0.011	0.033	0.938

B. Réponse biologique (MAF: fréquence de l'allèle mineur)

SNPs ID	Forme fistulisantes (n=62)			Forme luminale (n=160)			Cohorte complète (n=222)		
	MAF	MAF Non-répondeurs	Valeurs de p	MAF	MAF Non-répondeurs	Valeurs de p	MAF	MAF Non-répondeurs	Valeurs de p
rs1799964	0.15	0.5	0.667	0.189	0.423	0.101	0.185	0.428	0.081
rs1800630	0.15	0.5	0.667	0.142	0.346	0.194	0.143	0.357	0.11
rs1799724	0.2	0	1	0.088	0.038	0.999	0.0101	0.036	0.991
rs4248158	0	0	1	0.007	0.038	0.928	0.006	0.036	0.941
rs4248160	0	0	1	0.013	0.077	0.651	0.012	0.071	0.718
rs4248161	0	0	1	0	0.038	0.545	0	0.036	0.579
rs1800750	0.036	0	1	0.013	0.038	0.998	0.016	0.033	1
rs1800629	0.178	0	0.972	0.167	0.038	0.716	0.168	0.033	0.747
rs361525	0.036	0	1	0.045	0.077	0.981	0.043	0.067	0.996
rs3093661	0.042	0	1	0.029	0.038	0.998	0.031	0.036	1
rs4645839	0.042	0	1	0	0	1	0.006	0	1
rs1800610	0.083	0	1	0.096	0.038	0.998	0.094	0.036	0.993
rs4645841	0	0	1	0.029	0.038	1	0.025	0.036	1
rs1799769	0.083	0	1	0.058	0	0.957	0.0625	0	0.975
rs4645842	0	0	1	0.029	0.038	1	0.025	0.036	1
rs3093662	0.036	0	1	0.075	0.077	1	0.069	0.067	1
rs3093664	0.036	0.25	0.513	0.069	0.038	1	0.064	0.067	1
rs3093665	0	0	1	0.032	0	0.998	0.027	0	1

c. Gène ADAM17

Un bloc haplotypique a été défini dans la région, comprenant 11 des 12 SNPs testés (rs2001658, rs12469362, rs883399, rs1048610, rs2276338, rs1056204, rs10929587, rs1880439, rs10495565, rs4464248, rs11684747) (Haploview V3.2). Cinq haplotypes majeurs ont été déterminés, dont les deux plus fréquents sont 2-1-2-2-1-2-1-1-1-1 et 1-2-1-1-1-2-1-1-2-2-1 (1 correspondant à l’allèle majeur). Aucune association n’a pu être mise en évidence entre ces haplotypes et la réponse clinique ou biologique au traitement considérant les fréquences haplotypiques dans chacun des sous-groupes (Table 15).

Table 15. Fréquences haplotypiques (respectivement rs2001658, rs12469362, rs883399, rs1048610, rs2276338,rs1056204, rs10929587, rs1880439, rs10495565, rs4464248 et rs11684747, 1 représente l’allèle majeur) et valeur de p pour le gène ADAM17 considérant la réponse clinique (n=173).

Haplotypes	Nb d’allèles NR (%)	Nb d’allèles R (%)	P Values
12111211221	25 (24.5)	71 (29.1)	0.38
11111112111	13 (12.7)	22 (9)	0.2942
11111112112	18 (17.6)	49 (20.1)	0.6012
21222112121	4 (3.9)	18 (7.4)	0.1693
21222121111	41 (40.2)	80 (32.8)	0.1876
Total	102	244	

Cependant l’haplotype 1-2-1-1-1-2-1-1-2-2-1 semble prédisposer à une meilleure réponse au traitement. Aucun patient homozygote pour cet haplotype n’a pu être mis en évidence chez les non-répondeurs au traitement, alors que 13% (16/122) des patients répondeurs sont homozygotes pour ce haplotype (p non corrigée = 0.0027, test exact de Fisher, n = 173). Les mêmes résultats furent obtenus considérant les 4 « tagSNP » pour ce haplotype, présents à l’état homozygote (Table 16). Ces SNPs sont en fort déséquilibre de liaison (Figure 29) et marquent ce haplotype (et en portent la même information). Ainsi l’étude de l’un d’entre eux aurait suffi à mettre en évidence le signal trouvé.

Table 16. Patients homozygotes pour l'allèle présent dans l'haplotype 12111211221 et valeurs de p (réponse clinique, n=186).

SNPs	Nb de non-répondeurs homozygotes (%)	Nb de répondeurs Homozygotes (%)	Valeurs de p
rs12469362	0 (0)	17 (13)	0.0013
rs1056204	0 (0)	17 (13)	0.0014
rs10495565	0 (0)	17 (13)	0.0014
rs4464248	0 (0)	16 (13)	0.0018

Cette étude a permis de mettre en évidence une association entre un haplotype du gène ADAM17 et la réponse au traitement par IFX dans la maladie de Crohn. Les patients homozygotes pour cet haplotype montrent tous une diminution d'au moins 70 points au niveau du score CDAI après 4 semaines de traitement ou une diminution d'au moins 50% du drainage des fistules. Ces résultats suggèrent une implication du gène ADAM17 dans la prédisposition génétique à la réponse à l'IFX. Une étude plus approfondie du gène et de cette région est nécessaire afin de mettre en évidence le variant causal responsable de cette prédisposition génétique et en déséquilibre de liaison avec les 4 « tag SNPs » étudiés. Cependant, une confirmation préalable des résultats obtenus est nécessaire sur une deuxième cohorte de patients. Nous ne pouvons actuellement qu'établir des hypothèses sur le mécanisme d'action de ce variant génétique. Ce variant pourrait entraîner une variation du niveau d'expression ou une dysfonction de la protéine ADAM17. Ceci pourrait aboutir à une différence de ratio de TNF- α soluble/mTNF- α mais également du ratio TNFR2/mTNFR2. Etant donné l'implication des formes membranaires du TNF et des récepteurs dans le mécanisme d'action de l'IFX et dans la réponse cellulaire à l'inflammation, une modification de ces ratios pourrait influencer la réponse au traitement.

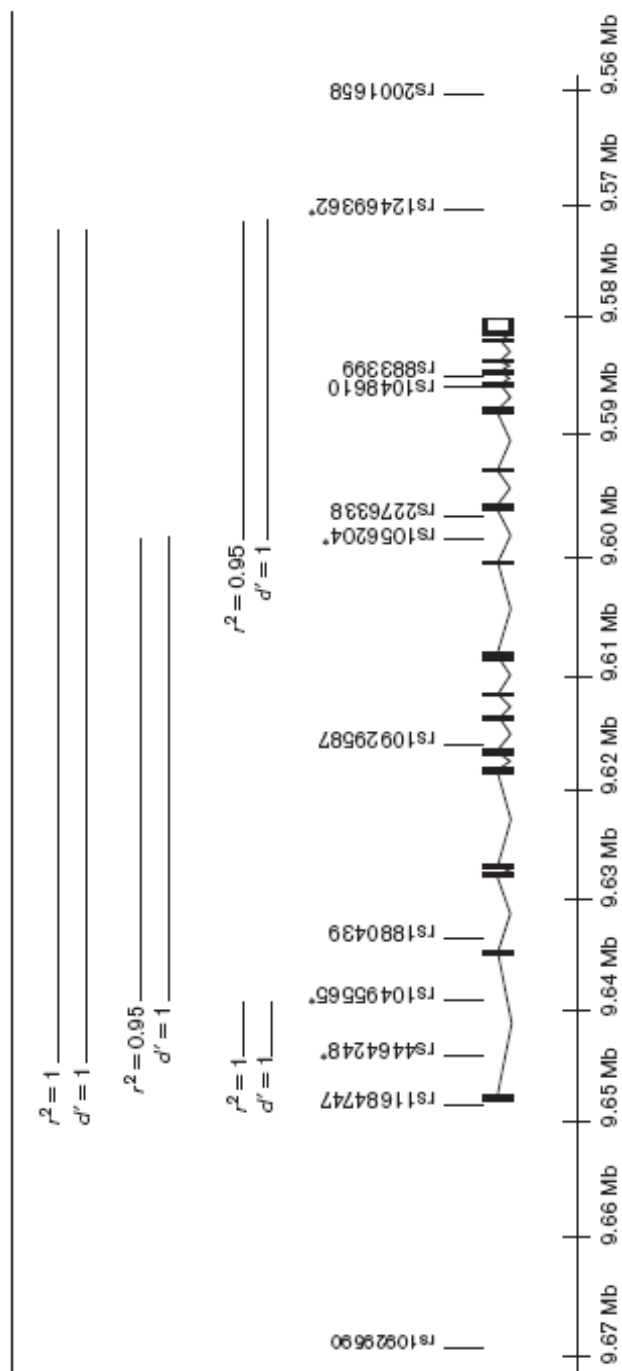


Figure 29. Représentation de la position des 12 SNPs étudiés pour le gène ADAM17 et des valeurs du déséquilibre de liaison entre les 4 « Tag » SNPs.

