



**HAL**  
open science

# Recherche de nouvelles mutations génétiques à effet majeur dans la maladie de Crohn

Sara Frade Proud'Hon-Clerc

► **To cite this version:**

Sara Frade Proud'Hon-Clerc. Recherche de nouvelles mutations génétiques à effet majeur dans la maladie de Crohn. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2019. Français. NNT : 2019LILUS016 . tel-02465045

**HAL Id: tel-02465045**

**<https://theses.hal.science/tel-02465045>**

Submitted on 3 Feb 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

École doctorale Biologie Santé de Lille

# THÈSE de DOCTORAT

pour obtenir le grade de docteur délivré par

## **l'Université de Lille - Communauté d'Universités et d'Établissements Lille Nord de France**

**Discipline doctorale "Recherche Clinique, Innovation Technologique,  
Santé Publique"**

**Spécialité doctorale "Génétique"**

*présentée et soutenue publiquement par*

**Sara FRADE PROUD'HON-CLERC**

le 12 septembre 2019

## **Recherche de nouvelles mutations génétiques à effet majeur dans la maladie de Crohn**

Directeur de thèse : **Francis VASSEUR**

### **Jury**

<b>Mme Mouna BARAT-HOUARI,</b>	Maitre de conférence
<b>M. Jean-Pierre HUGOT,</b>	Professeur
<b>M. Edouard LOUIS,</b>	Professeur
<b>M. Xavier TRETON,</b>	Professeur

EA 2694, 1 Place Verdun, 59045 Lille

---

---

---

## Résumé

### Résumé :

Le gène *NOD2*, impliqué dans les réponses immunitaires innées contre le peptidoglycane bactérien, est étroitement associé à la maladie de Crohn (MC) avec des Odds Ratio (OR) allant de 3 à 36 selon le génotype et a été initialement identifié par des analyses de liaisons génétiques. Les données des familles multiplexes (familles définies par la présence de trois ou plus de trois apparentés au premier degré atteints de MC) issues du registre EPIMAD ont été analysées. Il a été précédemment rapporté que dans les 22 familles multiplexes EPIMAD génotypées pour les 3 mutations majeures du gène *NOD2* une fréquence élevée de ces mutations du gène *NOD2* : R702W, G908R et L1007fs, pouvait expliquer la fréquence élevée de MC dans ces familles. Cependant, quelques familles multiplexes EPIMAD ne présentaient aucune de ces mutations R702W, G908R et L1007fs. Afin d'identifier de nouvelles variations génétiques ayant un effet majeur dans la MC, un protocole de Whole Exome Séquencing (WES) a été effectué sur l'une de ces familles multiplexes EPIMAD (F49M) présentant quatre sujets atteints de MC sur deux générations. Une variation rare du gène *NOD2*, N1010K, s'est avérée présente chez tous les patients atteints et absente chez tous les sujets contrôles intrafamiliaux. L'évaluation *in silico* et la modélisation 3D ont mis en évidence un effet délétère hautement probable de la mutation de N1010K suggérant donc fortement qu'elle pourrait être un nouveau facteur de risque majeur impliqué dans la susceptibilité génétique à la maladie de Crohn. Elle pourrait expliquer l'agrégation familiale de la MC dans la famille analysée. La présence d'une maladie plus sévère chez les patients hétérozygotes composites N1010K/L1007fs plaide en faveur de l'effet délétère de la mutation N1010K.

En plus de la caractérisation d'une nouvelle mutation rare du gène *NOD2*, 2 autres variants potentiels ont été identifiés : les mutations D359H et G33V respectivement des gènes *BPIFB2* et *DEFB132*. Les protéines codées par ces gènes sont impliquées dans les mêmes voies de signalisation : la voie de signalisation des défensines ainsi que dans celle du système immunitaire inné. L'évaluation *in silico* des effets de ces mutations a mis en évidence un effet délétère hautement probable pour D359H et G33V des gènes *BPIFB2* et *DEFB132*. Ainsi, on peut supposer que bien que les deux mutations D359H du gène *BPIFB2* et G33V du gène *DEFB132*, soient localisés sur deux gènes différents impliqués dans les mêmes voies de signalisation, elles pourraient agir ensemble et conduire à un effet dysfonctionnel cumulatif impliqué également dans l'agrégation familiale de la MC dans la famille F49M.

---

Ainsi, Pour la famille F49M, l'agrégation familiale pourrait reposer sur l'accumulation de plusieurs mutations à effet délétère (N1010K, D359H et G33V).

**Mots clés :**

Maladie de Crohn; gène *NOD2*; mutations; WES

---

# Research of new major genetic mutations in Crohn's disease

## **Abstract :**

The *NOD2* gene, involved in innate immune responses, has been found to be highly associated with Crohn's Disease (CD). EPIMAD multiplex families with three or more CD-affected members were previously reported to be related to a high frequency of *NOD2* gene mutations : R702W, G908R, and L1007fs. However, some rare EPIMAD CD multiplex families were described without any of the common *NOD2* linked-to-disease mutations. In order to identify new genetic variation(s) with a major effect in CD, whole exome sequencing was performed on available subjects in a multiplex family (F49M), without known common *NOD2* mutations and comprising four patients affected with Crohn's disease and three unaffected related subjects on two generations . A rare and, not yet, reported missense mutation of the *NOD2* gene, N1010K, was detected and co-segregated across affected patients (present in all members affected with CD and absent in all unaffected familial control subjects). *In silico* evaluation of the deleterious effect of the mutation and 3D modelling highlighted evidences for an adverse effect of the N1010K mutation with regard to the function of the NOD2 protein and the genetic risk of CD. Moreover, N1010K and L1007fs as a compound heterozygous state in two, more severe CD family members strongly suggests that N1010K could be a new risk factor involved in Crohn's disease genetic susceptibility.

In addition to the characterization of a new rare mutation of the *NOD2* gene, 2 other potential variants have been identified : the D359H and G33V mutations, respectively, in the *BPIFB2* and *DEFB132* genes. The proteins encoded by these genes are involved in the same pathways : the pathway of defensins and the pathway of the innate immune system. *In silico* evaluation of the deleterious effect of mutations revealed a potential deleterious effect of D359H and G33V mutations. Thus, we could hypothesize that although the two mutations D359H and G33V are located on two different genes but involved in the same signaling pathways, they could act together and determine a cumulative dysfunctional effect also involved as determinants of the familial aggregation of Crohn's disease in family F49M.

Thus, for the F49M family, familial aggregation could be based on the accumulation of several deleterious mutations (N1010K, D359H and G33V).

## **Keywords :**

Crohn's disease; *NOD2* gene; variation; WES

---

---

## **Remerciements :**

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement l'ensemble des membres du jury, Mouna BARAT-HOUARI, Jean-Pierre HUGOT, Edouard LOUIS, Xavier TRETON, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie aussi très sincèrement Laurent BEUGERIE et Xavier TRETON d'avoir accepté d'être pré-rapporteurs de ce travail.

Je remercie aussi chaleureusement Corinne GOWER-ROUSSEAU, Jean-Pierre HUGOT, Dominique TURCK, Frédéric GOTTRAND, Alain DUHAMEL d'avoir accepté de faire partie de mes comités de suivi de thèse. Vous étiez partis pour 2 CST et finalement vous en avez fait 5... Encore merci à vous pour tous vos conseils et votre grand soutien.

Je remercie Alain DUHAMEL qui a accepté de m'accueillir dans son équipe de recherche pour la réalisation de ce travail de thèse.

Je tiens à remercier particulièrement Corinne GOWER-ROUSSEAU pour avoir fait renaître mon envie d'obtenir le grade de docteur en sciences et qui avec Francis VASSEUR m'ont donné ma chance (malgré mon grand âge :-)) et pour votre amitié sincère.

Encore un très très grand merci à Francis qui a été un formidable Directeur de thèse. Merci pour tes conseils, ta patience, ton endurance (et oui tu as dû me supporter pendant 6 ans et ce n'est pas fini :-)), les resto, les rires... Bref merci pour tout ça, tu m'as réconcilié avec la thèse et la recherche.

Merci à toute l'équipe du registre EPIMAD : Nathalie GUILLON-DELLAC qui a inclus tous les patients de l'étude (tu as même bravé la neige pour mon travail), Isabelle ROUSSEAU qui suit les familles exceptionnelles depuis plus de 20 ans et qui a tissé un lien avec elles. Merci à toutes les deux.

Merci à Chantale LOUCHET et Betty SCHOEMAECCKER, infirmières au CIC qui ont effectué tous les prélèvements.

Merci à tous ceux qui ont collaboré sur ce travail, Véronique DHENNIN (tu as toujours répondu présente), Olivier SAND (pour ta patience et tes explications), Frédéric FRENOIS (sans la 3D rien n'aurait été pareil), Emmanuelle DURAND, Emmanuel VAILLANT et Amélie BONNEFOND.

Je tiens à remercier particulièrement Thomas SMOL qui a supporté mes "harcèlements" téléphoniques avec le sourire. Encore merci pour tous tes conseils et ta bonne humeur.

---

Je remercie la direction de la Recherche et de l'Innovation du CHU de Lille de m'avoir permis de réaliser ma thèse en parallèle de mon activité professionnelle.

Je remercie le Professeur PARIS et l'association de l'Etude des Anomalies Congénitales (AEAC) pour le financement de ce travail.

Je remercie aussi tous les patients et les familles qui ont accepté de participer au protocole MC-WES, sans qui ce travail n'aurait pas été possible.

Merci aussi à toute mon équipe 3I-TS pour votre patience et votre amitié.

Un tout grand merci à ma collègue et amie Laetitia DELASSUS de m'avoir supportée pendant ces années. Merci aussi à Marie DE SOLERE de m'avoir supportée sur la fin. Sans vous ces années auraient été bien tristes.

Merci, merci Virginie LECHEVIN de m'avoir poussée dans ce projet, je n'ai pas oublié ta phrase "je te préviens, si tu arrêtes avant la fin, tu auras à faire à moi!". Elle m'a tenu dans les moments difficiles. Merci pour ta longue amitié qui m'est chère.

Et pour finir, un énorme merci à ma famille. Josette et James qui ont beaucoup pris mon relais pendant ces 6 années. Bien sûr, mon cher et tendre Sébastien qui m'a soutenu, qui a pris en charge la logistique de notre famille et qui a toujours été là pour moi. Merci à mes enfants, Matéo et Elora, d'avoir compris que parfois je ne pouvais pas être disponible pour eux.

Merci, merci à tous, grâce à vous je suis vraiment fier de moi!

# Table des matières

<b>Table des matières</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>ix</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>xi</b>
<b>1 Introduction générale</b>	<b>1</b>
1.1 La Maladie de Crohn . . . . .	3
1.2 Système immunitaire intestinal, Inflammation et Maladie de Crohn . . . . .	13
1.3 Rôle de NOD2 . . . . .	21
1.4 Justification et objectif de la thèse . . . . .	30
1.5 Références . . . . .	31
<b>2 Sujets, matériels et méthodes</b>	<b>51</b>
2.1 Sujets . . . . .	52
2.2 Whole Exome Sequencing et analyses bio-informatiques . . . . .	55
2.3 Séquençage Sanger : Confirmation des variants <i>NOD2</i> . . . . .	55
2.4 Prédictions structurelles : NOD2 . . . . .	56
2.5 Prédictions et annotations <i>in silico</i> . . . . .	58
2.6 Références . . . . .	58
<b>3 Résultats</b>	<b>61</b>
3.1 Caractérisation d'une nouvelle variation du gène <i>NOD2</i> . . . . .	62
3.2 Autres variations génétiques retrouvées dans la famille F49M . . . . .	67
3.3 Références . . . . .	72
<b>4 Discussion et perspectives</b>	<b>73</b>
4.1 Caractérisation d'une nouvelle variation du gène <i>NOD2</i> . . . . .	74
4.2 Autres mutations génétiques retrouvées dans la famille F49M . . . . .	76
4.3 Conclusion générale . . . . .	79
4.4 Références . . . . .	80

<b>A Annexes</b>	<b>I</b>
A.1 Publication dans International Journal of Molecular Sciences, Impact Factor : 4.183 . . . . .	I
A.2 Protocole MC-WES . . . . .	III
A.3 Autorisations réglementaires . . . . .	LIII
<b>B Liste des acronymes</b>	<b>LVII</b>
<b>C Glossaire</b>	<b>LIX</b>

# Liste des figures

1.1	Incidence et/ou prévalence mondiales Pour la maladie de Crohn, des pays pour lesquels des données sont disponibles (A) avant 1960, (B) de 1960 à 1979 et (C) après 1980. MOLODECKY et collab. [2012]	4
1.2	Incidence mondiale de la maladie de Crohn entre 1990 et 2016. Carte de l'incidence mondiale en quintiles. NG et collab. [2018]	5
1.3	Phenotype de la Maladie de Crohn : classification de Montreal. BAUMGART et SANDBORN [2012]	8
1.4	Interaction entre génétique, immunologie, environnement et microbiome dans l'étiologie de la maladie de Crohn (MC). ANANTHAKRISHNAN [2015]	12
1.5	Schéma simplifié de l'immunité innée intestinale d'après BAUMGART et SANDBORN [2012]. G : Cellule de Goblet, M : cellule M, P : cellule de Paneth	13
1.6	Schéma simplifié de l'immunité adaptatrice intestinale d'après BAUMGART et SANDBORN [2012].	15
1.7	Différentiation des Lymphocytes T et production des cytokines.	17
1.8	Aperçu du système immunitaire intestinal chez les sujets en bonne santé ou atteints de la maladie de Crohn d'après TORRES et collab. [2017]	18
1.9	Structure de la protéine NOD2 et position des mutations majeures associées à la MC.	22
1.10	Structures reconnues par NOD1 et NOD2. MACHO FERNANDEZ et collab. [2011]	23
1.11	Représentation schématique des voies de signalisation et des régulateurs de NOD2. DE BRUYN et VERMEIRE [2017]	24
1.12	Roles de NOD2 à l'homeostasie d'après DE BRUYN et VERMEIRE [2017]	26
1.13	Roles de NOD2 dans la maladie de Crohn d'après DE BRUYN et VERMEIRE [2017]	28
2.1	Arbre généalogique de la famille multiplexe EPIMAD F49M	53
2.2	Prévision structurale de la protéine NOD2 humaine native (acides aminés 219 à 1040).	57
2.3	Identification des carbones $\alpha$ dans une structure protéique).	57

---

3.1	(A) Arbre génétique de la famille F49M présentant le ségrégation des mutations c.3030A> C; p.(N1010K) et c.3019dupC; p.(L1007fs). (B) Chromatogrammes pour la région codante de <i>NOD2</i> dans l'exon 11. . . . .	63
3.2	(A) Localisation des mutations p.R702W (rs2066844), p.G908R (rs2066845), p.L1007fs (rs2066847) et p.N1010K modifiant la protéine <i>NOD2</i> . (B) Alignements et conservation des acides aminés des protéines <i>NOD2</i> chez 11 espèces. . . . .	64
3.3	Prévisions structurelles de la protéine humaine native <i>NOD2</i> (acides aminés 219 à 1040) et des protéines humaines mutées <i>NOD2</i> . . . . .	66
3.4	Modes d'action de <i>NLRP7</i> dans l'inflammation et la défense de l'hôte d'après <b>RADIAN et collab. [2013]</b> . . . . .	71
4.1	Structure 3D de la protéine <i>BIPFB2</i> . D'après <b>MULERO et collab. [2002]</b> . . . . .	78
4.2	Structure de la protéine <i>NLRP7</i> et position de la mutation I368M, d'après <b>SILLS et collab. [2017]</b> . . . . .	79

# Liste des tableaux

1.1	Incidence et Prevalence de la MC, stratifiées en quintiles, MOLODECKY et collab. [2012]	3
1.2	Prévalence de la maladie de Crohn au cours du temps dans le comté d'Olmsted, au Minnesota	7
2.1	Classification de Montréal au diagnostic des patients. L1, atteinte de l'intestin grêle; L2, atteinte colonique; L3, atteinte iléo-colonique; B1, non fistulisante et non sténosante; B2, sténosante; B3, Fistulisante.	54
2.2	Amorces utilisées dans les réactions de polymérisation en chaîne pour l'amplification de <i>NOD2</i> XIANG et collab. [2012]	56
2.3	Prédiction en fonction du score de PolyPhen2	58
3.1	Comparaison des fréquences et des valeurs des indicateurs de prédiction de la mutation N1010K avec les mutations connues associées à la MC : R702W et G098R. Indicateurs de prédiction <i>in silico</i> des effets délétères des mutations de <i>NOD2</i> . NA = Non Applicable car les outils <i>in silico</i> ne traitent que les mutations faux-sens et pas les mutations insertion/délétion.	65
3.2	Liste des variants identifiés par l'analyse des résultats du Whole Exome Sequencing (WES).	68
3.3	Indicateurs de prédiction <i>in silico</i> des effets délétères des mutations des gènes <i>BPIFB2</i> , <i>DEFB132</i> et <i>NLRP7</i> .	69
4.1	Comparaison de la mutation N1010K avec les mutations connues associées à la MC : R702W et G098R. Indicateurs de prédiction <i>in silico</i> des effets délétères des mutations de <i>NOD2</i> .	75



# Chapitre 1

## Introduction générale

*« Ils ont réussi car ils ne savaient pas que c'était impossible. »*

---

Mark Twain

### Sommaire

---

<b>1.1 La Maladie de Crohn</b> . . . . .	<b>3</b>
1.1.1 Epidémiologie . . . . .	3
1.1.2 Physiopathologie . . . . .	7
1.1.3 Etiologie . . . . .	9
1.1.3.1 Facteurs génétiques . . . . .	9
1.1.3.2 Facteurs environnementaux . . . . .	10
1.1.3.3 Le microbiote . . . . .	10
<b>1.2 Système immunitaire intestinal, Inflammation et Maladie de Crohn</b> . .	<b>13</b>
1.2.1 Système immunitaire intestinal . . . . .	13
1.2.1.1 Immunité innée . . . . .	13
1.2.1.2 Immunité adaptative . . . . .	15
1.2.2 Maladie de Crohn et dérégulation du système immunitaire intestinal	18
1.2.2.1 Dérégulation de l'immunité innée . . . . .	18
1.2.2.2 Dérégulation de l'immunité adaptative . . . . .	20
<b>1.3 Rôle de NOD2</b> . . . . .	<b>21</b>
1.3.1 La famille des NLR (NOD-like receptors) . . . . .	21
1.3.2 Rôles de NOD2 dans des conditions physiologiques . . . . .	21
1.3.2.1 Reconnaissance du peptidoglycane par NOD2 . . . . .	21
1.3.2.2 Voies de signalisation et régulation . . . . .	23
1.3.2.3 Fonctions homéostatiques . . . . .	25
1.3.3 Conséquences des mutations du gène <i>NOD2</i> dans la maladie de Crohn . . . . .	27

1.3.3.1 mutations du gène <i>NOD2</i> . . . . .	27
1.3.3.2 Conséquences fonctionnelles des mutations du gène <i>NOD2</i>	28
<b>1.4 Justification et objectif de la thèse . . . . .</b>	<b>30</b>
<b>1.5 Références . . . . .</b>	<b>31</b>

---

## 1.1 La Maladie de Crohn

Les **Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI)** sont des maladies chroniques caractérisées par la présence de lésions inflammatoires pouvant toucher tout ou une partie de l'appareil digestif. La **MC** et la **rectocolite hémorragique (RCH)** sont les deux principales formes de **MICI**.