I. Introduction

A. La famille des IRFs

Les « Interferon regulatory factors » (IRFs) sont des facteurs de transcription jouant un rôle essentiel dans la régulation de gènes induits par des infections virales, dans l'immuno-stimulation et dans la croissance cellulaire. Neuf facteurs de transcription ont été identifiés comme appartenant à cette famille dont certains agissent comme activateurs, répresseurs ou ont ces deux fonctions. Chaque IRF contient un domaine de liaison à l'ADN conservé d'environ 120 acides aminés, reconnaissant une séquence consensus d'ADN connue sous le nom de ISRE (Interferon Stimulated Response Element). Ces séquences sont retrouvées au niveau de gènes codants pour les IFNs de type 1, mais également au niveau de nombreux autres gènes impliqués dans l'immunité et l'oncogenèse. Les IRFs ont ainsi de nombreux rôles dans le développement et la fonction des cellules immunitaires (Table 17).

En présence de certains virus ou bactéries, l'induction par les IRFs d'une réponse immunitaire innée nécessite, au niveau cellulaire, la reconnaissance des pathogènes par des systèmes spécifiques. Ces différents systèmes, appelés PRRs (Pattern Recognition Receptors), permettent la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs), tels que l'ADN bactérien ou viral, l'ARN viral simple ou double brin, le lipopolysaccharide...

Ces PRRs peuvent être transmembranaires (tels les récepteurs « Toll-like », TLRs) ou cytosoliques (tels les protéines NODs) et agissent comme des plateformes coordonnant les réponses immunitaires innées et adaptatives (Akira *et al.*, 2006; Pasare *et al.*, 2004). Selon le type de pathogène et selon le type cellulaire impliqué, différents systèmes de reconnaissance seront activés, stimulant des réponses immunitaires distinctes.

Table 17. Caractéristiques des différents membres de la famille des IRFs. D'après "Nature Reviews Immunology". IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors.

IRF	Expression	Target gene	Main immune function of target gene	Phenotype of gene-knockout mice
IRF1	Constitutive, and inducible by IFN γ	<i>NOS2, GBP1 and gp91^{PHOX}</i>	Promote antibacterial and antiviral innate immunity	Susceptibility to infection with the intracellular bacteria <i>M. bovis</i> and <i>B. abortus</i> ; reduced resistance to infection with the virus EMCV
		<i>IL12</i>	Promotes T $_H$ 1-cell responses	Defective T $_H$ 1-cell responses; susceptibility to infection with the parasite <i>L. major</i> and the intracellular bacterium <i>L. monocytogenes</i>
		<i>IL15</i>	Controls haematopoietic-cell development	Defective NK-cell, NKT-cell and IEL development
		<i>TAP1 and LMP2</i>	Provide MHC class I molecules with short peptides	Reduced CD8 $^+$ T-cell numbers
		<i>CDKN1A</i>	Controls the cell-cycle and apoptosis	Reduced DNA-damage-induced cell-cycle arrest
		Caspase-1	Controls apoptosis and processes IL-1 β	Reduced DNA-damage-induced apoptosis of mitogen-activated mature T cells
IRF2	Constitutive	IFN-inducible genes (such as <i>OAS, PKR and IRF7</i>) [*]	Attenuate type I IFN responses	Severe skin inflammation mediated by CD8 $^+$ T cells; defective CD4 $^+$ DC development
		<i>IL12</i>	Promotes T $_H$ 1-cell responses	Susceptibility to infection with the parasite <i>L. major</i>
IRF3	Constitutive	<i>IFNB, IFNA4, IFIT1, CXCL9, CXCL10 and CCL5</i>	Promote antibacterial and antiviral innate immunity	Reduced resistance to infection with the virus EMCV; increased ability to clear infection with the intracellular bacterium <i>L. monocytogenes</i> ; resistance to LPS-induced endotoxic shock
IRF4	Constitutive, and inducible by TLR ligation	<i>IL4 and GATA3</i>	Controls T-cell function	Defective T $_H$ 2-cell differentiation
		<i>IGK and CD23</i>	Control B-cell development and function	Defective mature B-cell function; defective immunoglobulin production
		ND	Controls DC development	Defective CD4 $^+$ DC development
IRF5	Constitutive, and inducible by type I IFNs and by TLR ligation	<i>IL6, IL12, TNF, NFKB1Z and CXCL2</i>	Promote inflammation	Resistance to LPS- or CpG-containing-DNA-induced shock
IRF6	ND	ND	ND	ND
IRF7	Constitutive, and inducible by type I IFNs	<i>IFNB and IFNA</i>	Promote antiviral innate immunity	Susceptibility to infection with the viruses EMCV, VSV and HSV; reduced efficiency of CD8 $^+$ T-cell cross-priming
IRF8	Constitutive, and inducible by IFN γ	<i>IL12 and IL18</i>	Promote T $_H$ 1-cell responses	Defective T $_H$ 1-cell differentiation; susceptibility to infection with the intracellular bacterium <i>L. monocytogenes</i> and the parasites <i>L. major</i> and <i>T. gondii</i>
		ND	Controls haematopoietic-cell development	Development of chronic-myeloid-leukaemia-like disease; defective plasmacytoid-DC and CD8 $^+$ DC development
IRF9	Constitutive	IFN-inducible genes (such as <i>OAS, PKR and IRF7</i>)	Mediate type I IFN responses	Susceptibility to infection with the viruses EMCV, VSV and HSV

B. IRF5

IRF5 est un membre de la famille des IRFs identifié au départ comme régulateur de l'expression des gènes des interférons (IFNs) de type 1 (IFN- α et IFN- β). Les études réalisées par après ont permis de mettre en évidence une implication plus large d'IRF5 dans la défense de l'hôte contre certains pathogènes. IRF5 est exprimé constitutionnellement dans les lymphocytes B, les monocytes et dans les cellules dendritiques, mais son expression peut être stimulée par les IFNs de type 1 dans la plupart des tissus lymphoïdes (Barnes *et al.*, 2001), suggérant une implication d'IRF5 dans la réponse immunitaire innée.

Comme les autres membres de la famille des IRFs, IRF5 comporte dans sa partie N-terminale un domaine de fixation de l'ADN. Outre ce domaine de liaison à l'ADN, IRF5 contient un domaine d'interaction à l'extrémité C-terminale, deux signaux de localisation nucléaire, un domaine d'auto-inhibition ainsi qu'un domaine riche en sérines (Figure 30) (Barnes *et al.*, 2002).

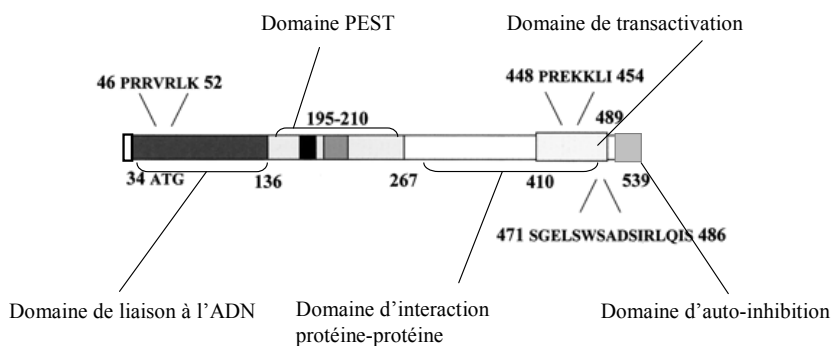


Figure 30. Représentation schématique de la protéine IRF5. Les différents domaines de la protéine sont représentés. Les acides aminés des deux signaux de localisation nucléaire des extrémités amino et carboxy terminales sont indiqués au-dessus de la figure et ceux du domaine riche en sérines en dessous. Adapté de *Molecular and Cellular Biology. Multiple regulatory domains of IRF-5 control activation, cellular localization, and induction of chemokines that mediate recruitment of T lymphocytes.*

L'activation d'IRF5 est induite par les TLR4, TLR7, TLR8 et TLR9 (Takaoka *et al.*, 2005). Après stimulation de ces TLRs par les PAMPs, l'activation des voies de signalisation MYD88 dépendantes ou TRIF dépendantes entraîne la phosphorylation d'IRF5 sur des résidus sérines puis une migration d'IRF5 du cytoplasme vers le

noyau ainsi que sa dimérisation, stimulant la production d'interférons de type 1 et la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-12p40) (Ouyang *et al.*, 2007) (Figure 31).

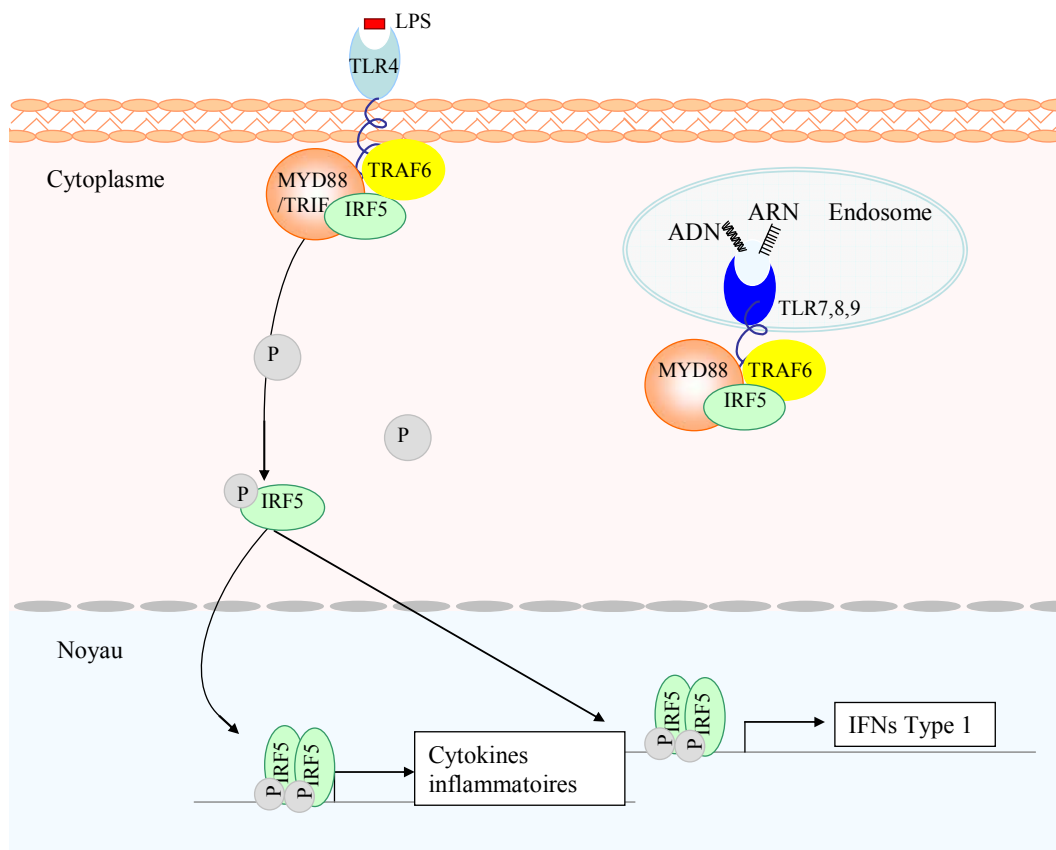


Figure 31. Représentation schématique des voies de signalisations impliquant IRF5. LPS : lipopolysaccharide, TRAF6 : receptor-associated factor MYD88: Myeloid differentiation primary response protein 88

De plus, IRF5 induit l'expression de gènes codant pour les chémokines RANTES, MIP-1, MCP-1, CXC, IL8, IP-10.

La plupart de ces chémokines ont une activité chimotactique vis-à-vis des lymphocytes, suggérant une implication d'IRF5 dans le trafic lymphocytaire. Une dérégulation de ces chémokines est observée dans des pathologies inflammatoires chroniques telles que la MC (Ansari *et al.*, 2006; McCormack *et al.*, 2001). Ainsi IRF5 pourrait non seulement être impliqué dans la défense contre des pathogènes mais également comme médiateur d'inflammations pathologiques.

De par ses fonctions de stimulation du système immunitaire, telles que décrites ci-dessus, IRF5 pourrait être impliqué dans la prédisposition génétique à la MC. Une activation aberrante de ce facteur de transcription pourrait en effet entraîner une réponse immunitaire inappropriée aboutissant à une inflammation chronique.

C. Le gène IRF5

Le gène IRF5 long de 12kb comprend 9 exons et est localisé en 7q32. La transcription du gène IRF5 produit 10 mRNA différents par épissage alternatif (Aceview, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Asembly/index.html>) (Figure 32). Différents promoteurs et sites de polyadénylation sont également décrits (Mancl *et al.*, 2005).

L'expression des différentes isoformes d'IRF5 est spécifique du type cellulaire et du stimulus. Ces isoformes pourraient, comme pour IRF3, avoir des fonctions biologiques différentes (Karpova *et al.*, 2001).

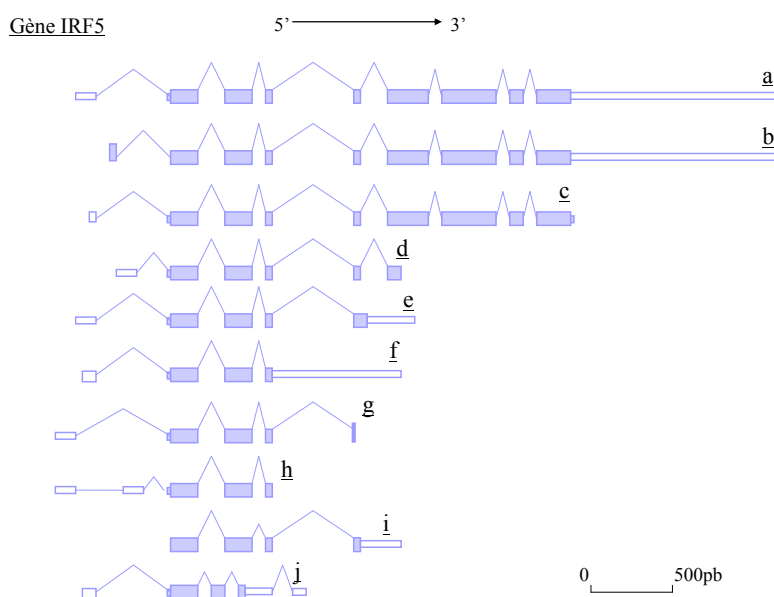


Figure 32. Représentation des différentes isoformes d'IRF5. Adapté d'Aceview, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Asembly/index.html>. Les exons sont représentés par les boîtes (codants en bleu et non codants en blanc).

Récemment, différents variants au niveau du gène IRF5 ont été associés au Lupus Erythémateux Disséminé (LED) (Sigurdsson *et al.*, 2005) et à la Polyarthrite Rhumatoïde (PAR) (Sigurdsson *et al.*, 2007). IRF5 pourrait ainsi être un gène prédisposant aux pathologies immunes. Actuellement, aucun variant fonctionnel n'a pu être identifié comme facteur génétique causal, ainsi le mécanisme par lequel IRF5 est impliqué dans la prédisposition génétique à ces pathologies est encore incompris (Garnier *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 2007b).

II. Etude du gène IRF5

A. But de l'étude

Une implication de facteurs génétiques dans la prédisposition aux MICI est clairement établie. Parmi les gènes actuellement identifiés, certains prédisposent uniquement à la MC (CARD15, ATG16L1) ou aux deux pathologies (IL23R) (J.R. Fraser Cummings, 2007; Lesage *et al.*, 2002a; Tremelling *et al.*, 2007).