La **MC** résulterait de l'interaction de facteurs environnementaux, y compris le microbiote intestinal, avec le système immunitaire de l'hôte, chez des individus prédisposés génétiquement **QIN [2012]**.

### 1.1.1 Epidémiologie

La première description de la **MC** date de 1932 par Burrill Bernard Crohn, Leon Ginzburg et Gordon Oppenheimer **CROHN et collab. [1932]**. Initialement, la **MC** était considérée comme une maladie rare en Europe et en Amérique du Nord avec une incidence moyenne inférieure à 1/100 000 au début du XX<sup>e</sup> siècle **MOLODECKY et collab. [2012]**. Aujourd'hui la **MC** toucherait environ 850 000 personnes en Europe et 150 000 en France.

La figure 1.1 et le tableau 1.1 montrent l'augmentation de l'incidence de la **MC tout au long du siècle dernier** dans les pays industrialisés. **La figure 1.1** présente le taux d'incidence de la **MC** divisé en quintiles; les couleurs froides représentant les taux les plus faibles et les couleurs chaudes, les incidences les plus élevées (le détail de la légende est présentée dans le tableau 1.1). Il existe une grande variation de l'incidence et de la prévalence de la **MC** en fonction de la région géographique, de l'environnement et de l'origine ethnique de la population **GAJENDRAN et collab. [2012]**; **MALIK [2015]**. En effet, on observe que l'incidence de la **MC** est plus élevée dans les pays du Nord (industrialisés) : Europe, Amérique du Nord; par rapport aux pays émergents : Asie, Afrique, Amérique du Sud. Ce gradient est bien réel et n'est pas seulement dû à l'amélioration des diagnostics et à l'accès aux soins.

TABLEAU 1.1 – Incidence et Prevalence de la **MC**, stratifiées en quintiles, **MOLODECKY et collab. [2012]**

Stratification (percentile)	Incidence par 100,000	Prevalence par 100,000
0 to 19th (dark blue)	0.0-0.80	0.6-6.75
20th to 39th (light blue)	0.81-1.94	6.76-25.0
40th to 59th (green)	1.95-3.76	25.1-48.0
60th to 80th (yellow)	3.77-6.38	48.1-135.6
80th to 100th (red)	6.39-29.3	135.7-318.5

Cependant, depuis les années 1980, cette distinction géographique tend à s'atténuer **NG et collab. [2018]**. **La figure 1.2** montre l'évolution de l'incidence de la **MC entre 1990 et 2016**. L'incidence, dans les pays occidentaux, pour les patients adultes, semble s'être

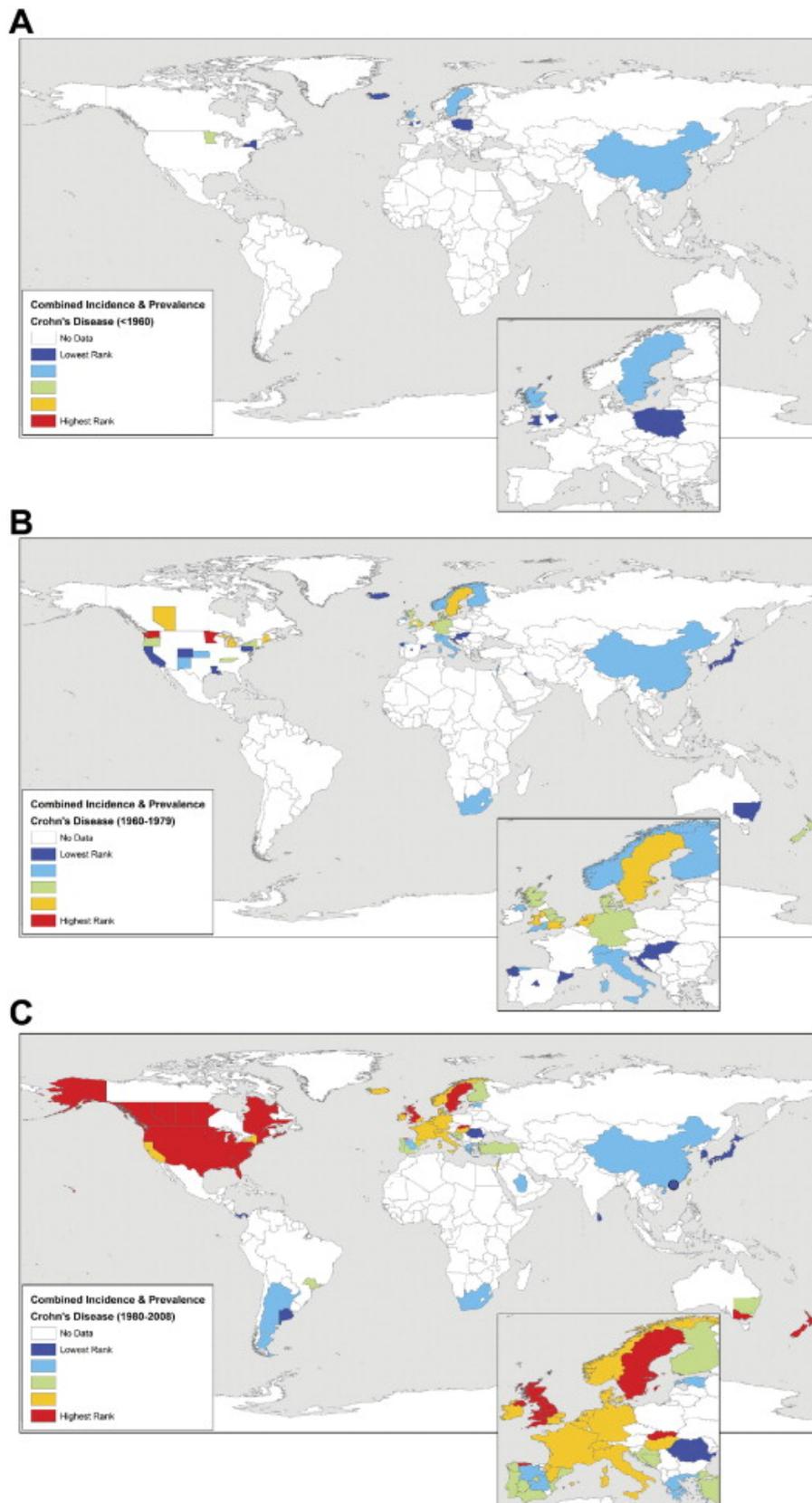


FIGURE 1.1 – Incidence et/ou prévalence mondiales Pour la maladie de Crohn, des pays pour lesquels des données sont disponibles (A) avant 1960, (B) de 1960 à 1979 et (C) après 1980. **MOLODECKY et collab. [2012]**

stabilisée alors qu'elle augmente dans le sud de l'Australie, la Nouvelle Zélande et tous les pays vers l'Est, de la Pologne au Japon [GEARRY et collab. \[2006\]](#); [WILSON et collab. \[2010\]](#).

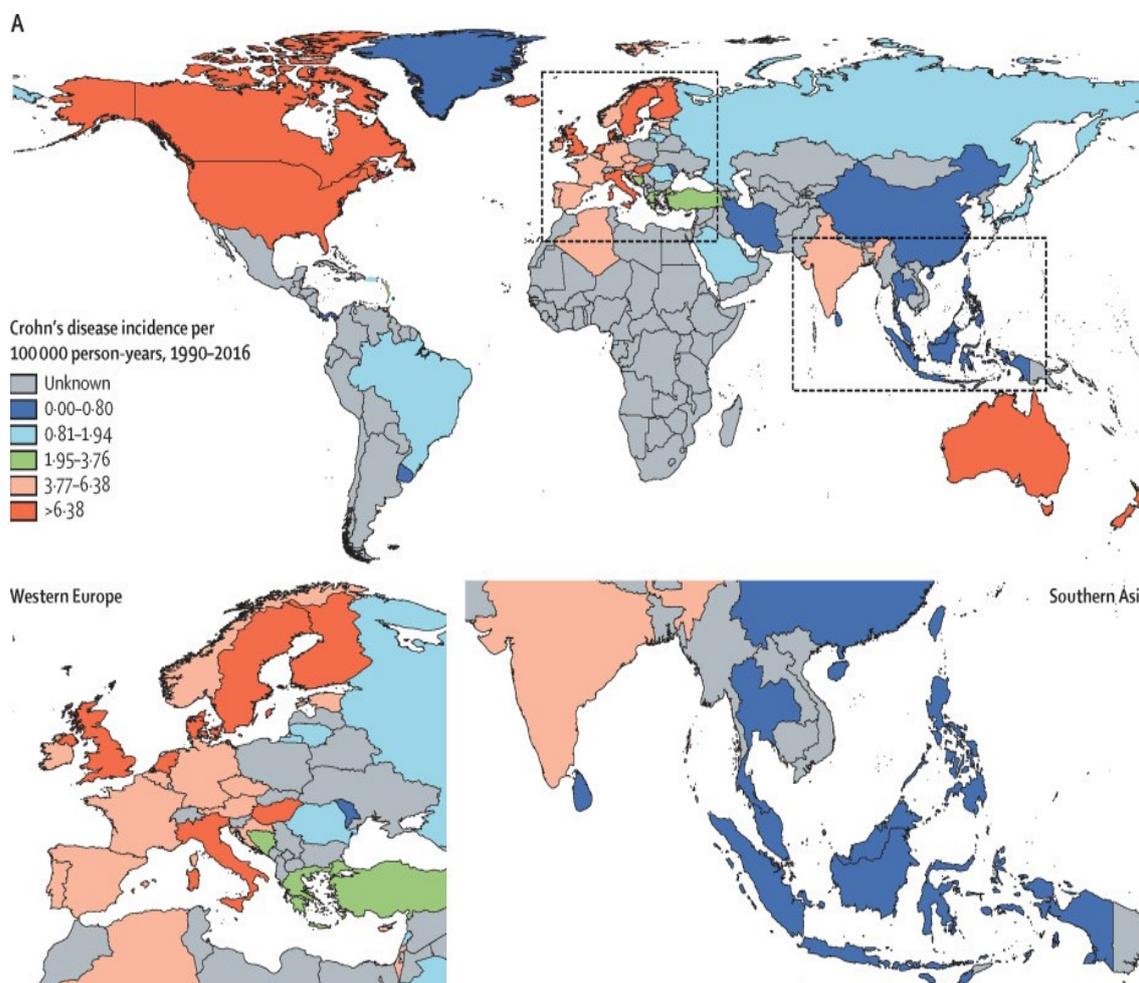


FIGURE 1.2 – Incidence mondiale de la maladie de Crohn entre 1990 et 2016. Carte de l'incidence mondiale en quintiles. [NG et collab. \[2018\]](#)

La plupart des études publiées concerne la population caucasienne. Plusieurs études comparant l'incidence en fonction de l'origine ethnique montrent qu'elle est plus élevée dans les populations dites "blanches". Cependant l'incidence dans les populations d'Amérique du Sud, d'Afrique et d'Asie, initialement plus faible, augmente [HOU et collab. \[2009\]](#) :

- pour les populations d'Amérique du Sud (Puerto Rico), l'incidence annuelle entre 1996 et 2000 augmente de 0,49/100 000 à 1,96/100 000 [APPLEYARD et RIOS BEDOYA \[2004\]](#).
- pour les populations d'Asie (Corée du Sud), l'incidence annuelle augmente entre 1986 et 2005 de 0,22/100 000 à 3.62/100 000 [YANG et collab. \[2008\]](#).

La variation de l'incidence dans ces pays pourrait être expliquée, en partie, par la présence de facteurs de risques différents et/ou un accès aux soins plus difficile par rapport aux pays occidentaux [KAPLAN \[2015\]](#); [KAPLAN et NG \[2017\]](#). Il est important de noter que les nouveaux pays industrialisés ont connu une plus grande urbanisation, avec un dépla-

cement des populations des zones rurales vers les villes. Par exemple, en Chine, il a été montré que la variation de l'incidence de la maladie peut être corrélée avec la densité de population [NG et collab. \[2016\]](#). Ainsi, l'émergence de la MC a suivi l'industrialisation et l'occidentalisation de la société [KAPLAN et NG \[2017\]](#).

Depuis le début des études d'épidémiologie des MICI, il a été observé que le risque de développer ces maladies, pour les populations juives ashkénazes est de 2 à 4 fois plus élevé que pour les populations non juives ([YAN et collab. \[2008\]](#)). Ceci peut être expliqué par l'observation d'une fréquence plus élevée des mutations du gène *NOD2* (facteur de risque génétique majeur qui sera étudié plus loin) chez ces populations juives ashkénazes ([AFZALI et CROSS \[2016\]](#); [BONEN et CHO \[2003\]](#); [KARBAN et collab. \[2007\]](#)). Il est aussi intéressant de noter que les populations juives américaines et européennes présentent des taux d'incidence plus élevés que ceux des Juifs ashkénazes résidant en Israël [ANANTHAKRISHNAN \[2015\]](#).

Nous avons vu plus haut, qu'actuellement l'incidence de la MC semble stabilisée dans les population occidentales, mais ces résultats proviennent d'études effectuées sur une population adulte. Or chez les enfants et les adolescents, l'incidence de la MC augmente, comme observé en Suède ([HILDEBRAND et collab. \[2003\]](#); [MALMBORG et collab. \[2013\]](#)) et en France ([AUVIN et collab. \[2005\]](#); [GHIONE et collab. \[2018\]](#)). De nombreux facteurs ont été proposés pour expliquer cette augmentation de l'incidence chez les enfants et les adolescents comme par exemple les facteurs environnementaux, les habitudes alimentaires ou encore l'hygiène. Cependant, toutes les études d'association de la MC avec ces différents facteurs ne sont actuellement principalement effectuées que chez les sujets adultes. Une étude s'est penchée sur le facteur "origine ethnique" des populations, entre autre pédiatriques, issues de l'immigration à Ontario au Canada [BENCHIMOL et collab. \[2009\]](#). Cette étude montre que l'incidence des MICI à Ontario dans la population pédiatrique a augmenté principalement après 2001. Or la proportion d'immigrants originaires d'Asie du Sud a plus que doublée entre 1981 et 2000 à Ontario. Les auteurs supposent donc que cette augmentation de l'incidence, chez les enfants de migrants, pourrait s'expliquer par l'exposition à un changement environnemental et non pas par l'origine ethnique des migrants. D'autres études ont aussi montré que des populations émigrants de régions à faible prévalence (Asie) vers une région à forte prévalence (Angleterre), voient augmenter leur risque de développer une MC [BERNSTEIN et SHANAHAN \[2008\]](#).

L'influence des facteurs génétiques de risque de maladie de Crohn a été fortement suggérée par des études rapportant que chez les jumeaux le risque de développer une MC est 95 à 388 fois plus élevé chez les jumeaux monozygotes et 42 à 72 fois chez les jumeaux dizygotes, par rapport au risque dans la population générale [SANTOS et collab. \[2018\]](#). Ceci a été confirmé par une étude de population danoise [MOLLER et collab. \[2015\]](#). De plus, plusieurs études, dont une étude sur la cohorte pédiatrique scandinave ([PERMINOW et collab. \[2009\]](#); [SHAH et collab. \[2018\]](#)), montrent que le risque de développer une MC est augmenté lorsque un apparenté au premier degré est atteint. Cette même étude

montre le rôle du sexe : avant la puberté les garçons diagnostiqués sont plus nombreux alors qu'à 15 ans une bascule se produit et les filles diagnostiquées deviennent plus nombreuses. Une étude Française en population générale, basée sur les données du registre EPIMAD (BEQUET et collab. [2017]) suggère que les MICI diagnostiquées chez l'enfant de moins de 6 ans (very-early-onset) seraient probablement d'origine génétique, voire monogénique (BIANCO et collab. [2011]) et leur incidence resterait stable, alors que les MICI diagnostiquées chez l'enfant de 6 à 16 ans (Later-onset) seraient multifactorielles avec une forte susceptibilité génétique (Vasseur F. communication personnelle) associée à des déterminants d'origine environnementale. On peut donc considérer que la MC d'origine multifactorielle chez l'enfant au dessus de 6 ans, présente une susceptibilité génétique plus élevée que chez les formes d'apparition adulte. Mais cette susceptibilité génétique n'a pas varié au cours des dernières générations (Equilibre de Hardy Weinberg) et la génétique n'explique donc pas l'augmentation de l'incidence de MC chez l'enfant.

Malgré la stagnation du taux d'incidence de la MC dans les pays occidentaux, comme vu plus haut, la prévalence de celle-ci continue d'augmenter considérablement dans le monde entier MOLODECKY et collab. [2012]. Etant donné que la MC est une maladie chronique avec une mortalité relativement faible et qu'elle est diagnostiquée principalement chez les jeunes, la prévalence augmente avec le temps. Le tableau 1.2 montre les résultats d'études effectuées dans le comté d'Olmsted, au Minnesota, qui en sont un exemple.

TABLEAU 1.2 – Prévalence de la maladie de Crohn au cours du temps dans le comté d'Olmsted, au Minnesota

Année	Prevalence	Sources
1965	28/100 000	SEDLACK et collab. [1972]
1980	90,5/100 000	SEDLACK et collab. [1980]
1991	132,7/100 000	LOFTUS JR. et collab. [1998]
2001	213,9/100 000	LOFTUS et collab. [2007]
2011	246,7/100 000	SHIVASHANKAR et collab. [2017]

En conclusion, l'épidémiologie de la MC est complexe. Il existe une grande hétérogénéité de l'incidence et de la prévalence de la maladie de Crohn au niveau mondial. Afin de mieux les appréhender, il faudrait effectuer des études dans les pays du Sud. Ces futures découvertes permettraient d'améliorer nos connaissances sur les causes de la maladie et profiteraient non seulement aux pays nouvellement industrialisés, mais aussi au niveau mondial.

### 1.1.2 Physiopathologie

La MC est une maladie inflammatoire chronique touchant tout ou une partie du tube digestif (de la bouche à l'anus). L'âge moyen au diagnostic est de 26 ans, et 8 à 10 % sont des cas pédiatriques (âge < 17 ans) DURICOVA et collab. [2017].

Les symptômes les plus courants sont : des douleurs abdominales, des diarrhées durant

plus de 3 semaines, une altération de l'état général avec une perte de poids et une asthénie importante. Ces symptômes varient en fonction de la localisation de la maladie, de la sévérité de l'inflammation, de la forme de la maladie et de l'âge du patient. En effet, chez l'enfant on observe une cassure de la courbe poids/taille et un retard saturo-pondéral important. Il est donc important, une fois le diagnostic de MC posé, de bien décrire le phénotype de la maladie, selon des critères consensuels définis par la classification de Montréal (Figure 1.3). BAUMGART et SANDBORN [2012]

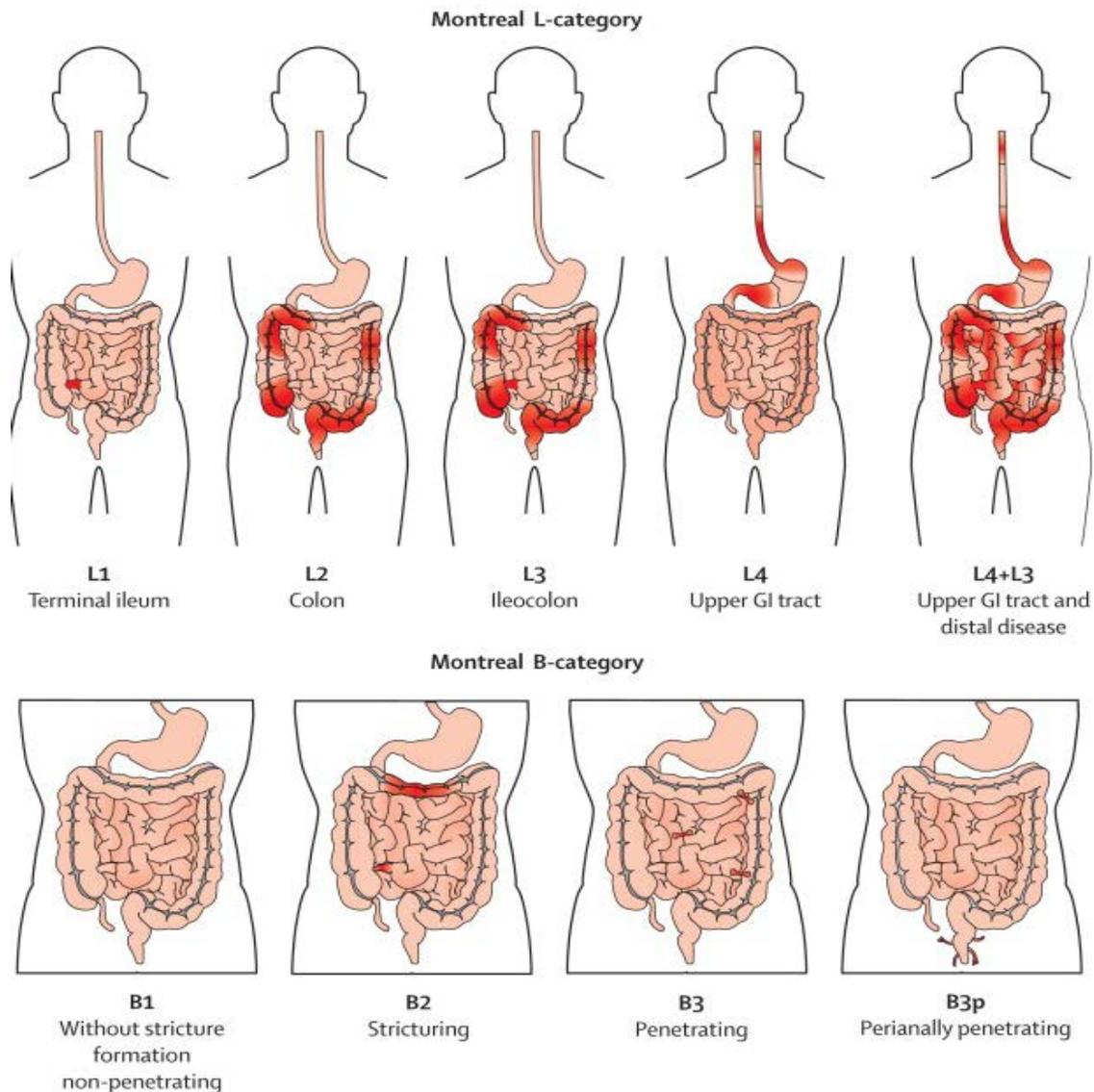


FIGURE 1.3 – Phénotype de la Maladie de Crohn : classification de Montréal. BAUMGART et SANDBORN [2012]

La maladie varie et évolue dans le temps sous forme de poussées. Les formes les plus fréquentes au moment du diagnostic, chez l'adulte, sont celles touchant l'iléon. Une étude (THIA et collab. [2010]) en population générale montre que l'on retrouve, au diagnostic, 45 % de localisation L1 (iléale), 32 % de localisation L2 (colonique), 19 % de localisation L3 (iléo-colonique). Parallèlement aux localisations L1, L2 et L3, des atteintes dites « hautes » (L4) sont rencontrées chez 4 % des patients. Concernant la forme de la maladie au diag-

nostic, la majorité des patients (81 %) présente une forme inflammatoire seule (B1), 5 % présentent une forme sténosante (B2) et 14 % une forme pénétrante (B3). 20 ans après le diagnostic, pour 51 % des patients la maladie a progressé et montre un phénotype aggravé : extension de la maladie, apparition de formes sténosantes et/ou pénétrantes. Il est important de noter que souvent, l'aggravation de la forme de la maladie se produit dans les 5 premières années ([CHARPENTIER et collab. \[2014\]](#)).

Une revue récente des publications Européennes ([DURICOVA et collab. \[2017\]](#)) a rapporté que pour les enfants atteints de MC, au diagnostic, les formes les plus fréquentes sont iléo-coloniques, et que plus d'un tiers des enfants présentant une forme inflammatoire au diagnostic développent des complications intestinales après 5 ans. De plus, le risque de développer un cancer ainsi que le risque de décès semblent augmentés chez les enfants atteints de MC.

En conclusion le phénotype de la MC est hétérogène et s'aggrave avec l'évolution de la maladie.

### 1.1.3 Etiologie

Même si l'étiologie de la MC n'est pas encore parfaitement connue, il est admis qu'elle résulterait de l'interaction entre différents facteurs : susceptibilité génétique, facteurs environnementaux et microbiote, provoquant une réponse immunitaire anormale et une dysfonction de la barrière intestinale.

#### 1.1.3.1 Facteurs génétiques

La concordance des jumeaux et l'observation d'une agrégation familiale de la MC, dans certains cas, a fortement suggéré l'implication de facteurs génétiques dans son étiologie. Ceci a été démontré en 1996 par la mise en évidence d'un locus de susceptibilité génétique à la MC sur le chromosome 16 : le locus IBD1 [HUGOT et collab. \[1996\]](#). Ensuite, en 2001, cette même équipe a identifié le facteur de risque génétique majeur à ce locus : le gène *NOD2* et surtout ses mutations [HUGOT et collab. \[2001\]](#). De nombreuses études de *Genome-Wide-Association* (GWAS) ont permis dans un premier temps l'identification de 71 loci de susceptibilité génétique à la MC, situés sur 17 chromosomes [FRANKE et collab. \[2010\]](#). Aujourd'hui plus de 200 facteurs de risque génétique ont été identifiés. Parmi eux, on retrouve des gènes de l'inflammation (*NOD2*, *IL-10*, *NLRP3*) et de l'immunité (*TLR4*, *ATG16L*, *IL23R*). Les facteurs de risque génétique majeurs sont encore aujourd'hui les mutations du gène *NOD2*, avec des *Odd Ratio* (OR) compris entre 3 et 36, alors que les OR des autres facteurs de risque génétique sont eux compris entre 1,02 et 2,60. Le rôle de *NOD2* est présenté dans la partie 1.3 de ce chapitre. On estime que la génétique ne contribue que pour 20% à la survenue de la maladie [FRANKE et collab. \[2010\]](#). On doit donc supposer que d'autres facteurs de risque (facteurs épigénétiques, facteurs « environnementaux », dysbiose) seraient impliqués pour une part de 80% dans la survenue de la MC.

### 1.1.3.2 Facteurs environnementaux

On observe que l'augmentation de l'incidence de la MC au cours du siècle dernier dans les pays développés a suivi l'industrialisation de ceux-ci et que l'émergence de cette même pathologie dans les pays en voie de développement a suivi leur occidentalisation (vu dans la partie 1.1.1 Epidémiologie). Ceci va dans le sens d'une implication de facteurs environnementaux dans l'étiologie de la maladie. Différentes études ont mis en évidence l'intervention de plusieurs facteurs environnementaux dans le développement de la MC et/ou son aggravation; comme la forte concentration en dioxyde d'azote dans l'air, le régime alimentaire, l'hygiène, le mode de vie KAPLAN et collab. [2010], ou encore l'influence du tabac COSNES et collab. [2001]. Le tabac est le facteur environnemental le plus étudié. Un fumeur augmente son risque de développer la maladie par 1,76 MAHID et collab. [2006]; TO et collab. [2016]. L'utilisation de certains médicaments augmenterait aussi ce risque : antibiotiques UNGARO et collab. [2014], anti-inflammatoires ANANTHAKRISHNAN et collab. [2012], contraception orale CORNISH et collab. [2008]... Un faible niveau socio-économique et l'urbanisation seraient aussi des facteurs de risque pour la MC GENIN et collab. [2019].

### 1.1.3.3 Le microbiote

Le microbiote intestinal d'un sujet sain présente une grande diversité qui diffère selon les parties de l'intestin. La majorité des espèces présentes sont des bactéries des phylum : *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Gammaproteobacteria* et *Actinobacteria*. La MC est caractérisée par une dysbiose au niveau de l'appareil digestif. En effet, les patients présentent une diversité réduite du microbiote de l'appareil digestif par rapport à des sujets non malades : diminution des *Bacteroidetes* et des *Firmicutes* et augmentation des *Gammaproteobacteria* et *Actinobacteria* FRANK et collab. [2007,?]; KOSTIC et collab. [2014]. On retrouve également une prévalence plus élevée d'*Escherichia coli invasive-adhérent* (AIEC) chez les patients atteints la MC (22 % vs 6 % dans la muqueuse iléale contrôle) BAUMGART et collab. [2007]; DARFEUILLE MICHAUD et collab. [2004]. Ces souches traversent la barrière muqueuse, adhèrent et envahissent les cellules épithéliales intestinales, survivent et se répliquent au sein de macrophages, provoquant la sécrétion de grandes quantités de TNF  $\alpha$ . DARFEUILLE MICHAUD et collab. [2004]; LAPAQUETTE et collab. [2010]. En effet, à l'état normal, il existe des récepteurs CEACAM6 en faible quantité au niveau de la bordure en brosse des cellules épithéliales. Les AIEC sont capables d'adhérer à ce niveau via ces récepteurs. Dans le cas de la MC, on observe une surexpression de ce récepteur, ce qui permet l'adhésion plus importante des AIEC. L'infection par les AIEC augmente la production de CEACAM6 en activant la production d'IL-12 par les macrophages. Ainsi les macrophages produisent de l'IL12 qui permet la formation de cellule T helper-1 (Th1), ce qui aboutit au relargage de TNF- $\alpha$  et d'INF- $\gamma$ . Ceci activant encore plus la production de récepteurs CEACAM6. Ainsi on observe un emballement de la réaction inflammatoire et

l'augmentation du passage des bactéries dans la paroi intestinale.

Les patients atteints de MICI présentent également une augmentation du nombre de certains virus dans leurs selles : caudovirus NORMAN et collab. [2015], parvovirus B19, Norovirus, Epstein-Barr virus KHAN et collab. [2009]; PIRONI et collab. [2009]; WEINBERG et collab. [2009] et présentent une dysbiose fongique OTT et collab. [2008]; SOKOL et collab. [2017]. La souche la plus étudiée est *Candida albicans* car elle est plus fréquemment retrouvée chez les patients atteints de MC que chez des sujets sains.

Malgré toutes ces observations qui améliorent nos connaissances, une question reste en suspens : la présence d'une dysbiose est-elle une des causes ou une conséquence de la MC? De nombreuses études sont en cours et permettront peut-être de trancher cette question.

En conclusion l'étiologie de la MC est complexe et encore en cours d'étude. Différents facteurs ont été mis en évidence : facteurs génétiques et environnementaux, dysbiose. Cependant, aucun de ces facteurs de risque ne suffit à lui seul à la survenue de la maladie. Mais des interactions complexes se produisent entre chacun de ces facteurs, conduisant au développement de la maladie. La figure 1.4 résume l'état de nos connaissances.

Que se passe-t-il au niveau du système immunitaire intestinal chez un patient atteint de MC?