Une prédisposition génétique à ces maladies a également été suspectée après la mise en évidence de leur plus grande occurrence dans les familles de patients atteints de ce type de pathologies (Cooper *et al.*, 1999; Weng *et al.*). De même, ces patients présentent un risque plus élevé de développer plusieurs maladies immunes par rapport à la population générale (Robinson *et al.*, 2006).

Certains gènes prédisposant à différentes maladies immunes ont récemment été identifiés, tels que le gène CTLA-4 (maladie de Graves, thyroïdite de Hashimoto, diabète de type 1) et le gène PTPN22 (PAR, LED, diabète de type 1 et maladie de Graves) (Kavvoura *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007).

Le gène IRF5 code pour un facteur de transcription impliqué dans diverses voies de la réponse immunitaire. L'implication du gène IRF5 dans les maladies immunes a été mise en évidence tout d'abord dans le LED, ensuite dans la PAR.

Cette étude a été réalisée afin de déterminer le rôle d'IRF5 dans la prédisposition génétique aux MICI, considérant son implication dans la production de diverses cytokines et chémokines.

B. Matériel et Méthodes

a. Patients

La cohorte étudiée comprend 241 contrôles sains et 1007 patients Wallons atteints de MICI, dont 748 présentent une MC, 254 une RCUH et 5 une colite indéterminée (CI).

Une cohorte de confirmation a été obtenue grâce à une collaboration avec l'hôpital de Leuven. Cette cohorte comprend 311 contrôles sains et 687 patients MICI dont 488 MC, 192 RCUH et 7 CI.

b. Génotypage

10 SNPs et deux insertions-délétions (indels), ont été choisis pour leur rôle fonctionnel potentiel ou leur association avec le LED ou la PAR (Table 18). L'indel CGGGG a été incluse dans l'étude étant donné sa localisation au niveau de la région promotrice et considérant son rôle fonctionnel potentiel. En effet, l'allèle 4XCGGGG (insertion) pourrait créer un site de fixation supplémentaire pour le facteur de transcription SP1 (Specific Protein 1) par rapport à l'allèle 3XCGGGG (délétion) ("TFSEARCH, <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html/>) (Heinemeyer, 1998) (Figure 33).

La seconde indel (30bp indel) correspond à une délétion de 30 pb au niveau de l'exon 6 entraînant une perte de 10 acides aminés (Graham *et al.*, 2007b).

Les SNPs ont été génotypés par la technique de miniséquençage (multiplex SNPstream system (Beckman Coulter), FP-TDI (Template-directed dye-terminator incorporation with fluorescence polarization, Perkin Elmer)) (Bell *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 2001) et les indels ont été étudiées par analyse de fragments (logiciel GeneMapper v.3.7., Applied Biosystems) après une PCR réalisée avec des amorces fluorescentes.

Table 18. Caractéristiques des polymorphismes étudiés

SNPs	Rôle fonctionnel potentiel	Association
rs729302	Région promotrice	LED
rs4728142	Région promotrice, variation du niveau d'expression d'IRF5	LED
rs3757385	Région promotrice	PAR
CGGGG indel	Région promotrice	
rs2004640	Alteration d'un site d'épissage / intron, variation du niveau d'expression d'IRF5	LED, PAR
rs3807306	Intron	LED, PAR
30bp indel	Alteration du domaine PEST, variation du niveau d'expression d'IRF5	
rs2070197	Variation du niveau d'expression d'IRF5	LED
rs10954213	Alteration de longueur du 3' UTR, variation du niveau d'expression d'IRF5	LED
rs11770589	3' UTR	
rs2280714	Variation du niveau d'expression d'IRF5	LED
rs12539741	Variation du niveau d'expression d'IRF5	LED

c. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Des sondes oligonucléotidiques complémentaires à chaque allèle de la CGGGG indel (3X et 4XCGGGG) ont été incubées avec des extraits nucléaires de cellules sanguines périphériques afin de mettre en évidence une éventuelle différence de fixation protéique allèle-dépendante.

d. Analyse statistique

Pour chaque sous-groupe de patients (MC et RCUH) ainsi que pour la cohorte complète de MICI, les fréquences alléliques et génotypiques ont été comparées avec celles des contrôles par un test de χ^2 .

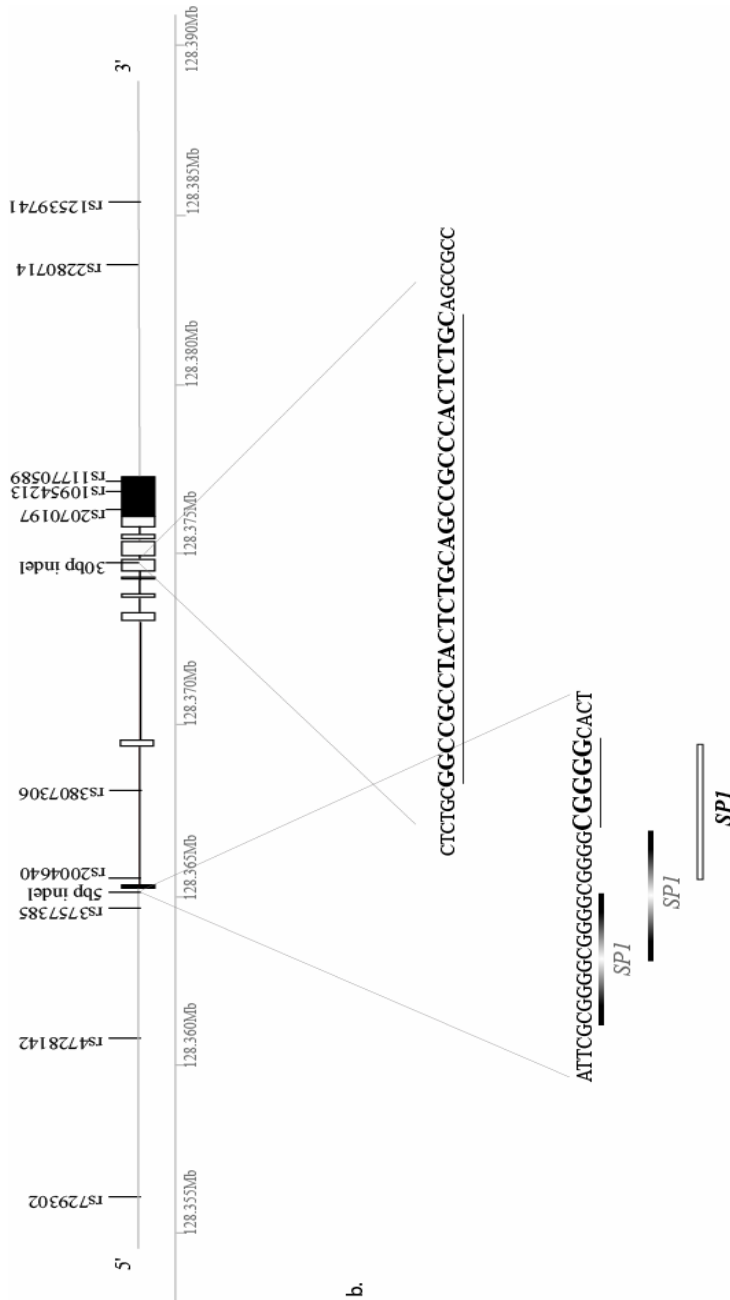


Figure 33. Représentation schématique du gène IRF5 a. Les boîtes représentent les exons (codant en blanc et non codant en noir). Les polymorphismes étudiés et leur localisation sont représentés. b. Illustration des séquences des deux indels étudiées (soulignées). Les sites de liaison du facteur de transcription SP1 sont représentés par des rectangles, dont le blanc représente le troisième site créé par l'insertion de CGGGG selon TFSearch.

Les haplotypes formés des 6 polymorphismes localisés dans le promoteur et le premier intron du gène IRF5 (de rs729302 à rs3807306) ont été reconstruits en utilisant le logiciel FastPhase software (Scheet *et al.*, 2006). Les fréquences haplotypiques ont été comparées entre les sous-groupes de patients et les contrôles par un test exact de Fisher. Le calcul du rapport de vraisemblance (odds ratio = OR) a été calculé comme étant égal à : $[a(r)/b(r)] / [a(nr)/b(nr)]$, avec a et b le nombre d'allèles observés respectivement chez les patients et les contrôles en considérant (r) comme l'allèle à risque et (nr) l'allèle protecteur.