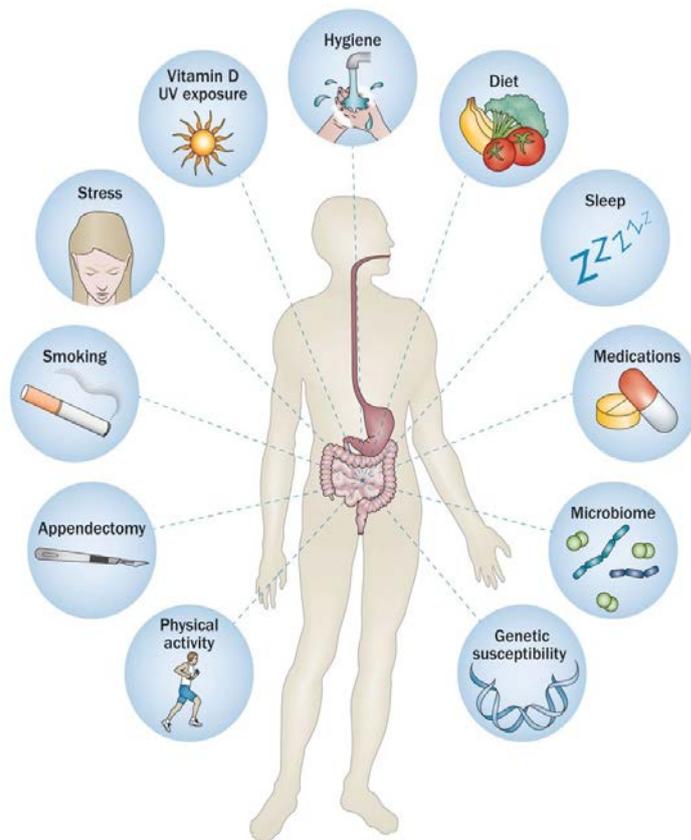


FIGURE 1.4 – Interaction entre génétique, immunologie, environnement et microbiome dans l'étiologie de la MC. ANANTHAKRISHNAN [2015]



la barrière intestinale. Elle est composée principalement d'une seule couche de cellules épithéliales polarisées (les entérocytes), qui assurent l'absorption des nutriments. Les cellules épithéliales sont reliées entre elles par des jonctions serrées. Elles sont couvertes d'un biofilm de mucus sécrété par les cellules caliciformes de Goblet par exocytose. Ce revêtement protecteur est constitué de glycoprotéines (dont l'[Immunoglobuline A \(IgA\)](#) et les mucines) et de glycolipides capables d'intercepter les bactéries. L'épithélium intestinal et les dimères d'[IgA](#) agissent de concert pour réguler et séparer du système immunitaire muqueux la microflore intestinale. L'épithélium intestinal contient aussi des cellules spécialisées, comme les cellules de Paneth et les cellules M (microfold). Les cellules de Paneth sont spécialisées dans la production de peptides anti-microbiens (lysozyme, phospholipase A2, défensines  $\alpha$  et  $\beta$ , lectine REG-3- $\gamma$ ) [BRANDL et collab. \[2007\]](#); [KESHAV \[2006\]](#); [SALZMAN et collab. \[2007\]](#); [VAISHNAVA et collab. \[2011\]](#). Contrairement aux cellules épithéliales, les cellules M ne possèdent pas de bordure en brosse au pôle apical et présentent une invagination de leur membrane plasmique qui forme une poche intra-épithéliale. Ceci favorise l'endocytose des micro-organismes, des macromolécules et des antigènes, de la lumière vers la muqueuse intestinale. Ces cellules favorisent donc le passage des antigènes vers les cellules présentatrices des antigènes présentes dans le dôme, telles que les cellules dendritiques.

### **Récepteurs de l'immunité innée**

Les motifs associés aux pathogènes ([pathogen associated molecular pattern \(PAMP\)](#)) sont des motifs moléculaires qui sont propres aux micro-organismes et qui sont reconnus spécifiquement par les récepteurs de l'immunité innée ([pattern recognition receptor \(PRR\)](#)). Ces récepteurs sont principalement exprimés dans les cellules présentatrices de l'antigène, comme les cellules dendritiques et dans les cellules épithéliales. Il existe différents types de récepteurs : les [Toll-like receptors \(TLR\)](#), les [NOD-like receptors \(NLR\)](#), les [RIG-I-like receptors \(RLR\)](#) et les [C-type lectin-like receptors \(CLR\)](#). L'activation des PRRs induit une cascade de signalisation intracellulaire conduisant à l'activation et/ou la modulation de la réponse immunitaire. Au niveau des cellules épithéliales intestinales, l'activation des PRRs induit notamment la production de peptides antimicrobiens, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et le recrutement de polynucléaires neutrophiles et de macrophages (Figure 1.5).

### **Cellules présentatrices de l'antigène**

Dans l'intestin, les cellules présentatrices de l'antigène sont présentes dans la *lamina propria*. Il s'agit des cellules dendritiques et des macrophages. Le contact avec l'antigène conduit à la maturation des cellules dendritiques et à la présentation de l'antigène aux cellules T et B. Ainsi les cellules dendritiques induisent par défaut un phénotype tolérant dans la muqueuse, sauf si des signaux de danger, tels que le [lipopolysaccharide \(LPS\)](#) bactérien, induisent le passage à un phénotype inflammatoire ou immunisant. Les cellules

dendritiques intestinales impriment également les lymphocytes T et B pour exprimer les molécules  $\alpha 4\beta 7$  et CCR9.

Ces cellules jouent donc le rôle d'intermédiaires entre immunité innée et immunité adaptative.

### 1.2.1.2 Immunité adaptative

La figure 1.6 présente un schéma simplifié de l'immunité adaptative intestinale.

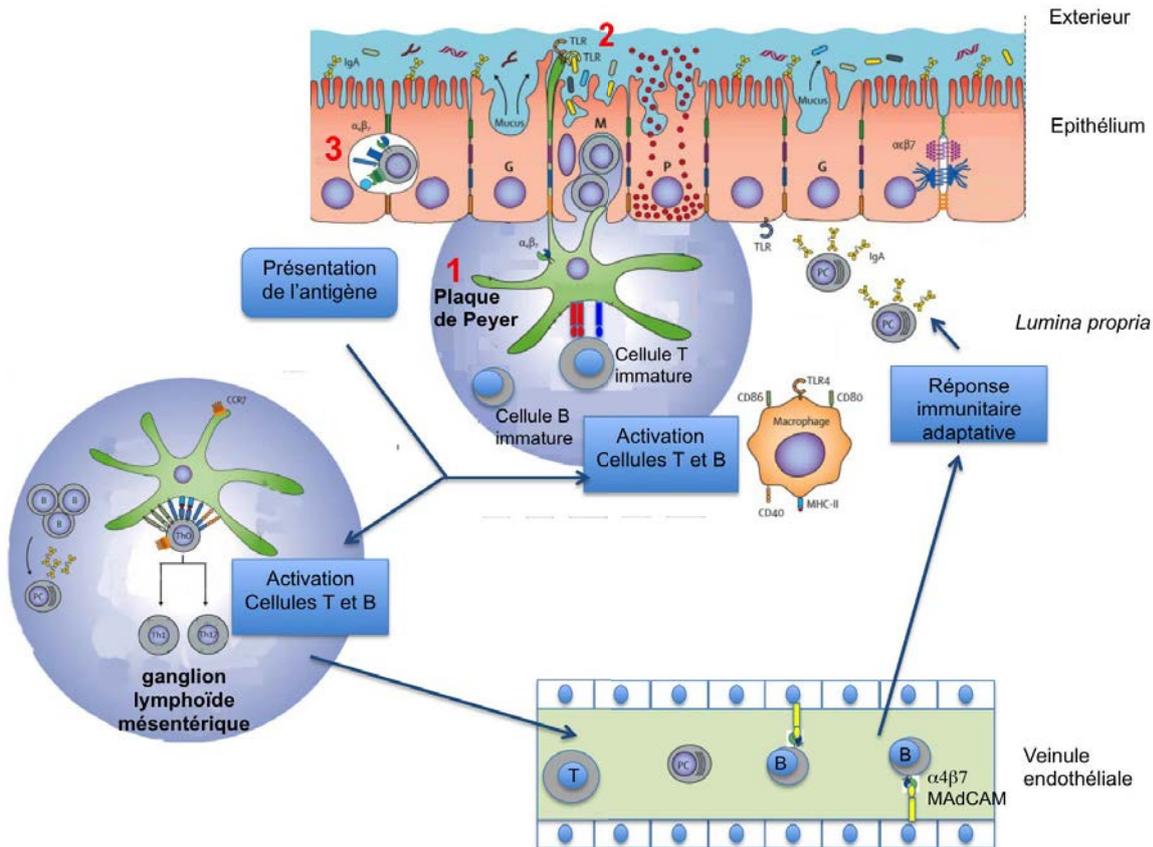


FIGURE 1.6 – Schéma simplifié de l'immunité adaptatrice intestinale d'après BAUMGART et SAND-BORN [2012].

Les antigènes sont captés au niveau des zones 1, 2 et 3. Les cellule B et T sont activées spécifiquement par les cellules présentatrices de l'antigène. Les cellules T activées produisent des cytokines ( $TGF\beta$ ,  $IFN-\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10) qui activent la réponse immunitaire adaptative et la production d'IgA par les cellules B. Les lymphocytes activés dans les plaques de Peyer migrent dans les ganglions lymphatiques mésentériques puis, dans les veinules endothéliales, pour ensuite retourner dans la *lamina propria* afin de permettre la réponse immunitaire adaptatrice intestinale.

#### Capture des antigènes de la lumière intestinale

Les antigènes de la lumière intestinale peuvent être capturés de trois manières différentes : (1) par les plaques de Peyer et les nodules lymphoïdes isolés, (2) par les cel-

lules dendritiques émettant des prolongements dans la lumière intestinale, et (3) directement par les cellules épithéliales. Les plaques de Peyer et les nodules lymphoïdes isolés constituent les sites inducteurs majeurs de l'immunité adaptative intestinale. Leur épithélium particulier comporte des cellules M, des macrophages et des lymphocytes au niveau de leur membrane basale. Comme indiqué plus haut, les cellules M ne possèdent pas de bordure en brosse au pôle apical et présentent une invagination de leur membrane plasmique qui forme une poche intra-épithéliale. Ceci favorise l'endocytose des micro-organismes, des macromolécules et des antigènes, de la lumière vers la muqueuse intestinale. Les cellules lymphoïdes naïves T et B sont ainsi informées et sélectionnées. Les cellules B prolifèrent et constituent le centre germinatif des plaques de Peyer.

Un sous-type de cellules dendritiques est capable de détecter les antigènes directement dans la lumière intestinale par des dendrites étendues dans la lumière, entre les cellules épithéliales. Ces cellules migrent ensuite vers les ganglions mésentériques de voisinage. Bien que cela représente une voie plus minoritaire, les cellules épithéliales peuvent aussi capter les antigènes et même les présenter directement aux lymphocytes par une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de type II.

### **Réponse adaptative B**

Les lymphocytes B produits dans un nodule lymphoïde isolé, une plaque de Peyer ou un ganglion mésentérique quittent ces structures par le système lymphatique efférent qui les draine, puis ils gagnent la circulation lymphatique générale et se déversent enfin par le canal thoracique dans la circulation systémique. Ces lymphocytes B activés colonisent alors tous les territoires muqueux, par voie sanguine, en quittant la circulation périphérique au niveau des veinules postcapillaires particulières qui irriguent ces tissus. Les lymphocytes imprimés dans le tractus gastro-intestinal par les cellules présentatrices de l'antigène, comme les cellules dendritiques, expriment les molécules  $\alpha 4\beta 7$  et CCR9. A ce niveau, l' $\alpha 4\beta 7$  des lymphocytes se lie avec la [mucosal addressin cell adhesion molecule \(MAdCAM\)](#) localement exprimée et permet aux lymphocytes de sortir de la circulation pour pénétrer dans la *lamina propria* intestinale.

Les lymphocytes B activés terminent à ce niveau leur différenciation en plasmocytes et produisent des **IgA** spécifiques de l'antigène. Ces **IgA** sont dirigées à la surface où elles sont retrouvées sous forme dimérique. En tapissant la surface des muqueuses, elles peuvent capter les antigènes et empêcher leur entrée dans le tissu sous-jacent.

### **Réponse adaptative T**

Après présentation des antigènes par les cellules présentatrices de l'antigène aux lymphocytes T résidents (principalement CD4+) de la *lamina propria*, les lymphocytes T sont activés. En fonction des cytokines présentes, les lymphocytes T naïfs prendront un phénotype pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire. Les cellules dendritiques ont un rôle majeur dans cette phase car elles vont intégrer l'ensemble des paramètres environne-

mentaux et génétiques qui vont conduire à la réponse T. Parmi ces paramètres, des signaux d'induction de la tolérance peuvent provenir des cellules épithéliales (par exemple TGF- $\beta$ , IL-10, TSLP), ou des signaux pro-inflammatoires provenant des différents types cellulaires présents (par exemple TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-12, IL-6). En fonction de cet environnement, la réponse T sera soit effectrice, soit régulatrice. La figure 1.7 présente ces différents cas.

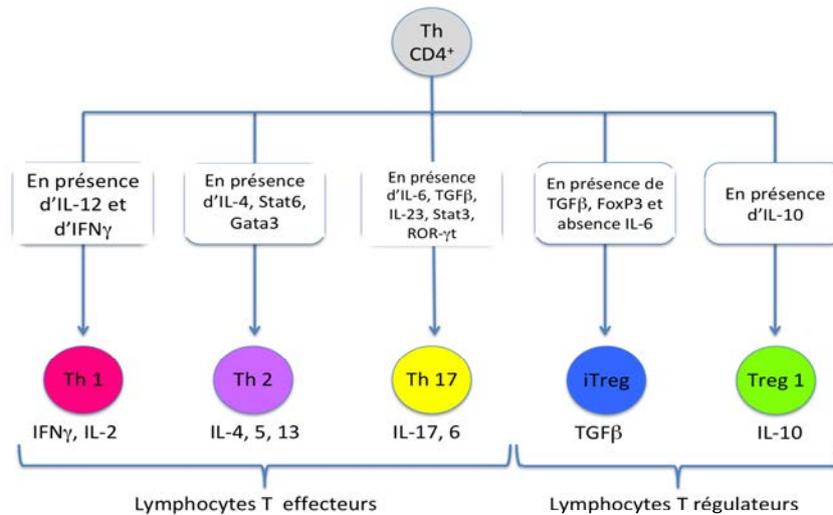


FIGURE 1.7 – Différenciation des Lymphocytes T et production des cytokines.

On distingue trois types de lymphocytes T effecteurs : (1) **les Th1** qui dépendent de la présence d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$ , des facteurs de transcription Stat1, Stat4 et Tbet, qui favorisent la production de l'IL-2 et de l'IFN- $\gamma$  et qui **sont impliqués dans la réponse aux infections bactériennes intracellulaires**; (2) **les cellules T helper-2 (Th2)** qui dépendent de la présence d'IL-4, des facteurs de transcription Stat6 et Gata3, synthétisent de l'IL-4, IL-5 et IL-13 et **sont impliqués dans la réponse aux infections parasitaires**; et (3) **les cellule T helper-17 (Th17)** qui dépendent de la présence d'IL-6, de TGF- $\beta$  et d'IL-23, des facteurs de transcription Stat3 et ROR- $\gamma$ t, qui synthétisent de l'IL-17 et de l'IL-6 et **sont impliqués dans la réponse aux infections bactériennes extracellulaires et fongiques**.

Il existe deux types principaux de lymphocytes T régulateurs dans l'intestin : (1) **les cellules régulatrices T (Treg) induits** qui dépendent de la présence de TGF- $\beta$  (en l'absence d'IL-6), du facteur de transcription FoxP3, et qui **synthétisent du TGF- $\beta$** ; et (2) **les Treg 1** qui dépendent de la présence d'IL-10 et **synthétisent de l'IL-10**. Au niveau intestinal, il existe une activation des lymphocytes T de manière basale, même en l'absence d'infection. Cette activation est en grande partie sous la dépendance de bactéries du microbiote intestinal et jouerait un rôle dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Il existe notamment un équilibre fin entre les populations **Th17** et **Treg**. Lorsque cet équilibre est rompu, il peut en résulter une inflammation intestinale incontrôlée, comme c'est le cas

par exemple dans la maladie de Crohn.

## 1.2.2 Maladie de Crohn et dérégulation du système immunitaire intestinal

Des voies immunitaires multiples et chevauchantes sont dérégulées dans la MC. La Figure 1.8 présente une comparaison du système immunitaire normal et le système immunitaire dérégulé dans la MC.

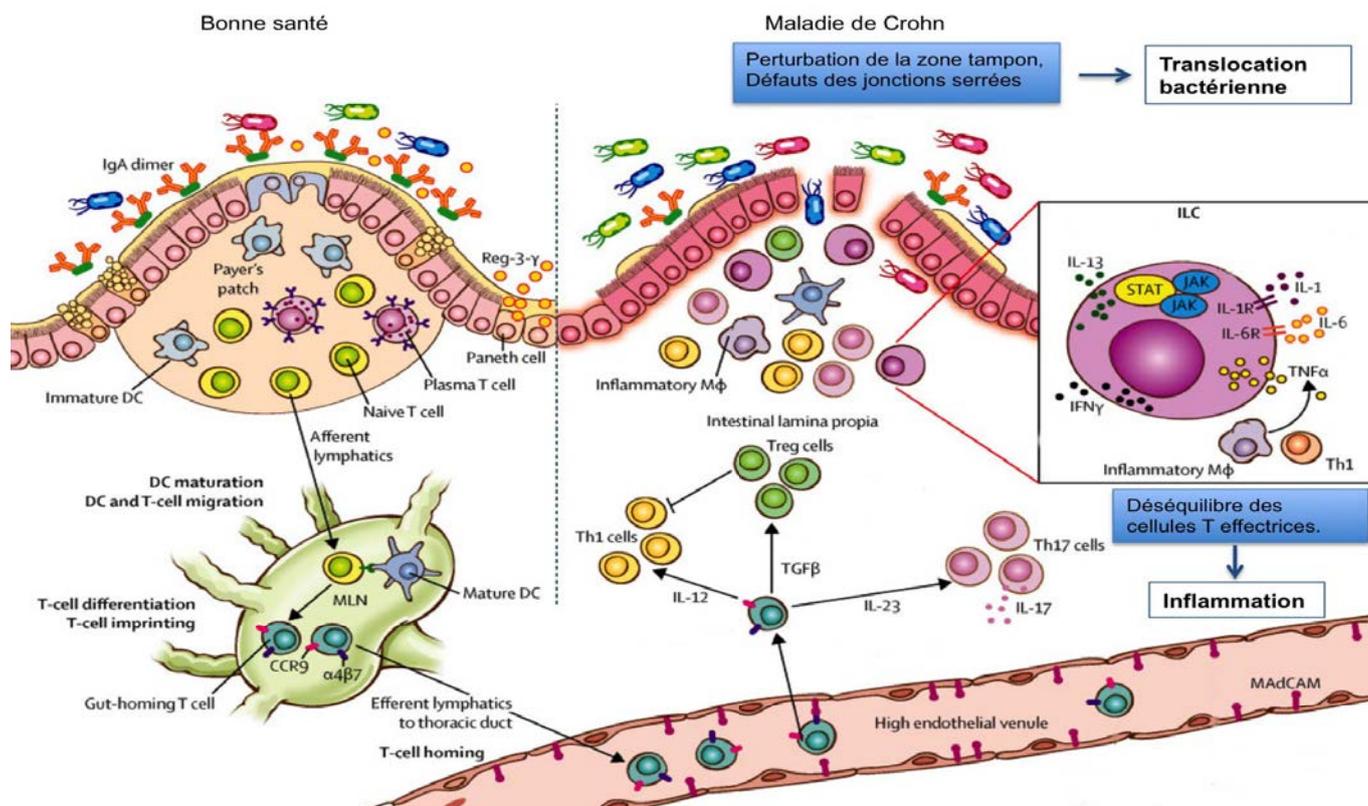


FIGURE 1.8 – Aperçu du système immunitaire intestinal chez les sujets en bonne santé ou atteints de la maladie de Crohn d'après [TORRES et collab. \[2017\]](#)

La dérégulation de l'immunité innée est représentée par la perturbation de la zone tampon et les fuites des jonctions serrées, ce qui entraîne une translocation anormale des bactéries vers la *lumina propria*, aboutissant à une exacerbation de l'inflammation. La dérégulation de l'immunité adaptative est représentée par le déséquilibre des cellules T effectrices.

### 1.2.2.1 Dérégulation de l'immunité innée

La perturbation de la zone tampon (cellules épithéliales - mucus) par des émulsifiants, omniprésents dans le régime alimentaire occidental [CHASSAING et collab. \[2015\]](#), ou par des mutations du gène de la mucine *MUC2* [BOLTIN et collab. \[2013\]](#), pourrait favoriser la

translocation bactérienne et serait associée à une MICI. De même, la diminution de l'expression du gène de la mucine *MUC1* dans l'iléon terminal chez des patients atteints de MC suggère que la couverture de mucine pourrait devenir insuffisante chez ces patients BUISINE et collab. [1999]. Cette hypothèse est confortée par des études qui montrent l'association des variants génétiques des gènes *MUC1*, *MUC19* et *PTGER4* avec la MC FRANKE et collab. [2010].

Les cellules épithéliales effectuent aussi un processus appelé autophagie, dans lequel des contenus cytoplasmiques indésirables sont dirigés vers le lysosome pour y être dégradés LEVINE et collab. [2011], empêchant ainsi la dissémination d'espèces bactériennes invasives BENJAMIN et collab. [2013]. Des défauts dans les gènes liés à l'autophagie tels que *NOD2*, *ATG16L1* et *IRGM* ont été identifiés comme des facteurs de risque importants de la MC. Des cellules de Paneth de patients atteints de MC présentant le variant T300A du gène *ATG16L1* présentent moins de granules, dysmorphiques et des déficiences fonctionnelles CADWELL et collab. [2008]. De plus, des expérimentations chez l'animal relient aussi le dysfonctionnement des cellules de Paneth et l'inflammation iléale aux variants génétiques du gène *XBPI* (facteur de transcription intervenant dans la réponse au stress par le réticulum endoplasmique) et du gène *NOD2* (facteur impliqué dans la détection des bactéries intra cellulaires et à leur destruction) BISWAS et collab. [2010]; KASER et collab. [2008].

Des défauts dans les jonctions serrées intestinales sont également associés aux MICI ZEISSIG et collab. [2007]. La voie paracellulaire des flux entre les cellules épithéliales voisines est normalement bloquée par les jonctions serrées. Dans la MC, cette jonction étroite n'est plus étanche SÖDERHOLM1 et collab. [2002], probablement à cause de modifications de l'expression de protéines à jonction serrée telles que les claudines ZEISSIG et collab. [2007], ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité et permet un accès des antigènes depuis la lumière vers la *lamina propria*. Des études *in vitro* et sur l'animal ont établi un lien entre les protéines à jonction serrée WEBER et collab. [2010] et les modifications de la perméabilité induites par la voie de signalisation MYLK (myosin light chain kinase) en activant les cellules T, le TNF $\alpha$  BARREAU et collab. [2010]; WEBER et collab. [2010] et l'INF $\gamma$  FRANKE et collab. [2010] via *NOD2* BARREAU et collab. [2010]. Des défauts de perméabilité ont également été rapportés chez des parents de patients atteints de la MC, cliniquement sains mais porteurs d'une mutation du gène *NOD2* BUHNER et collab. [2006]; FRANKE et collab. [2010]. Ainsi, il est aujourd'hui reconnu que les mutations du gène *NOD2* sont fortement associés à la MC HUGOT et collab. [2001]. Les mécanismes impliquant *NOD2* dans la MC seront étudiés dans la partie 1.3.

De plus, nous avons vu que les cellules de Paneth sont des cellules sécrétoires spécialisées et des mutations génétiques, notamment des gènes *NOD2*, *ATG16L1*, *LRRK2*, *XBPI* et *IRGM* entraînent des altérations de leur fonction et de leur survie, conduisant à une

réduction de la sécrétion de protéines antimicrobiennes **OUELLETTE [2010]**. Il a aussi été montré une corrélation entre l'activité de la **MC** et une expression accrue des gènes *TLR2* et *TLR4* et une réponse exagérée aux **LPS** par les cellules dendritiques **BAUMGART et collab. [2010, 2009, 2005]**; **HART et collab. [2005]**. De plus, la capacité des cellules dendritiques à induire des **Treg** pourrait être perdue dans la maladie de Crohn **ILIEV et collab. [2009]**.

### 1.2.2.2 Dérégulation de l'immunité adaptative

Nous avons vu que les cellules T helper CD4<sup>+</sup> peuvent être classées fonctionnellement en cellules **Th1**, **Th2**, **Treg** et **Th17** (Figure 1.6) **HIRAHARA et NAKAYAMA [2016]**. Dans la **MC**, le dysfonctionnement est caractérisé par un déséquilibre des cellules T effectrices **HANSEN [2015]** (principalement des cellules **Th1** ou **Th17** défendant la muqueuse contre les bactéries, les champignons et les virus par la sécrétion d'INF $\gamma$ , de TNF $\alpha$  et d'IL-17 et 22) versus des cellules T naturellement régulatrices (sécrétant de l'IL-10 et du TGF $\beta$  ou de l'IL-35) **COLLISON et collab. [2010]**; **WEAVER et HATTON [2009]**. Il a aussi été montré que l'activité fonctionnelle des **Treg** intestinales est altérée **MALOY et POWRIE [2011]** : les résultats des **GWAS** plaident en faveur de la présence d'un déséquilibre, ils montrent une association entre les loci qui jouent un rôle crucial dans la différenciation des **Treg** (*IL10*, *IL2RA*, *SMAD3*) et celle des **Th1** et **Th17** (*CPEB4*) avec la maladie de Crohn **FRANKE et collab. [2010]**. De plus, des mutations homozygotes du gène *IL10R* perturbent la régulation de la balance cytokines-cellules T et coïncident avec l'apparition précoce de la **MC** **GLOCKER et collab. [2009]**.

Les lymphocytes B sont moins bien étudiés dans la **MC**. Des anticorps antimicrobiens tels que les *Anticorps anti-Saccharomyces Cerevisiae (ASCA)*, anti-I2, les anticorps anti-porine C de la membrane externe, les anticorps anti-glagelline et les anticorps anti-glycanes sont souvent présents à des taux plus élevés chez les patients atteints de la **MC**. Leur présence suggère que les lymphocytes B intestinaux développeraient une réponse immunitaire aux microbes de la lumière chez ces patients, mais le rôle pathogène des anticorps antimicrobiens reste incertain. Parmi les perturbations supplémentaires des cellules B chez ces patients, on peut citer une augmentation des plasmocytes de la *lamina propria* et des perturbations de la production d'anticorps via la formation de dimères d'IgA-Immunoglobuline G (IgG) et d'IgA monomères **BRANDTZAEG et collab. [2006]**.

Une meilleure compréhension du système immunitaire intestinal a conduit à l'élargissement du nombre de cibles thérapeutiques. Parmi celles-ci, les anti-TNF $\alpha$  et les anti-homing qui sont utilisés en soin courant. D'autres en sont encore au stade précoce ou avancé de la recherche clinique.

Nous avons vu comment des dysfonctionnements des voies de l'autophagie et des fonctions des protéines de l'autophagie pourraient intervenir dans la pathogénèse de la **MC**. Parmi les gènes de l'autophagie identifiés, *NOD2* est le facteur de risque majeur avec

des OR compris entre 3 et 36.

## 1.3 Rôle de NOD2

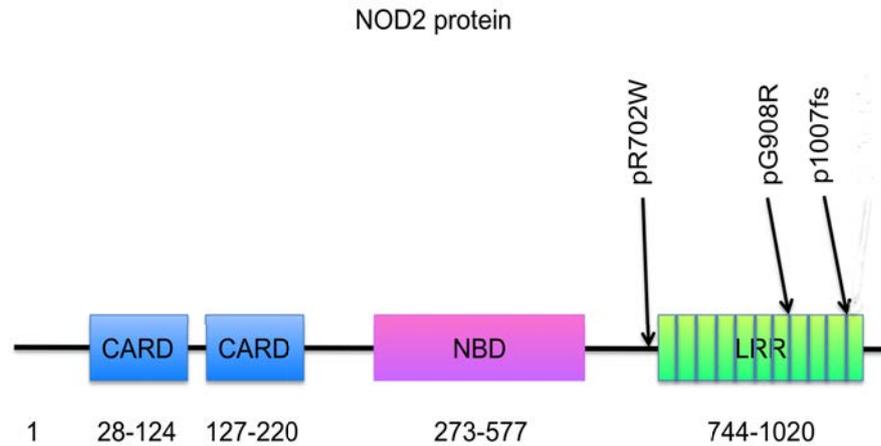
### 1.3.1 La famille des NLR (NOD-like receptors)

NOD2 fait partie de la famille des NLR. Cette famille est constituée de récepteurs intracellulaires caractérisés par la présence d'un domaine NOD conservé (Nucleotide-binding oligomérisation domain) **INOHARA et NUÑEZ [2001]**. L'organisation générale des NLR comprend (1) un domaine N-terminal impliqué dans l'initiation de la signalisation et constitué de domaines d'interaction protéine-protéine tels que le domaine de recrutement des caspases (CARD), le domaine pyrine (PYD) et le domaine BIR (baculovirus inhibitor repeat); (2) un domaine central NOD nécessaire pour la fixation des nucléotides et l'auto-oligomérisation; et (3) une région C-terminale LRR riche en leucine, responsable de la reconnaissance de motifs microbiens conservés. Il existe dans le génome humain 23 gènes codant pour des NLR **HARTON et collab. [2002]**. Sur la base des domaines effecteurs N-terminaux, les NLR peuvent être subdivisés en quatre groupes : NLRA (domaine d'activation acide), NLRB (inhibiteur de la répétition de l'apoptose par baculovirus), NLRC (CARD) et NLRP (domaine pyrine, PYD). Parmi les NLR les plus étudiés figurent des protéines cruciales pour la formation de complexes d'activation de la caspase-1, appelés inflammasomes. Les protéines NLR telles que NLRP3, NLRP1 et NLRC4 détectent des signaux microbiens et de danger afin de déclencher la liaison de l'inflammasome à la protéine caspase-1 conduisant à la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 **MARTINON et collab. [2009]**. Les autres protéines NLR les plus étudiées sont les protéines apparentées NOD1 et NOD2. NOD1 et NOD2 sont des capteurs intracellulaires de peptidoglycane bactérien qui jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la défense de l'hôte et de l'inflammation. La figure 1.9 montre une représentation schématique de la structure de NOD2.

### 1.3.2 Rôles de NOD2 dans des conditions physiologiques

#### 1.3.2.1 Reconnaissance du peptidoglycane par NOD2

Le peptidoglycane est reconnu principalement par deux récepteurs de la famille des NLR : NOD1 et NOD2. NOD1 est exprimé par tous les types cellulaires **INOHARA et collab. [1999]** et reconnaît l'acide  $\gamma$ -D-glutamyl-méso-diaminopimélique que l'on trouve principalement dans les bactéries à Gram négatif **CHAMAILLARD et collab. [2003]**; **GIRARDIN et collab. [2003a,c]**. La détection du meso-DAP par NOD1 ne nécessite pas la présence du MurNAc (N-acetylglucosamine and N-acetyl-muramic acid) **MAGALHAES et collab. [2005]**. NOD2 est retrouvé chez les cellules myélomonocytaires comme les monocytes, les macrophages et les neutrophiles, les cellules dendritiques et les cellules épithéliales intestinales **GUTIERREZ et collab. [2002]**; **OGURA et collab. [2001b,c]**. Ce récepteur est un



KEY : CARD : caspase recruitment domain, NBD : nucleotide binding domain, LRR : leucine-rich repeat

FIGURE 1.9 – Structure de la protéine NOD2 et position des mutations majeures associées à la MC.

senseur général des bactéries à Gram positif et à Gram négatif puisqu'il reconnaît la structure minimale commune à tous les peptidoglycanes : le MDP (muramyl-dipeptide) **GIRARDIN et collab. [2003b]**; **INOHARA et collab. [2003]**. D'autres analyses sur l'identification des structures du peptidoglycane reconnues par NOD2 ont révélé que NOD2 ne peut être activé que par des MDP dont la structure du sucre MurNAc est intacte, et qui est lié à un dipeptide (L-Ala-D-Glu ou L-Ala-D- iso Gln) ou un tripeptide (groupe L-Ala-D-Glu-Lys ou L-Ala-D-iso Gln-Lys) (Figure 1.10) **GIRARDIN et collab. [2003c]**. Il a aussi été montré que NOD2 pouvait participer à la défense antivirale de l'hôte en induisant la production d'IFN de type I après reconnaissance d'ARN simple brin viral **SABBAH et collab. [2009]**.

NOD1 et NOD2 ont une organisation de domaine similaire avec un seul domaine CARD N-terminal (domaine de recrutement d'activation de caspase) pour NOD1 et deux pour NOD2, suivis d'un domaine NACHT et d'un domaine LRR C-terminal avec des tailles différentes entre NOD1 et NOD2 **FRITZ et GIRARDIN [2005]**; **WERTS et collab. [2006]** (Figure 1.9). Le domaine CARD interagit avec les protéines adaptatrices qui sont prérequis aux voies de signalisation pro-inflammatoires **GIRARDIN et collab. [2001]**; **OGURA et collab. [2001b]**, le domaine NACHT induit les interactions requises pour la formation d'homooligomères et le domaine LRR est impliqué dans la reconnaissance du peptidoglycane **GIRARDIN et collab. [2005]**; **LAROUÏ et collab. [2011]**; **TANABE et collab. [2004]**. L'importance du domaine LRR dans la liaison du ligand est illustrée par la conservation du poisson zèbre à l'homme des résidus clés dans les domaines NOD1 et NOD2 LRR **VIJAYAJRATNAM et collab. [2017]**. Nous verrons plus loin que les mutations dans le domaine LRR du gène *NOD2* sont également associées à la MC.