C. Résultats et discussion

Considérant la cohorte exploratoire de 1007 patients atteints de MICI, six polymorphismes (rs4728142, rs3807306, rs10954213, rs11770589 et les deux indels) ont montré un signal indicateur d'association ($p < 0.05$) avec les MICI (Table 19). Le signal le plus fort venant de l'indel CGGGG ($p = 1.9 \times 10^{-5}$).

Considérant les deux sous-groupes de patients (MC et RCUH) cette association est présente aussi bien pour la MC que pour la RCUH, avec un signal plus important pour le sous-groupe des patients RCUH ($p = 5.3 \times 10^{-8}$, OR 2.43 (1.76-3.34)).

Afin de valider les résultats obtenus, une cohorte de confirmation fut génotypée pour les mêmes SNPs. L'association mise en évidence dans la première cohorte pour l'indel CGGGG a été retrouvée dans la cohorte de confirmation ($p = 3.2 \times 10^{-5}$, OR 1,59 (1.28 -1.98)), alors que les signaux provenant des autres polymorphismes n'ont pas pu être confirmés (Table 20).

Considérant l'analyse combinée des deux cohortes, outre le signal provenant de l'indel CGGGG, deux autres SNPs (rs4728142, rs3807306) montrent un signal d'association avec les MICI (Table 21). Ces deux SNPs sont hautement corrélés (rs4728142 ($r^2 = 0.77$), rs3807306 ($r^2 = 0.65$)), à l'indel CGGGG (Figure 34).

Table 20. Fréquences alléliques, valeurs de p et rapports de vraisemblance (Odds ratio) avec intervalle de confiance de 95% pour chaque polymorphisme étudié considérant la cohorte exploratoire complète et les sous-groupes de cette cohorte (MC et RCUH).

SNPs	Allèles	Allèle à Risque	Contrôles n=223	Fréquences Alléliques			Valeurs de P					Odds ratio (I.C. 0.95)	
				MICI Patients n=987	MC Patients n=731	RCUH Patients n=250	MICI Patients	MC Patients	RCUH Patients	MICI Patients	MC Patients	RCUH Patients	MC Patients
rs729302	A/C	A	0.40	0.35	0.37	0.30	0.068	0.25	0.0027	0.80 (0.64-1.01)	0.87 (0.69-1.10)	0.64 (0.48-0.85)	
rs4728142	A/G	A	0.36	0.45	0.42	0.51	0.0016	0.029	0.000010	1.46 (1.15-1.84)	1.32 (1.03-1.68)	1.90 (1.43-2.52)	
rs3757385	G/T	G	0.42	0.37	0.38	0.35	0.072	0.15	0.028	0.81 (0.65-1.01)	0.84 (0.66-1.06)	0.73 (0.55-0.96)	
CGGGG indel ¼ (CGGGG)		Ins	0.30	0.43	0.41	0.51	0.000019	0.00068	0.00000053	1.81 (1.37-2.39)	1.63 (1.23-2.17)	2.42 (1.76-3.34)	
rs2004640	T/G	T	0.45	0.5	0.48	0.55	0.071	0.27	0.0036	1.23 (0.99-1.54)	1.15 (0.91-1.44)	1.51 (1.15-1.98)	
rs3807306	T/G	T	0.40	0.48	0.46	0.53	0.0056	0.046	0.00023	1.37 (1.10-1.71)	1.27 (1.01-1.60)	1.69 (1.28-2.22)	
30bp indel	½	Del	0.46	0.52	0.52	0.46	0.021	0.042	0.022	1.30 (1.04-1.62)	1.27 (1.01-1.60)	0.73 (0.55-0.95)	
rs2070197	C/T	C	0.08	0.09	0.08	0.10	1	0.92	0.63	1.03 (0.69-1.53)	0.98 (0.65-1.48)	1.16 (0.71-1.86)	
rs10954213	A/G	A	0.46	0.39	0.40	0.37	0.018	0.050	0.011	0.76 (0.61-0.95)	0.79 (0.63-0.99)	0.69 (0.52-0.91)	
rs11770589	A/G	A	0.55	0.48	0.52	0.46	0.018	0.036	0.018	0.76 (0.61-0.95)	1.28 (1.02-1.6)	0.72 (0.55-0.94)	
rs2280714	T/C	T	0.39	0.35	0.36	0.34	0.10	0.16	0.072	0.82 (0.66-1.03)	0.84 (0.67-1.06)	0.77 (0.58-1.02)	
rs12539741	T/C	T	0.07	0.09	0.08	0.10	0.46	0.58	0.25	1.22 (0.79-1.90)	1.16 (0.74-1.83)	1.37 (0.82-2.29)	

Table 20. Fréquences alléliques, valeurs de p et rapports de vraisemblance (Odds ratio) avec intervalle de confiance de 95% pour chaque polymorphisme étudié considérant la cohorte de confirmation complète et les sous-groupes de cette cohorte (MC et RCUH).

SNPs	Allèles	Allèle à Risque	Contrôles n=311	Patients			Patients			Patients			Patients			Odds ratio (I.C. 0,95)
				MICI n=674	Patients MC n=476	RCUH n=179	MICI	Patients	RCUH	Patients MC	Patients	RCUH	Patients MC	Patients	RCUH	
rs729302	A/C	A	0.36	0.37	0.34	0.91	0.54	0.56	1.01 (0.82-1.25)	1.07 (0.86-1.34)	0.91 (0.69-1.21)					
rs4728142	A/G	A	0.39	0.42	0.43	0.17	0.29	0.26	1.15 (0.94-1.42)	1.13 (0.91-1.40)	1.17 (0.89-1.55)					
rs3757385	G/T	G	0.38	0.37	0.40	0.79	0.74	0.57	0.97 (0.79-1.19)	0.96 (0.77-1.20)	1.09 (0.83-1.43)					
CGGG indel	3/4 (CGGGG)	Ins	0.35	0.46	0.46	0.00032	0.00014	0.0023	1.59 (1.28-1.98)	1.57 (1.24-1.98)	1.59 (1.18-2.14)					
rs2004640	T/G	T	0.49	0.50	0.50	0.72	0.83	0.89	1.04 (0.85-1.27)	1.03 (0.83-1.27)	1.02 (0.78-1.34)					
rs3807306	T/G	T	0.47	0.49	0.48	0.51	0.71	0.41	1.07 (0.88-1.31)	1.04 (0.84-1.29)	1.13 (0.86-1.48)					
30bp indel	1/2	Del	0.47	0.49	0.49	0.58	0.42	0.68	1.06 (0.87-1.29)	1.09 (0.88-1.3)	1.06 (0.82-1.39)					
rs2070197	C/T	C	0.08	0.10	0.092	0.12	0.057	0.54	1.34 (0.94-1.91)	1.43 (0.99-2.09)	1.17 (0.73-1.89)					
rs10954213	A/G	A	0.39	0.39	0.40	0.87	0.87	0.72	0.98 (0.79-1.20)	0.98 (0.79-1.20)	1.05 (0.80-1.39)					
rs11770589	A/G	A	0.47	0.50	0.49	0.54	0.39	0.58	1.07 (0.87-1.3)	1.10 (0.89-1.36)	1.09 (0.83-1.42)					
rs2280714	T/C	T	0.34	0.34	0.36	0.91	0.86	0.52	0.98 (0.79-1.21)	0.97 (0.78-1.22)	1.1 (0.83-1.45)					
rs12539741	T/C	T	0.080	0.11	0.092	0.10	0.057	0.54	1.35 (0.94-1.92)	1.45 (1-2.10)	1.18 (0.73-1.89)					

Table 21. Fréquences alléliques, valeurs de p et rapports de vraisemblance (Odds ratio) avec intervalle de confiance de 95% pour chaque polymorphisme étudié considérant l'analyse combinée des deux cohortes (complètes et les sous-groupes MC et RCUH).