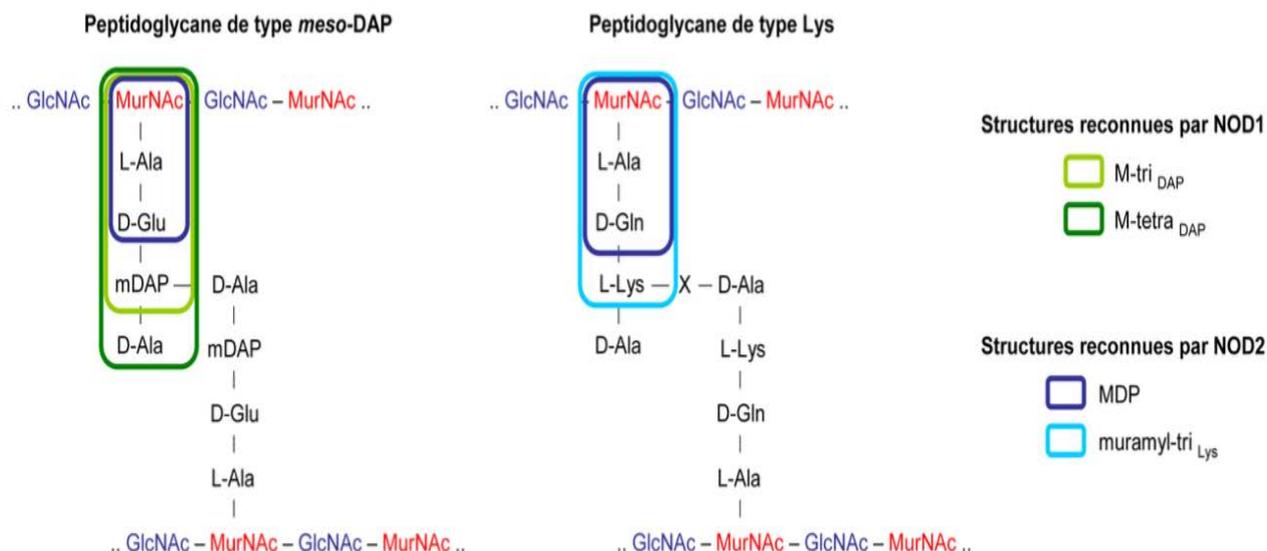


FIGURE 1.10 – Structures reconnues par NOD1 et NOD2. MACHO FERNANDEZ et collab. [2011]

NOD2 reconnaît le MDP (muramyl dipeptide), la structure minimale commune à tous les peptidoglycane, ainsi que le muramyl-triLys des peptidoglycane de type Lys, alors que NOD1 reconnaît des muopeptides du peptidoglycane de type meso-DAP, M-triDAP et M-tetraDAP.

### 1.3.2.2 Voies de signalisation et régulation

La figure 1.11 présente la voie de signalisation en réponse aux muramyl dipeptide (MDP).

En réponse au **MDP**, un changement de conformation des récepteurs monomères **NOD2** permet une **homo-oligomérisation** par interaction des domaines NACHT. Le Dimère NOD2 interagit ensuite avec RIP2 (receptor-interacting protein 2) par le biais d'interactions CARD – CARD (FRIDH et RITTINGER [2012]; HASEGAWA et collab. [2008]). Le facteur TRAF6 (Tumor necrosis receptor-associated factor 6), qui est une ubiquitine ligase E3, est ensuite recruté au niveau de RIP2 qui est autoubiquitiné par TRAF6 ABBOTT et collab. [2007]. cIAPs (cellular inhibitors of apoptosis) et XIAP (X-linked IAP), d'autres ubiquitines-ligases E3, se lient également à RIP2 BERTRAND et collab. [2009]; DAMGAARD et collab. [2012]; KRIEG et collab. [2009]. Ceci permet le recrutement du complexe d'assemblage d'ubiquitine linéaire (LUBAC), qui ubiquitine le modulateur essentiel de NF-κB (NEMO). Le complexe IKK (IκB kinase) est ensuite recruté et activé, suivi par la phosphorylation de IκB (la protéine inhibitrice de NF-κB), par la translocation de NF-κB vers le noyau et de l'**activation des gènes pro-inflammatoires** BALASUBRAMANIAN et GAO [2017]; CHEN et collab. [2017]. De plus, la poly-ubiquitination de RIP2 permet également le recrutement de TAB1/2/3 (TAK-binding proteins) associé avec TAK1 (transforming growth factor β activated kinase 1) ADHIKARI et collab. [2007]. TAK1 active ensuite les MAPKs (mitogen-activated protein kinase) comme par exemple, p38, ERK (extracellular signal-regulated kinase) et JNK

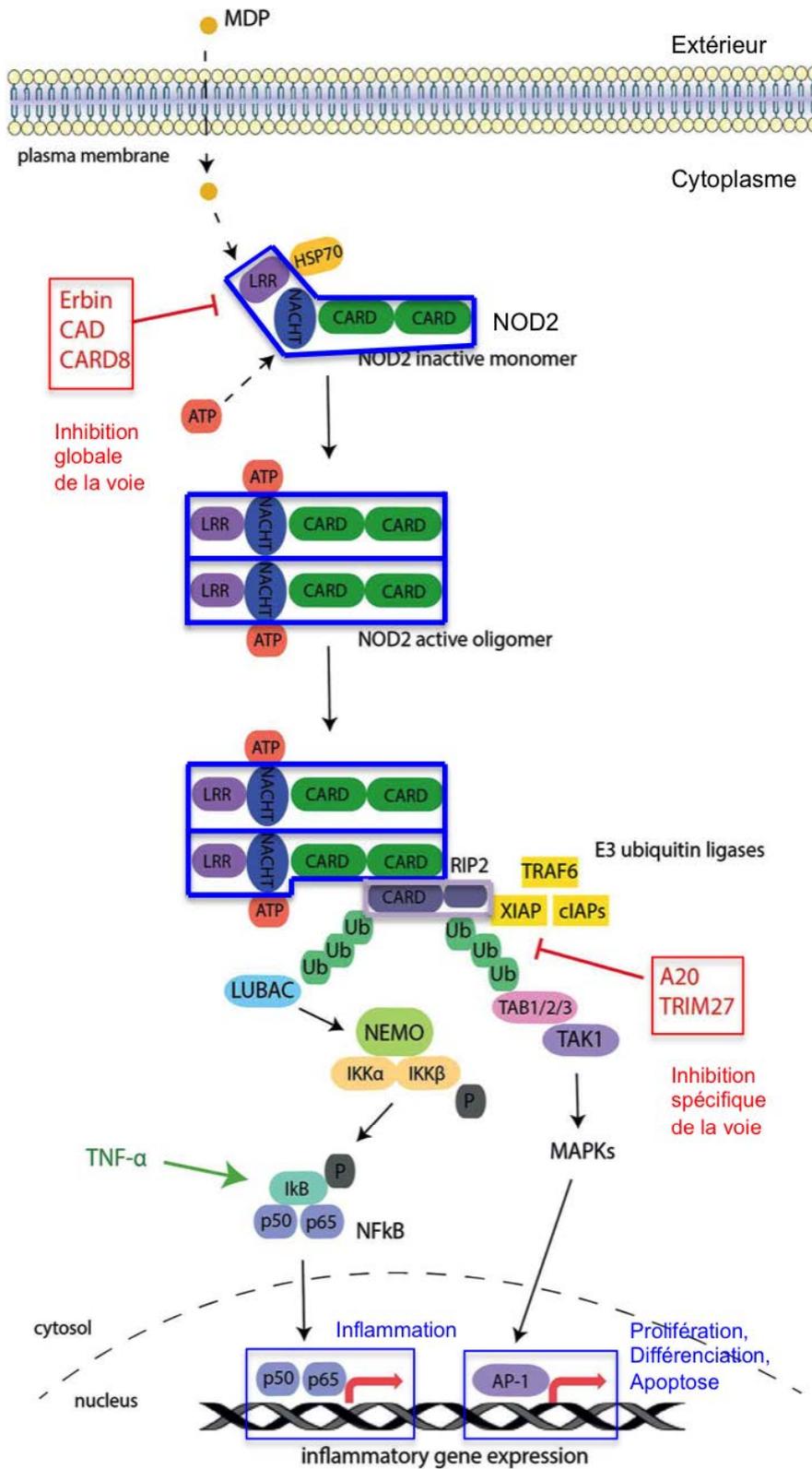


FIGURE 1.11 – Représentation schématique des voies de signalisation et des régulateurs de NOD2. DE BRUYN et VERMEIRE [2017]

(c-Jun N-terminal kinase), ce qui conduit à l'activation du facteur de transcription d'AP-1 (activator protein 1) qui **contrôle les processus de prolifération et de différenciation cellulaire et l'apoptose** WINDHEIM et collab. [2007]. Enfin, NOD2 est capable de se lier à NLRP3, générant ainsi l'inflammasome avec les protéines ASC et la procaspase-1. Ceci conduit ensuite à l'activation de la caspase-1 et donc de ses voies de transduction, conduisant à l'activation et à la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 LATZ et collab. [2013], conduisant à la réponse inflammatoire.

La régulation de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B par NOD2 est moins bien caractérisée. La régulation a lieu à différents stades et dépend du type cellulaire. On peut néanmoins distinguer quatre grandes catégories de types de régulation (localisation cellulaire, oligomérisation, ubiquitination et recrutement RIP2). Plusieurs régulateurs négatifs et positifs ont été identifiés JAKOPIN [2014] (Figure 1.11). Les protéines Erbin (Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2 inter-acting protein) et NOD2 sont localisées au niveau de la membrane et ainsi Erbin inhibe la voie de signalisation NOD2 induite par le MDP KUFER et collab. [2006]; McDONALD et collab. [2005]. La protéine CAD (Carbamoyl phosphate synthetase/aspartate transcarbamylase/dihydroorotase) est une enzyme essentielle à la synthèse *de novo* des nucléotides pyrimidiques et interagit directement avec NOD2 pour inhiber la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B et MAPK via NOD2 RICHMOND et collab. [2012]. Il a aussi été démontré que CARD8 peut empêcher l'oligomérisation de NOD2 en se liant au domaine NACHT de NOD2 et donc d'empêcher sa localisation VON KAMPEN et collab. [2010]. La protéine TNFAIP3 (TNF- $\alpha$ -induced protein 3), également appelée A20, supprime les chaînes de polyubiquitine présentes sur l'acide aminé K63 et en ajoute sur l'acide aminé K48 de la protéine RIP2. Ceci provoque la dégradation protéasomique de RIP2 et a pour conséquence l'inhibition de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B VEREECKE et collab. [2014]. L'interaction de la protéine TRIM27 (Tripartite motif containing 27) avec NOD2 induit une ubiquitination de l'acide aminé K48 de NOD2 et conduit à sa dégradation ZUREK et collab. [2012]. Le TNF- $\alpha$  lui est un régulateur positif de NOD2. Il active la libération de NF- $\kappa$ B en inhibant par phosphorylation et dissociation I $\kappa$ B $\alpha$  BEG et collab. [1993]. De nombreux autres régulateurs positifs et négatifs de la voie de signalisation NOD2 ont été identifiés FEERICK et MCKERNAN [2017]; JAKOPIN [2014].

### 1.3.2.3 Fonctions homéostatiques

La figure 1.12 présente les rôles de NOD2 à l'homéostasie.

Dans des conditions homéostatiques, NOD2 joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale via la production de protéines antimicrobiennes (par exemple les  $\alpha$ -défensines) par les cellules de Paneth BEVINS et collab. [2009]; TAN et collab. [2015b] et via la sécrétion de mucus par les cellules de gobelet.

NOD2 est également impliqué dans le processus d'autophagie, car il recrute l'ATG16L1 (autophagy-related protein 16-like 1) à la membrane basolatérale et initie ainsi la forma-

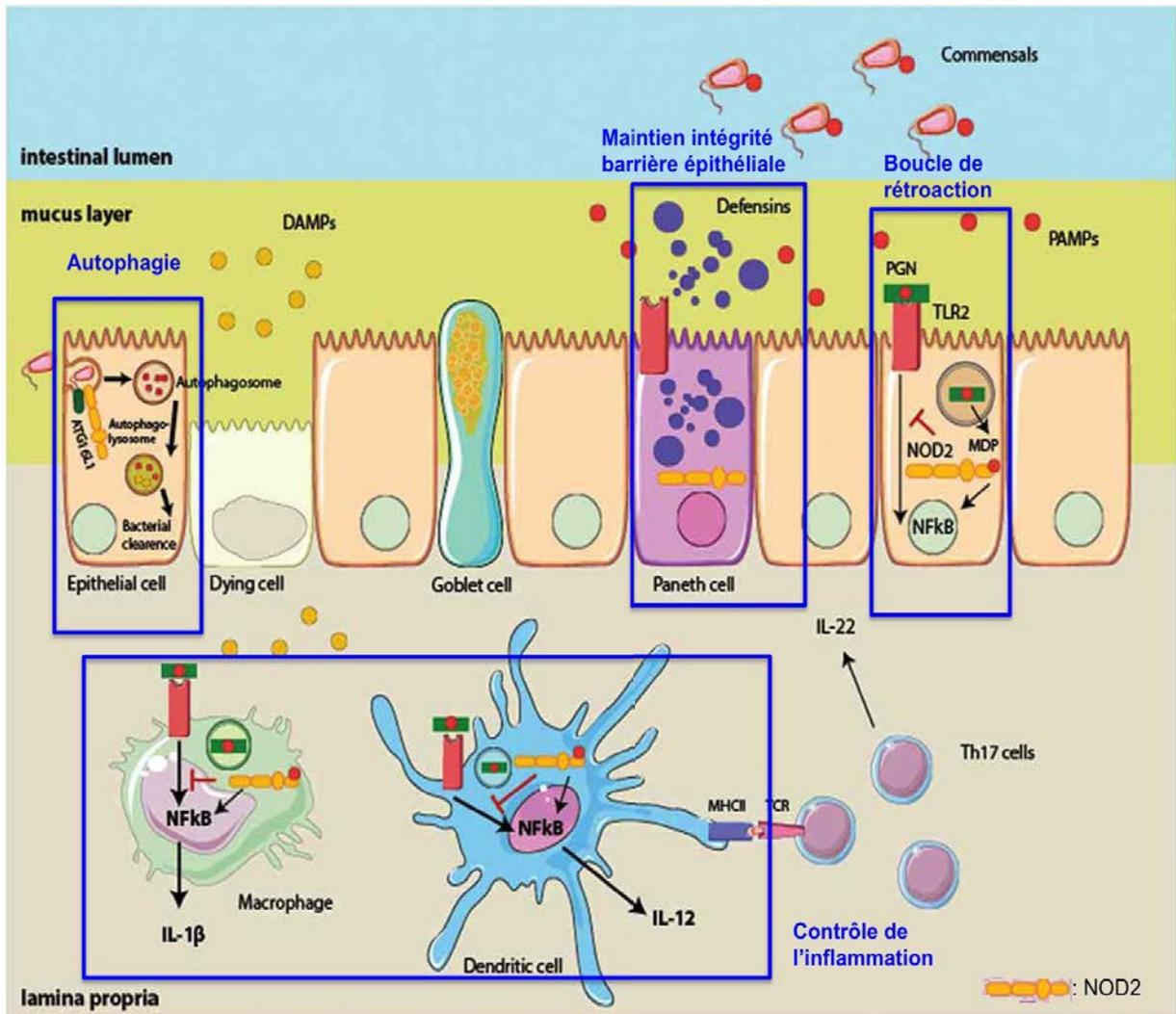


FIGURE 1.12 – Rôles de NOD2 à l'homeostasie d'après DE BRUYN et VERMEIRE [2017]

tion de certains autophagolysosomes, conduisant à une clairance bactérienne **TRAVASSOS et collab.** [2010]. L'intestin humain est colonisé par 500 à 1 000 espèces bactériennes appartenant à 8 des 55 phyla bactériens connus. Les bactéries commensales jouent un rôle crucial dans la prévention des invasions pathogènes et de la colonisation en aidant les cellules immunitaires muqueuses à maintenir une réponse immunitaire basale. NOD2 et les bactéries commensales fonctionnent dans une boucle de rétroaction : les bactéries commensales favorisent l'expression de NOD2, qui à son tour empêche une surexpansion de celles-ci **FEERICK et MCKERNAN** [2017]. En effet, la stimulation de NOD2 par les MDP entraîne l'activation de NF- $\kappa$ B et intervient dans l'induction de l'IL-1 $\beta$ . NOD2 régule négativement la voie de signalisation de TLR2 et limite donc ainsi l'activation de NF- $\kappa$ B par TLR2. Les macrophages et les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigène capables de sécréter de l'IL-12 et de l'IL-1 $\beta$  en réponse aux MDP. Ces cellules relient le système inné au système immunitaire adaptatif. De plus, comme vu plus haut, NOD2 est également important pour la protection contre les agents pathogènes **NABHANI et collab.** [2017]. Le recrutement du complexe RIP2 / TAK1 par NOD2 est une étape cruciale dans le contrôle des agents pathogènes et de l'inflammation associée. Des données récentes suggèrent que NOD2 joue également un rôle important dans la restriction de plusieurs virus, notamment le virus respiratoire syncytial, le virus de la grippe A et le cytomégalo virus humain. En revanche, les connaissances sur le rôle du NOD2 dans les infections parasitaires ou fongiques restent limitées.

### 1.3.3 Conséquences des mutations du gène *NOD2* dans la maladie de Crohn

#### 1.3.3.1 mutations du gène *NOD2*

Actuellement, 242 loci de susceptibilité aux **MICI** ont été identifiés, dont 170 spécifiques à la **MC** **HUANG et collab.** [2017]; **LEE et collab.** [2017]; **MIRKOV et collab.** [2017]. Nombre de ces loci correspondent à des gènes dont la fonction est associée à la barrière muqueuse, à la reconnaissance bactérienne, au stress du RE (Réticulum Endoplasmique), à l'autophagie et à la régulation immunitaire. Le premier gène de susceptibilité identifié et l'un des gènes les plus étudiés est le gène *NOD2*, situé sur le chromosome 16 en 16q12. Trois SNPs (single nucleotide polymorphism) situés à l'intérieur ou à proximité de la région LRR de *NOD2* se sont révélés être directement associés à la **MC** (figure 1.9) **BARNICH et collab.** [2005]; **HUGOT et collab.** [2001]; **OGURA et collab.** [2001a]; **RIVAS et collab.** [2011]. L1007fs est une mutation frameshift par insertion C, qui conduit à une protéine *NOD2* tronquée, qui ne répond pas aux antigènes bactériens et entraîne donc une altération de l'activation de NF- $\kappa$ B. Les deux autres SNP identifiés (R702W et G908R) sont des mutations faux-sens qui modifient la reconnaissance du MDP sans affecter la localisation intracellulaire de *NOD2* **MIRKOV et collab.** [2017]. Au moins une mutation du gène *NOD2* est

retrouvée chez 30 à 40% des patients atteints de MC, contre 6 à 7% chez les témoins non atteints. De plus, les personnes présentant des mutations hétérozygotes du gène *NOD2* ont un risque de développer une MC deux à quatre fois plus élevé, alors que ce risque est de 3 à 36 fois plus élevé chez les sujets présentant des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites FEERICK et MCKERNAN [2017]; HUGOT et collab. [2001, 2007].

### 1.3.3.2 Conséquences fonctionnelles des mutations du gène *NOD2*

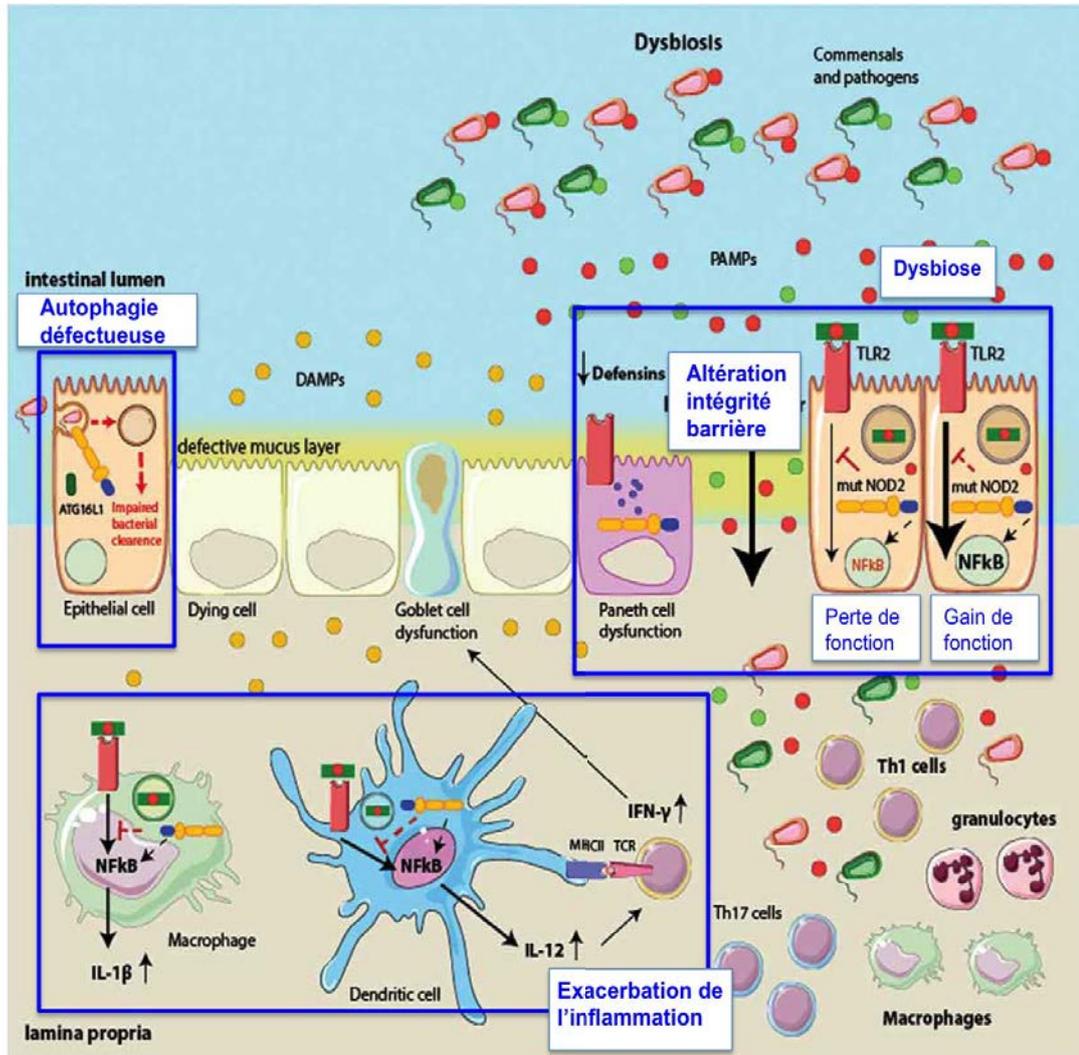


FIGURE 1.13 – Roles de *NOD2* dans la maladie de Crohn d'après DE BRUYN et VERMEIRE [2017]

### Intégrité de la barrière intestinale et homéostasie immunitaire

La figure 1.13 présente le rôle de *NOD2* dans la MC.

Dans la maladie de Crohn, les mutations de *NOD2* sont associées à une diminution de la production d' $\alpha$ -défensines et de mucus par les cellules de Paneth, entraînant une altération de l'intégrité de la barrière intestinale WEHKAMP et collab. [2005]. Cependant, l'effet direct des mutations du gène *NOD2* sur l'expression des  $\alpha$ -défensines fait aujourd'hui débat BEVINS et collab. [2009]; SIMMS et collab. [2008]; TAN et collab. [2015a]. La protéine

NOD2 mutée perd sa fonction, en effet, étant incapable de se lier au MDP, l'activation de NF- $\kappa$ B et l'expression de cytokines pro-inflammatoires sont altérées (perte de fonction). De la même manière, la protéine NOD2 mutée n'est plus capable d'inhiber la voie de signalisation TLR2 et conduit donc à une surproduction de NF- $\kappa$ B (gain de fonction). Ceci entraîne une augmentation de l'expression d'IL-12, d'IL-1 $\beta$  et d'IFN- $\gamma$  **MAEDA et collab. [2005]**, ce qui entraîne des dommages supplémentaires de la couche épithéliale et une migration des cellules immunitaires dans le tissu enflammé.

### Défaut de la réponse autophagique

Enfin, la boucle de rétroaction entre la bactérie commensale et NOD2 est perturbée par des mutations du gène *NOD2*, ce qui conduit à une dysbiose.

La voie de l'autophagie est affectée par plusieurs variants génétiques associés à la **MC**, comme les gènes *ATG16L1*, *IRGM* (immunity-related GTPase family M protein), *LRRK2* (leucine-rich repeat kinase 2) et *ULK-1* (Unc-51-like autophagy activating kinase 1) **HOEFKENS et collab. [2013]**. Les mutations du gène *NOD2* entraînent également des réponses autophagiques défectueuses en raison d'un échec du recrutement de l'ATG16L1, ce qui entraîne une clairance bactérienne altérée. En effet, les cellules dendritiques de patients atteints de **MC**, porteurs de mutations du gène *NOD2* ou du gène *ATG16L1* sont incapables d'induire l'autophagie, le trafic bactérien et la présentation de l'antigène. Ceci montre que des défauts des cellules dendritiques à présenter l'antigène peuvent causer une altération de la destruction des lysosomes et celle de la médiation immunitaire de la clairance, ceci entraînant une persistance bactérienne et donc une dysbiose **COONEY et collab. [2010]**. Il a aussi été montré que NOD2 est capable de recruter ATG16L1 sur la membrane plasmique au niveau du site d'entrée bactérien par un mécanisme indépendant de RIP2 et de NF- $\kappa$ B **TRAVASSOS et collab. [2010]**. Dans les cellules HeLa épithéliales homozygotes pour la mutation L1007fs du gène *NOD2*, NOD2 n'est pas capable de recruter ATG16L1 sur la membrane plasmique empêchant que les bactéries soient enveloppées par les autophagosomes. De plus, Homer et al. ont montré que l'activité antibactérienne est perturbée lors de la stimulation de NOD2 via les MDP dans les cellules épithéliales portant la mutation *ATG16L1* T300A, mais pas dans les macrophages ou les cellules dendritiques **HOMER et collab. [2010]**. Toutes ces recherches relient deux gènes de susceptibilité associés à la **MC** dans une seule voie fonctionnelle et fournissent la preuve du rôle joué par NOD2 dans les réponses autophagiques défectueuses.

### Dysbiose intestinale

Les patients atteints de **MC** présentent une diversité d'espèces microbiennes réduite et une composition microbienne plus instable dans le temps par rapport aux individus contrôles. Ce phénomène est appelé dysbiose microbienne **ANDOH et collab. [2012]**. Ces

modifications de la flore intestinale correspondent à une réduction du nombre de *Firmicutes* et de *Bacteroides* et une augmentation du nombre d'*actinobactéries* et de *protéobactéries* FRANK et collab. [2007]; MORGAN et collab. [2012]. Étant donné que NOD2 est capable de reconnaître à la fois les bactéries gram positives et les bactéries gram négatives, on peut supposer que les mutations du gène *NOD2* soient directement impliquées dans la dysbiose microbienne. En effet, une charge accrue de *Firmicutes* et de *Bacteroides* est observée dans les biopsies iléales de patients atteints de MC présentant une mutation homozygote L1007fs du gène *NOD2* REHMAN et collab. [2011]. Des mutations de *NOD2* ont également été associées à une charge réduite de *Faecalibacterium prausnitzii* (Firmicutes) et d'*Escherichia coli* (Protéobactéries) FRANK et collab. [2011]. Les mutations de *NOD2* sont aussi corrélées à une augmentation des Enterobacteriaceae pathogènes KNIGHTS et collab. [2014].

## 1.4 Justification et objectif de la thèse

Nous avons vu précédemment que la Maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) résultant de l'interaction de facteurs environnementaux, y compris le microbiote intestinal, avec les mécanismes immunitaires de l'hôte chez des individus génétiquement prédisposés QIN [2012]. Le gène *NOD2*, impliqué dans les réponses immunitaires innées contre le peptidoglycane bactérien, est étroitement associé à la MC avec des OR allant de 3 à 36 selon le génotype et a été initialement identifié par des analyses de liaisons génétiques HUGOT et collab. [2001]. D'autres études rapportées précédemment ont montré l'implication de variants rares du gène *NOD2* dans la prédisposition génétique à la MC LESAGE et collab. [2002]; RIVAS et collab. [2011]. Les études d'association pangénomique (GWAS) ont rapporté plus de 200 loci de susceptibilité génétique à la MC, mais ils n'expliquent que 20 % de la variance génétique de la MC, suggérant que d'autres loci resteraient à découvrir FRANKE et collab. [2010]; MOMOZAWA et collab. [2011] comme par exemple des variants rares non ciblés par les études GWAS.

Le registre EPIMAD couvre une grande partie de la zone septentrionale de la France (six millions d'habitants) et recueille tous les cas incidents de MC GOWER-ROUSSEAU et collab. [1994, 2013]. Les données des familles multiplexes (familles définies par la présence de trois ou plus de trois apparentés au premier degré atteints de MC) issues du registre EPIMAD ont été analysées. Il a été précédemment rapporté que dans les 22 familles multiplexes EPIMAD génotypées pour les 3 mutations majeures du gène *NOD2* une fréquence élevée des variants du gène *NOD2* : R702W, G908R et L1007fs, pouvait expliquer la fréquence élevée de MC dans ces familles VASSEUR et collab. [2012]. Cependant, quelques familles multiplexes EPIMAD ne présentaient aucun des variants R702W, G908R et L1007fs. Ainsi, dans ces familles, une prévalence élevée de patients atteints de la MC pourrait dépendre d'autres facteurs génétiques, variants de susceptibilité qui seraient encore à dé-

terminer. Afin d'identifier de nouvelles variations génétiques ayant un effet majeur dans la MC, un protocole de Whole exome séquencing (WES) a été effectué sur l'une de ces familles multiplexes EPIMAD présentant quatre sujets atteints de MC sur deux générations. Les résultats de cette étude sont présentés dans ce mémoire de thèse de doctorat.

## 1.5 Références

- ABBOTT, D. W., Y. YANG, J. E. HUTTI, S. MADHAVARAPU, M. A. KELLIHER et L. C. CANTLEY. 2007, «Coordinated regulation of toll like receptor and nod2 signaling by k63 linked polyubiquitin chains», *Molecular and Cellular Biology*, vol. 27, n° 17, p. 6012–6025. [23](#)
- ADHIKARI, A., M. XU et Z. CHEN. 2007, «Ubiquitin mediated activation of tak1 and ikk», *Oncogene*, vol. 26, n° 22, p. 3214–3226. [23](#)
- AFZALI, A. et R. K. CROSS. 2016, «Racial and ethnic minorities with inflammatory bowel disease in the united states : A systematic review of disease characteristics and differences», *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 22, n° 8, p. 2023–2040. [6](#)
- ANANTHAKRISHNAN, A. N. 2015, «Epidemiology and risk factors for ibd», *nature reviews gastroenterology and hepatology*, vol. 12, n° 4, p. 205–217. [ix](#), [6](#), [12](#)
- ANANTHAKRISHNAN, A. N., L. M. HIGUCHI, E. S. HUANG, H. KHALILI, J. M. RICHTER, C. S. FUCHS et A. T. CHAN. 2012, «Aspirin, nonsteroidal anti inflammatory drug use, and risk for crohn disease and ulcerative colitis : A cohort study», *Annals of Internal Medicine*, vol. 156, n° 5, p. 350–359. [10](#)
- ANDOH, A., H. KUZUOKA, T. TSUJIKAWA, S. NAKAMURA, F. HIRAI, Y. SUZUKI, Y. MATSUI, TOSHIYUKI ANDFUJIYAMA et T. MATSUMOTO. 2012, «Multicenter analysis of fecal microbiota profiles in japanese patients with crohn's disease», *Journal of Gastroenterology*, vol. 47, n° 12, p. 1298–1307. [29](#)
- APPLEYARD, G., CAROLINE B.AND HERNANDEZ et C. F. RIOS BEDOYA. 2004, «Basic epidemiology of inflammatory bowel disease in puerto rico», *Inflammatory Bowel Disease*, vol. 10, n° 2, p. 106–111. [5](#)
- AUVIN, S., F. MOLINIÉ, C. GOWER-ROUSSEAU, F. BRAZIER, V. MERLE, B. GRANDBASTIEN, R. MARTI, E. LEREBOURS, J.-L. DUPAS, J.-F. COLOMBEL, J.-L. SALOMEZ, A. CORTOT et D. TURCK. 2005, «Incidence, clinical presentation and location at diagnosis of pediatric inflammatory bowel disease : A prospective population-based study in northern france (1988-1999)», *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, vol. 41, n° 1, p. 49–55.