SNPs	Allèles	Allèle à Risque	Fréquences alléliques				Valeurs de P								Odds ratio (I.C. 0.95)		
			Contrôles n=534		Patients		Patients MCI n=1661		Patients RCUH n=429		Patients MC		Patients RCUH		Patients MCI	Patients MC	Patients RCUH
			MCI	MC	MCI	MC	MCI	MC	MCI	MC	MCI	MC	MCI	MC			
rs729302	A/C	A	0.38	0.36	0.37	0.32	0.26	0.81	0.011	0.91 (0.79-1.07)	0.98 (0.83-1.15)	0.77 (0.63-0.94)					
rs4728142	A/G	A	0.38	0.42	0.42	0.48	0.0014	0.029	0.000042	1.28 (1.1-1.49)	1.20 (1.02-1.40)	1.50 (1.24-1.83)					
rs3757385	G/T	G	0.40	0.37	0.37	0.37	0.19	0.30	0.28	0.90 (0.78-1.05)	0.92 (0.78-1.07)	0.90 (0.74-1.09)					
CGGGG indel 3/4 (CGGGG)	Ins	Ins	0.33	0.44	0.43	0.49	0.00000014	0.0000033	0.0000000079	1.62 (1.37-1.91)	1.51 (1.27-1.80)	1.93 (1.56-2.38)					
rs2004640	T/G	T	0.47	0.50	0.49	0.53	0.16	0.46	0.027	1.11 (0.96-1.29)	1.06 (0.91-1.24)	1.24 (1.03-1.50)					
rs3807306	T/G	T	0.44	0.48	0.47	0.52	0.027	0.17	0.0018	1.18 (1.02-1.37)	1.11 (0.95-1.30)	1.36 (1.12-1.64)					
30bp indel	1/2	Del	0.50	0.48	0.49	0.47	0.30	0.51	0.27	0.92 (0.80-1.07)	0.95 (0.81-1.10)	0.90 (0.74-1.08)					
rs2070197	C/T	C	0.081	0.094	0.094	0.094	0.27	0.27	0.39	1.17 (0.89-1.52)	1.17 (0.89-1.54)	1.17 (0.84-1.67)					
rs10954213	A/G	A	0.42	0.39	0.39	0.38	0.11	0.21	0.15	0.88 (0.76-1.03)	0.90 (0.77-1.06)	0.87 (0.71-1.05)					
rs11770589	A/G	A	0.50	0.49	0.49	0.48	0.30	0.48	0.29	0.92 (0.80-1.07)	0.95 (0.81-1.10)	0.90 (0.75-1.09)					
rs2280714	T/C	T	0.36	0.35	0.35	0.35	0.31	0.41	0.48	0.92 (0.79-1.08)	0.93 (0.80-1.10)	0.93 (0.77-1.13)					
rs12539741	T/C	T	0.077	0.095	0.096	0.095	0.11	0.11	0.19	1.25 (0.95-1.65)	1.26 (0.95-1.68)	1.26 (0.90-1.78)					

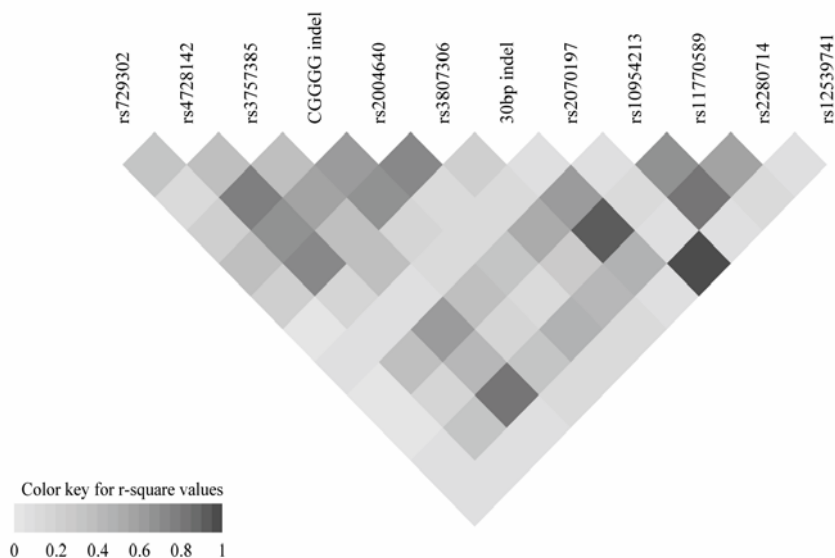


Figure 34. Représentation des valeurs de déséquilibre de liaison r^2 entre les polymorphismes étudiés. Graphique réalisé avec l'option snp.plotter du logiciel R.

Un bloc haplotypique comprenant les polymorphismes rs729302, rs4728142, rs3757385, indel CGGGG, rs2004640, rs3807306 a été défini (Haploview V.3.2). L'analyse des 4 haplotypes majeurs (fréquence >0.1) retrouvés au sein de notre population n'a pas permis de mettre en évidence d'haplotype montrant un signal plus fort que celui trouvé pour l'indel CGGGG isolément.

Contrairement aux résultats rapportés dans le LED (Graham *et al.*, 2007b), les SNPs rs2070197 et rs12539741 localisés respectivement à l'extrémité 3' non traduite et 5kb en aval du gène IRF5, ne montrent pas de signal d'association avec les MICI dans notre cohorte. Ces deux SNPs sont en fort déséquilibre de liaison (DL) avec le SNP rs10488631 (Graham *et al.*, 2007a), lui-même en fort DL avec d'autres SNPs répartis dans la région contenant le gène TNPO3 (codant pour la transportine 3 et localisé en 3' du gène IRF5). Les deux SNPs (rs2070197 et rs12539741) ne sont pas corrélés aux polymorphismes associés aux MICI dans notre cohorte (indel CGGGG, rs4728142, rs3807306). Ces données confortent ainsi notre théorie d'une implication du gène IRF5 dans la prédisposition génétique aux MICI.

L'indel CGGGG située au niveau du promoteur d'IRF5 montre un signal d'association particulièrement fort avec les MICI. L'allèle mineur de cette indel CGGGG correspond à l'insertion des 5pb CGGGG. Cette insertion est retrouvée à une fréquence supérieure chez les patients par rapport aux contrôles. Une copie de l'allèle mineur (à risque) est associée aux MICI avec un rapport de vraisemblance de 1.62 (1.37-1.91), alors que deux copies de cet allèle sont associées à la pathologie avec un rapport de vraisemblance de 3.03 (2.04 - 4.49).

Cet allèle d'IRF5 entraîne ainsi un risque accru de développer des MICI, MC ou RCUH, dans la population belge. Ce risque augmente avec le nombre de copies de l'allèle 4XCGGGG. Bien que nos données ne nous permettent pas d'affirmer que l'indel soit le variant causal ou qu'il soit simplement en fort déséquilibre de liaison avec celui-ci, il nous semblait important d'explorer plus en avant le rôle de cette indel CGGGG.

Nous nous sommes donc intéressés au rôle fonctionnel potentiel de cette insertion.

Selon les études *in silico* effectuées "TFSEARCH, <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html/>) (Heinemeyer, 1998) l'insertion CGGGG entraîne la création d'un site supplémentaire de fixation du facteur de transcription SP1 (Figure 33).

Une expérience de retard de migration électrophorétique a été réalisée et a permis de mettre en évidence une fixation protéique plus intense sur la sonde comprenant l'insertion (4XCGGGG) par rapport à celle ayant la délétion (3XCGGGG) (Figure 35). Bien qu'une augmentation spécifique de la fixation de la protéine SP1 n'ait pas été mise en évidence par cette technique, ces résultats confortent notre théorie. De plus, une liaison constitutive de SP1 au niveau de séquences GGCGGGG de deux autres gènes de la famille des IRFs (IRF1 et IRF4) a été rapportée (McAlexander *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2002).

Ces résultats, montrant une augmentation de fixation protéique spécifique de l'allèle à risque, et les données publiées, montrant des séquences GGCGGGG identiques au niveau des promoteurs des trois gènes (IRF1, IRF4, IRF5), plaident en faveur de notre hypothèse impliquant l'indel CGGGG comme facteur de risque pour les MICI.

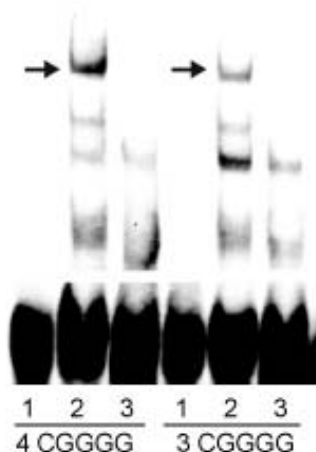


Figure 35. Retard de migration pour l'insertion/délétion CGGGG Les échantillons déposés au niveau des puits de 1 à 3 contiennent 1) la sonde 2) sonde marquée et extraits nucléaires 3) sonde marquée, extraits nucléaires et sonde non marquée (additionnée comme compétiteur avec un excès de 100X). Les bandes montrant une différence de fixation protéique sont marquées par des flèches

Ainsi, si l'insertion crée effectivement un site de fixation supplémentaire pour un facteur de transcription (par exemple SP1), on peut postuler qu'une augmentation anormale du taux de transcription d'IRF5 aboutisse à une dérégulation de la réponse immunitaire ou inflammatoire, permettant l'initiation ou la perpétuation d'une maladie intestinale inflammatoire.

Durant ces dix dernières années, les connaissances en génétique humaine et les biotechnologies ont extraordinairement évolué. Le séquençage du génome humain (Lander, 2001; Venter *et al.*, 2001) et par la suite la caractérisation et le recensement des variations génétiques (SNP consortium : <http://snp.cshl.org>, projet international HapMap : <http://hapmap.org/thehapmap.html.fr>, Database of Genomic Variants : <http://projects.tcag.ca/variation/>) ont fourni une grande quantité d'informations. De nombreuses études ont été réalisées afin de mieux comprendre le rôle de ces variants génétiques dans la prédisposition aux maladies complexes, mais également dans les différences inter-individuelles de réponse thérapeutique. Ainsi une meilleure compréhension de la génétique liée à ces phénotypes permettra la mise en place de nouvelles méthodes de prévention, de diagnostic et de traitement de ces pathologies. Cependant, nous sommes encore loin de comprendre la complexité de la variation génétique, son rôle en pharmacogénétique et dans la prédisposition aux maladies complexes.

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont des pathologies invalidantes atteignant 0,1 % de la population belge. Actuellement, aucun traitement curatif n'est disponible. En 1998, la FDA a approuvé l'utilisation de l'Infliximab dans les formes réfractaires et fistulisantes de la maladie de Crohn. Une nette amélioration clinique et histologique est mise en évidence après utilisation de cet anticorps anti-TNF- α . Cependant environ 30% des patients ne répondent pas à ce traitement, incitant à rechercher les facteurs déterminant la réponse thérapeutique.

Ce travail reprend deux volets des MICI tous deux influencés par des facteurs génétiques : 1- la variabilité de réponse à l'IFX chez les patients atteints de maladie de Crohn, 2- la prédisposition au développement de MICI. Les études réalisées nous ont permis d'apporter de nouvelles informations dans ces domaines.

I. La pharmacogénétique de la Maladie de Crohn

A. Rôles des gènes LTA et TNF dans la réponse à l'IFX.

Les gènes LTA et TNF sont situés au sein du locus du CMH, et sont hautement liés. Une étude réalisée en 2001 rapportait une association entre l'haplotype 1-1-1-1 du gène LTA et la non-réponse à l'IFX dans la maladie de Crohn. Cependant cette étude n'avait pas été confirmée sur une deuxième cohorte et comportait peu de patients. Il était par conséquent difficile d'établir des conclusions robustes quant à l'implication de ce gène dans la réponse thérapeutique. Or, par sa localisation (proche du gène TNF), il était intéressant de pouvoir déterminer le rôle exact de l'haplotype LTA 1-1-1-1. Notre étude réalisée sur une plus large cohorte de patients Crohn a permis d'exclure une implication majeure de l'haplotype LTA 1-1-1-1 dans la réponse au traitement. Nous nous sommes intéressés également à l'implication du gène TNF dans cette différence de réponse thérapeutique, étant donné le rôle direct du TNF- α dans le mécanisme d'action de l'IFX, une étude complète de ce gène nous semblait nécessaire. L'étude du gène entier nous a permis de l'exclure comme facteur majeur de prédisposition génétique à la réponse au traitement. Cette étude est jusqu'à présent la seule réalisée permettant d'exclure un gène candidat comme facteur prédictif de la réponse à l'IFX.

La taille de notre cohorte ne permet cependant pas d'exclure un effet faible pour certains variants présentant une fréquence allélique mineure plus réduite. Par conséquent, une étude d'une plus grande cohorte pourrait être envisagée. Cependant, les cohortes de patients traités par IFX ne sont pas larges et il sera donc nécessaire de mettre en place une collaboration internationale afin de pouvoir regrouper plusieurs cohortes et permettre des études de variants moins fréquents.

De plus, notre étude ne tient pas compte de l'effet potentiel de CNVs dans la réponse au traitement. Les gènes affectés par les CNVs codent principalement pour des protéines qui influencent la façon dont nous réagissons à notre environnement (Rodriguez-Revena *et al.*, 2007). Ainsi, ces CNVs pourraient avoir un rôle en pharmacogénétique et dans la prédisposition aux maladies complexes. Bien que

certains signaux d'association entre CNVs et le phénotype étudié puissent être mis en évidence par l'étude de SNPs, l'information portée par de nombreux CNVs n'est pas captée par ceux-ci (Locke *et al.*, 2006). Etant donné le rôle important des CNVs dans la variation génétique inter-individuelle, il est dès lors important de les inclure dans les études d'association réalisées à l'avenir.

Applications à d'autres pathologies

L'Infliximab est également utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Il est évidemment tentant d'extrapoler les résultats obtenus dans la MC à cette pathologie. Cependant, les mécanismes inflammatoires sous-jacents ne sont pas identiques et pourraient influencer différemment la réponse thérapeutique. Ainsi, un variant du TNF renforçant, par exemple, la liaison de l'IFX au TNF- α , pourrait ne pas influencer la réponse dans la MC et bien dans la PAR. Il est donc essentiel d'interpréter les résultats dans leur contexte clinique.

B. Implication d'ADAM17 dans la réponse à l'IFX dans la maladie de Crohn.

ADAM17 joue un rôle essentiel dans la sécrétion du mTNF- α . L'étude réalisée nous a permis de mettre en évidence un signal d'association entre l'haplotype 1-2-1-1-1-2-1-1-2-2-1 du gène ADAM17 à l'état homozygote et la réponse à l'IFX.

Afin de valider le résultat obtenu, une étude de réplication est nécessaire sur une deuxième cohorte. Cette étude de réplication pourrait se limiter, dans un premier temps, à l'étude d'un des « tag SNPs » montrant un signal dans notre cohorte.

Après réplication des résultats, une approche plus complète de la région devra être envisagée afin de déterminer si le gène impliqué est effectivement le gène ADAM17. Un séquençage du gène ADAM17 pourrait mettre en évidence le variant causal et orienter les études fonctionnelles ultérieures.

Selon le variant identifié, différentes études peuvent être envisagées, telles qu'une étude du niveau d'expression d'ADAM17 ou encore une étude de la capacité de liaison d'ADAM17 à son substrat, en fonction des génotypes.

L'identification d'un variant du gène ADAM17 impliqué dans la réponse thérapeutique pourrait, avant l'instauration du traitement, permettre l'identification de patients non répondeurs par la réalisation d'un test génétique. Cependant, la génétique de la réponse thérapeutique étant sans doute multifactorielle, l'identification des facteurs impliqués et de leur interaction est nécessaire avant d'envisager des applications cliniques.

Applications cliniques

Différentes études pharmacogénétiques ont été réalisées dans le cadre du traitement de la MC. Cependant, actuellement seul le génotypage de variants du gène TPMT (codant pour la thiopurine méthyltransférase) dans le cadre d'un traitement par thiopurine (azathioprine, mercaptopurine) est utile dans la pratique clinique. Un génotypage du gène TPMT, ou un dosage de l'activité enzymatique de sa protéine, a été recommandé par la FDA avant l'instauration d'un traitement par thiopurine afin de détecter les individus présentant une faible activité enzymatique et dès lors susceptibles de développer une myélosuppression.

Dans le cadre du traitement par Infliximab, la mesure d'un index pharmacogénétique apoptotique (API, apoptotic pharmacogenetic index) a été proposée par Hlatavy *et al.* (Hlavaty *et al.*, 2007). Cet index est basé sur le génotypage de polymorphismes au niveau de gènes impliqués dans la voie de l'apoptose (FASL_843C/T, FAS_670 G/A, et CASP9_93 C/T) et permettrait, en combinaison avec des critères cliniques, de définir des sous-groupes de patients susceptibles de répondre au traitement par IFX. Cependant, l'étude réalisée comprend un faible nombre de patients et doit être validée sur une cohorte prospective. Ainsi, après validation des résultats obtenus dans cette étude, un génotypage d'ADAM17 pourrait également être proposé de façon prospective, en combinaison avec ce score API, avec des critères cliniques ou avec le génotypage d'autres gènes encore à identifier, afin d'évaluer l'interaction

potentielle de ces facteurs et leur valeur prédictive positive. Il est fort probable que l'arbre décisionnel permettant de définir les patients susceptibles de répondre à l'IFX ou de bénéficier d'autres thérapies tiendra compte d'un ensemble de critères génétiques et cliniques.

II. Prédisposition génétique aux MICI

IRF5 et prédisposition génétique aux MICI.

Une prédisposition génétique aux MICI a clairement été démontrée. Cependant, actuellement, le répertoire des gènes prédisposant à ces pathologies n'est pas complètement déterminé et l'épistasie entre les variants impliqués reste peu explorée.

Nous avons mis en évidence une association entre des polymorphismes du gène IRF5, codant pour un facteur de transcription, et les MICI, la MC et la RCUH. Cette étude rapporte, pour la première fois, une association entre des variants génétiques et la RCUH montrant un signal supérieur à celui trouvé dans la MC et répliquée sur une seconde cohorte. Ces études ont été réalisées sur deux cohortes de patients belges. Il serait intéressant de continuer cette étude par le génotypage d'autres cohortes de patients MICI afin de confirmer ces résultats sur d'autres populations.

De plus, notre étude établit un lien entre la prédisposition génétique aux MICI et celle à d'autres maladies immunes, le LED et la PAR. Cependant, alors que deux groupes de polymorphismes semblent indépendamment associés au LED, un seul groupe est associé aux MICI. Il serait sans doute intéressant de réaliser une méta-analyse des différentes études réalisées sur ces trois pathologies afin de déterminer si un variant commun (ou un groupe de variants) apparaît comme associé à une prédisposition aux maladies immunes.

Le signal le plus fort observé dans notre étude provient d'une insertion/délétion localisée au niveau du promoteur du gène IRF5. L'allèle associé aux MICI consiste en une insertion de 5pb (CGGGG) qui pourrait créer un site supplémentaire de fixation du facteur de transcription SP1. Par une expérience de retard de migration

électrophorétique, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de fixation protéique spécifique de l'allèle a risque. Il est important de pouvoir déterminer par une expérience de supershift ou par une expérience d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP assay), la spécificité de cette liaison et la nature du complexe protéique lié à ce site. Ensuite, une étude de différence d'expression allélique pourrait être envisagée afin de déterminer si l'insertion entraîne spécifiquement une augmentation de l'expression d'IRF5. Afin de déterminer les implications de cette surexpression d'IRF5, une étude par microarray sur des lymphocytes d'individus homozygotes pour l'insertion versus homozygotes pour la délétion pourrait mettre en évidence une différence de profil d'expression de différentes protéines impliquées en aval d'IRF5.

Applications cliniques

Actuellement, plusieurs gènes prédisposant à la maladie de Crohn ont été identifiés. Cependant, aucune application clinique n'est actuellement envisageable. En effet, le risque relatif décrit pour les différents gènes identifiés reste faible. Même pour CARD15, le gène associé au risque relatif le plus élevé, avec un risque 20 à 40 fois supérieur chez les individus porteurs de 2 mutations (homozygotes ou hétérozygotes composites), aucun test diagnostique ne peut être proposé. En effet, les mutations CARD15 sont retrouvées dans 20% de la population générale, un individu porteur d'une mutation ne présentera donc pas nécessairement de MC. Surtout, aucune action préventive ne peut être actuellement proposée aux patients à haut risque de développer la pathologie, si ce n'est des mesures anti-tabac.

Il est dès lors essentiel d'intégrer les différents génotypes à risque provenant des gènes actuellement identifiés, afin de pouvoir déterminer leurs interactions potentielles et l'influence de celles-ci sur le risque de développer la maladie. De même leur rôle dans différents sous-phénotypes tels que MC ou RCUH, développement de manifestations extra-intestinales ou agressivité de la pathologie devrait être définie. Au terme de telles études, un test diagnostique ou pronostique

basé sur un génotypage de plusieurs gènes et sur des données environnementales pourrait voir le jour.

Une conséquence plus directe de l'identification des gènes impliqués dans les MICI est d'apporter une meilleure compréhension de la physiopathologie des MICI. Ceci a notamment été démontré par la découverte de CARD15, qui montre l'importance de l'immunité innée dans la MC. Notre étude conforte cette implication étant donné le rôle d'IRF5 dans la défense de l'hôte contre les pathogènes et dans la réponse immunitaire innée.

Une meilleure connaissance de ces pathologies pourra probablement contribuer à établir des mesures préventives pour ces pathologies et à développer de nouveaux traitements ciblés et spécifiques.

Par exemple, l'identification récente d'un variant rare (rs11209026) du gène IL23R, protégeant de la MC (Duerr *et al.*, 2006), pourrait aboutir au développement de thérapies ciblées contre ce récepteur de l'interleukine 23 ou contre des composants de la voie de signalisation IL23-IL23R. En effet, des souris knock-out pour le gène IL23 ont montré que celui-ci était essentiel à l'apparition d'une inflammation intestinale (Yen *et al.*, 2006).

De même, la voie de signalisation TLRs-IRF5 pourrait être la cible d'agents thérapeutiques. Des souris knock-out pour le gène IRF5 (*Irf5*^{-/-}) sont résistantes au choc léthal induit par le lipopolysaccharide (LPS) et montrent des taux sériques de cytokines proinflammatoires abaissés. De plus, une fixation d'IRF5 au motif ISRE du gène IL-12p40 a été mise en évidence après stimulation des TLRs (Takaoka *et al.*, 2005). La sous-unité protéique p40 peut former un hétérodimère avec p35 pour former l'IL12 ou avec la sous-unité p19 pour former l'IL23. Ainsi, IRF5 est très certainement impliqué dans la voie de signalisation de l'IL23 et pourrait être une des cibles thérapeutiques de cette voie.

Etant donné l'implication d'IRF5 dans différentes pathologies immunitaires, LED et PAR, l'extension à d'autres pathologies de drogues ayant pour cible IRF5 pourrait être envisagée.

En conclusion, les MICI, comme d'autres pathologies complexes, sont aujourd'hui le sujet de très nombreuses recherches génétiques et pharmacogénétiques. Les

progrès récents en biotechnologies, génétique et bioinformatique ont permis des avancées significatives dans ces domaines de recherche au cours de ces dernières années. La découverte des facteurs génétiques associés à ces pathologies et à leur thérapeutique s'accélère. Cependant, les retombées cliniques de ces recherches restent aujourd'hui limitées. Au cours des années à venir il conviendra de confirmer ces multiples résultats et surtout de les intégrer au sein de modèles prédictifs tenant compte des facteurs génétiques et environnementaux. Ensuite, la faisabilité et le coût/bénéfice d'un screening multigénique des patients à risque, en fonction des antécédents familiaux, devront être évalués avant de pouvoir proposer, soit un suivi adéquat, soit des mesures de médecine préventive aux sujets porteurs d'allèles de prédisposition. De plus, dans les meilleurs des cas, un diagnostic précoce et précis (identification de sous-types), associé à une étude pharmacogénétique, pourrait définir l'approche thérapeutique la mieux adaptée et la plus économique. De nombreuses études, obligatoirement larges, multidisciplinaires et multicentriques, sont donc requises avant que les patients ne puissent concrètement bénéficier de tels travaux.