- BALASUBRAMANIAN, I. et N. GAO. 2017, «From sensing to shaping microbiota : insights into the role of nod2 in intestinal homeostasis and progression of crohn's disease», *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*, vol. 313, n° 1, p. G7–G13. [23](#)
- BARNICH, N., J. E. AGUIRRE, H.-C. REINECKER, R. XAVIER et D. K. PODOLSKY. 2005, «Membrane recruitment of nod2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor  $\kappa$ b activation in muramyl dipeptide recognition», *Journal of Cell Biology*, vol. 170, n° 1, p. 21–26. [27](#)
- BARREAU, F., C. MADRE, U. MEINZER, D. BERREBI, M. DUSSAILLANT, F. MERLIN, L. ECKMANN, M. KARIN, G. STERKERS, S. BONACORSI, T. LESUFFLEUR et J.-P. HUGOT. 2010, «Nod2 regulates the host response towards microflora by modulating t cell function and epithelial permeability in mouse peyer's patches», *Gut*, vol. 59, n° 2, p. 207–217. [19](#)
- BAUMGART, D., D. METZKE, O. GUCKELBERGER, A. PASCHER, C. GRÖTZINGER, I. PRZESDZING, Y. DÖRFFEL, J. SCHMITZ et S. THOMAS. 2010, «Aberrant plasmacytoid dendritic cell distribution and function in patients with crohn's disease and ulcerative colitis», *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 166, n° 1, p. 46–54. [20](#)
- BAUMGART, D., S. THOMAS, I. PRZESDZING, D. METZKE, C. BIELECKI, S. LEHMANN, S. LEHNARDT, Y. DÖRFFEL, A. STURM, A. SCHEFFOLD, J. SCHMITZ et R. A. 2009, «Exaggerated inflammatory response of primary human myeloid dendritic cells to lipopolysaccharide in patients with inflammatory bowel disease.», *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 157, n° 3, p. 423–436. [20](#)
- BAUMGART, D., D.C.AND METZKE, J. SCHMITZ, A. SCHEFFOLD, A. STURM, B. WIEDENMANN et A. DIGNASS. 2005, «Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells.», *Gut*, vol. 54, n° 2, p. 228–236. [20](#)
- BAUMGART, D. C. et W. J. SANDBORN. 2012, «Crohn's disease», *Lancet*, vol. 380, n° 9853, p. 1590–1605. [ix](#), [8](#), [13](#), [15](#)
- BAUMGART, M., B. DOGAN, M. RISHNIW, G. WEITZMAN, B. BOSWORTH, R. YANTISS, R. H. ORSI, M. WIEDMANN, P. MCDONOUGH, S. G. KIM, D. BERG, Y. SCHUKKEN, E. SCHERL et K. W. SIMPSON. 2007, «Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive escherichia coli of novel phylogeny relative to depletion of clostridiales in crohn's disease involving the ileum», *The ISME Journal*, vol. 1, n° 5, p. 403–418. [10](#)
- BEG, A., T. FINCO, P. NANTERMET et A. J. BALDWIN. 1993, «Tumor necrosis factor and interleukin 1 lead to phosphorylation and loss of ik  $\beta$  : a mechanism for nf  $\kappa$ b activation.», *Molecular and Cellular Biology*, vol. 13, n° 6, p. 3301–3310. [25](#)

- BENCHIMOL, E., A. GUTTMANN, A. GRIFFITHS, L. RABENECK, D. MACK, H. BRILL, J. HOWARD, J. GUAN et T. TO. 2009, «Increasing incidence of paediatric inflammatory bowel disease in ontario, canada : evidence from health administrative data», *Gut*, vol. 58, n° 11, p. 1490–1497. [6](#)
- BENJAMIN, J. L., R. SUMPTER, B. LEVINE et L. V. HOOPER. 2013, «Intestinal epithelial autophagy is essential for host defense against invasive bacteria», *Cell Host and Microbe*, vol. 13, n° 6, p. 723–734. [19](#)
- BEQUET, E., H. SARTER, M. FUMERY, F. VASSEUR, L. ARMENGOL-DEBEIR, B. PARIENTE, D. LEY, C. SPYCKERELLE, H. COEVOET, L. LABERENNE JE. AND, PEYRIN-BIROULET, G. SAVOYE, D. TURCK, C. GOWER-ROUSSEAU et E. GROUP. 2017, «Incidence and phenotype at diagnosis of very-early-onset compared with later-onset paediatric inflammatory bowel disease : A population-based study [1988–2011]», *Journal of Crohn's and Colitis*, vol. 11, n° 5, p. 519–526. [7](#)
- BERNSTEIN, C. N. et F. SHANAHAN. 2008, «Disorders of a modern lifestyle : reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases», *Gut*, vol. 57, n° 9, p. 1185–1191. [6](#)
- BERTRAND, M. J., K. DOIRON, K. LABBÉ, R. G. KORNELUK, P. A. BARKER et M. SALEH. 2009, «Cellular inhibitors of apoptosis ciap1 and ciap2 are required for innate immunity signaling by the pattern recognition receptors nod1 and nod2», *Immunity*, vol. 30, n° 6, p. 789–801. [23](#)
- BEVINS, C., E. STANGE et J. WEHKAMP. 2009, «Decreased paneth cell defensin expression in ileal crohn's disease is independent of inflammation, but linked to the nod2 1007fs genotype», *Gut*, vol. 58, n° 6, p. 882–883. [25](#), [28](#)
- BIANCO, A. M., M. GIRARDELLI et A. TOMMASINI. 2011, «Genetics of inflammatory bowel disease from multifactorial to monogenic forms», *World Journal of Gastroenterology*, vol. 21, n° 43, p. 12 296–12 310. [7](#)
- BISWAS, A., Y.-J. LIU, L. HAO, A. MIZOGUCHI, C. L. SALZMAN, NITA H. AND BEVINS et K. S. KOBAYASHI. 2010, «Induction and rescue of nod2 dependent th1 driven granulomatous inflammation of the ileum», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, n° 33, p. 14 739–14 744. [19](#)
- BOLTIN, D., T. PERETS et Y. VILKIN, ALEX AND NIV. 2013, «Mucin function in inflammatory bowel disease : An update», *Journal of Clinical Gastroenterology*, vol. 47, n° 2, p. 106–111. [18](#)
- BONEN, D. et J. CHO. 2003, «The genetics of inflammatory bowel disease», *Gastroenterology*, vol. 124, n° 2, p. 521–536. [6](#)

- BRANDL, K., G. PLITAS, B. SCHNABL, R. P. DEMATTEO et E. G. PAMER. 2007, «Myd88 mediated signals induce the bactericidal lectin regiiiγ and protect mice against intestinal listeria monocytogenes infection», *Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, n° 8, p. 1891–1900. [14](#)
- BRANDTZAEG, P., H. S. CARLSEN et T. S. HALSTENSEN. 2006, «The b cell system in inflammatory bowel disease», *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 579, p. 149–167. [20](#)
- DE BRUYN, M. et S. VERMEIRE. 2017, «Nod2 and bacterial recognition as therapeutic targets for crohn’s disease», *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, vol. 21, n° 12, p. 1123–1139. [ix](#), [24](#), [26](#), [28](#)
- BUHNER, S., C. BUNING, J. GENSCHEL, K. KLING, D. HERRMANN, A. DIGNASS, I. KUECHLER, S. KRUEGER, H. SCHMIDT et H. LOCHS. 2006, «Genetic basis for increased intestinal permeability in families with crohn’s disease : role of card15 3020insc mutation?», *Gut*, vol. 55, n° 3, p. 342–347. [19](#)
- BUISINE, M., P. DESREUMAUX, V. DEBAILLEUL, L. GAMBIEZ, K. GEBOES, N. ECTORS, M. DELESCAUT, P. DEGAND, J. AUBERT, J. COLOMBEL et N. PORCHET. 1999, «Abnormalities in mucin gene expression in crohn’s disease», *Inflammatory Bowel Disease*, vol. 5, n° 1, p. 24–32. [19](#)
- CADWELL, J. Y. A. S. L., KEN ANDLIU, H. MIYOSHI, J. LOH, J. K. LENNERZ, C. KISHI, W. KC, J. A. CARRERO, S. HUNT, C. D. STONE, E. M. BRUNT, R. J. XAVIER, B. P. SLECKMAN, E. LI, N. MIZUSHIMA, S. T. S. et H. W. VIRGIN 4TH. 2008, «A key role for autophagy and the autophagy gene atg16l1 in mouse and human intestinal paneth cells», *Nature*, vol. 456, n° 7219, p. 259–263. [19](#)
- CHAMAILLARD, M., M. HASHIMOTO, Y. HORIE, J. MASUMOTO, S. QIU, L. SAAB, Y. OGURA, A. KAWASAKI, K. FUKASE, S. KUSUMOTO, M. A. VALVANO, S. J. FOSTER, T. W. MAK, G. NUÑEZ et N. INOHARA. 2003, «An essential role for nod1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid», *Nature Immunology*, vol. 4, n° 7, p. 702–707. [21](#)
- CHARPENTIER, C., J. SALLERON, G. SAVOYE, M. FUMERY, V. MERLE, J.-E. LABERENNE, F. VASSEUR, J.-L. DUPAS, A. CORTOT, L. DAUCHET, L. PEYRIN-BIROULET, E. LEREBOURS, J.-F. COLOMBEL et C. GOWER-ROUSSEAU. 2014, «Natural history of elderly-onset inflammatory bowel disease : a population-based cohort study», *Gut*, vol. 63, n° 3, p. 423–432. [9](#)
- CHASSAING, B., O. KOREN, J. K. GOODRICH, A. C. POOLE, S. SRINIVASAN, L. R. E. et A. T. GEWIRTZ. 2015, «Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome», *Nature*, vol. 519, n° 7541, p. 92–96. [18](#)

- CHEN, N., P. XIA, S. LI, T. ZHANG, T. T. WANG et J. ZHU. 2017, «Rna sensors of the innate immune system and their detection of pathogens», *IUBMB Life*, vol. 69, n° 5, p. 297–304. [23](#)
- COLLISON, L. W., A. L. CHATURVEDI, VANDANA AND HENDERSON, P. R. GIACOMIN, C. GUY, J. BANKOTI, D. FINKELSTEIN, K. FORBES, C. J. WORKMAN, S. A. BROWN, J. E. REHG, M. L. JONES, H.-T. NI, D. ARTIS, M. J. TURK et D. A. A. VIGNALI. 2010, «IL 35 mediated induction of a potent regulatory t cell population», *Nature Immunology*, vol. 11, n° 12, p. 1093–1101. [20](#)
- COONEY, R., J. BAKER, O. BRAIN, B. DANIS, T. PICHULIK, P. ALLAN, D. J. P. FERGUSON, B. J. CAMPBELL, D. JEWELL et A. SIMMONS. 2010, «Nod2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation», *Nature Medicine*, vol. 16, n° 1, p. 90–97. [29](#)
- CORNISH, J. A., E. TAN, C. SIMILLIS, S. K. CLARK, J. TEARE et P. P. TEKKIS. 2008, «The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease : a meta analysis.», *American Journal of Gastroenterology*, vol. 103, n° 9, p. 2394–2400. [10](#)
- COSNES, J., L. BEAUGERIE, F. CARBONNEL et J. P. GENDRE. 2001, «Smoking cessation and the course of crohn's disease : an intervention study», *Gastroenterology*, vol. 120, p. 1093–1099. [10](#)
- CROHN, B. B., L. GINZBURG et G. D. OPPENHEIMER. 1932, «Regional ileitis. a pathologic and clinical entity», *JAMA*, vol. 99, n° 16, p. 1323–1329. [3](#)
- DAMGAARD, R. B., U. NACHBUR, M. YABA, W. WEI-LYNNWONG, B. K. FIIL, M. KASTIRR, E. RIESER, J. A. RICKARD, A. BANKOVACKI, C. PESCHE, J. RULAND, S. BEKKER-JENSEN, N. MAILAND, T. KAUFMANN, A. STRASSER, H. WALCZAK, J. SILKE, P. J. JOST et M. GYRD-HANSEN. 2012, «The ubiquitin ligase xiap recruits lubac for nod2 signaling in inflammation and innate immunity», *Molecular Cell*, vol. 46, n° 6, p. 746–758. [23](#)
- DARFEUILLE MICHAUD, A., J. BOUDEAU, P. BULOIS, C. NEUT, A. L. GLASSER, N. BARNICH, M. A. BRINGER, A. SWIDSINSKI, L. BEAUGERIE et J. F. COLOMBEL. 2004, «High prevalence of adherent invasive escherichia coli associated with ileal mucosa in crohn's disease.», *Gastroenterology*, vol. 127, n° 2, p. 412–421. [10](#)
- DURICOVA, D., M. FUMERY, V. ANNESE, P. LAKATOS, L. PEYRIN-BIROULET et C. GOWER-ROUSSEAU. 2017, «The natural history of crohn's disease in children : a review of population-based studies», *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 29, n° 2, p. 125–134. [7](#), [9](#)
- FEERICK, C. L. et D. P. MCKERNAN. 2017, «Understanding the regulation of pattern recognition receptors in inflammatory diseases a 'nod' in the right direction», *Immunology*, vol. 150, n° 3, p. 237–247. [25](#), [27](#), [28](#)

FRANK, D. N., C. E. ROBERTSON, C. M. HAMM, Z. KPADEH, T. ZHANG, H. CHEN, W. ZHU, R. B. SARTOR, E. C. BOEDEKER, N. HARPAZ, N. R. PACE et E. LI. 2011, «Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal associated microbiota in inflammatory bowel diseases», *Inflammatory Bowel Disease*, vol. 17, n° 1, p. 179–184.

30

FRANK, D. N., A. L. ST. AMAND, R. A. FELDMAN, E. C. BOEDEKER, N. HARPAZ et N. R. PACE. 2007, «Molecular phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, n° 34, p. 13 780–13 785. 10, 30

FRANKE, A., D. P. B. MCGOVERN, J. C. BARRETT, K. WANG, G. L. RADFORD SMITH, T. AHMAD, C. W. LEES, T. BALSCHUN, J. LEE, R. ROBERTS, C. A. ANDERSON, J. C. BIS, S. BUMPSTEAD, D. ELLINGHAUS, E. M. FESTEN, M. GEORGES, T. GREEN, T. HARITUNIAN, L. JOSTINS, A. LATIANO, C. G. MATHEW, G. W. MONTGOMERY, N. J. PRESCOTT, S. RAYCHAUDHURI, J. I. ROTTER, P. SCHUMM, Y. SHARMA, L. A. SIMMS, K. D. TAYLOR, D. WHITEMAN, C. WIJMENGA, R. N. BALDASSANO, M. BARCLAY, T. M. BAYLESS, S. BRAND, C. BÜNING, A. COHEN, J. F. COLOMBEL, M. COTTONE, L. STRONATI, T. DENSON, M. DE VOS, R. D'INCA, M. DUBINSKY, C. EDWARDS, T. FLORIN, D. FRANCHIMONT, R. GEARRY, J. GLAS, A. VAN GOSSUM, S. L. GUTHERY, J. HALFVARSON, H. W. VERSPAGET, J. P. HUGOT, A. KARBAN, D. LAUKENS, I. LAWRENCE, M. LEMANN, A. LEVINE, C. LIBIOLLE, E. LOUIS, C. MOWAT, W. NEWMAN, J. PANÉS, A. PHILLIPS, D. D. PROCTOR, M. REGUEIRO, R. RUSSELL, P. RUTGEERTS, J. SANDERSON, M. SANS, F. SEIBOLD, A. H. STEINHART, P. C. F. STOKKERS, L. TORKVIST, G. KULLAK UBlick, D. WILSON, T. WALTERS, S. R. TARGAN, S. R. BRANT, J. D. RIOUX, M. D'AMATO, R. K. WEERSMA, S. KUGATHASAN, A. M. GRIFFITHS, J. C. MANSFIELD, S. VERMEIRE, R. H. DUERR, M. S. SILVERBERG, J. SATSANGI, S. SCHREIBER, J. H. CHO, V. ANNESE, H. A. M. J. HAKONARSON et P. MILES. 2010, «Genome wide meta analysis increases to 71 the number of confirmed crohn's disease susceptibility loci», *Nature Genetics*, vol. 42, n° 12, p. 1118–1125. 9, 19, 20, 30

FRIDH, V. et K. RITTINGER. 2012, «The tandem cards of nod2 : Intramolecular interactions and recognition of rip2», *PLoS One*, vol. 7, n° 3, p. e34 375. 23

FRITZ, J. et S. GIRARDIN. 2005, «How toll like receptors and nod-like receptors contribute to innate immunity in mammals.», *Journal of Endotoxin Res.*, vol. 11, n° 6, p. 390–394.

22

GAJENDRAN, M., P. LOGANATHAN, A. P. CATINELLA et J. G. HASHASH. 2012, «A comprehensive review and update on crohn's disease», *Disease-a-Month*, vol. 64, n° 2, p. 20–57. 3

GEARRY, R. B., A. RICHARDSON, C. M. A. FRAMPTON, J. A. COLLETT, M. J. BURT, B. A. CHAPMAN et M. L. BARCLAY. 2006, «High incidence of crohn's disease in canterbury,

new zealand : Results of an epidemiologic study», *Inflammatory Bowel Disease*, vol. 12, n° 10, p. 936–943. [5](#)

GENIN, M., M. FUMERY, F. OCCELLI, G. SAVOYE, B. PARIENTE, L. DAUCHET, C. VIGNAL, M. BODY-MALAPEL, J. GIOVANNELLI, H. SARTER, C. GOWER ROUSSEAU et G. FICHEUR. 2019, «Description et facteurs associés à l'hétérogénéité spatiale de la prévalence en 2014 de la maladie de crohn en france : une étude écologique menée à partir des données pmsi», *Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive*, vol. communication orale, n° 22 mars, p. CO.122. [10](#)

GHIONE, S., H. SARTER, M. FUMERY, L. ARMENGOL-DEBEIR, G. SAVOYE, D. LEY, C. SPYCKERELLE, B. PARIENTE, L. PEYRIN-BIROULET, C. TURCK, DOMINIQUE AND GOWER-ROUSSEAU et THE EPIMAD GROUP. 2018, «Dramatic increase in incidence of ulcerative colitis and crohn's disease (1988-2011) : A population-based study of french adolescents», *The American Journal of Gastroenterology*, vol. 113, n° 2, p. 265–272. [6](#)

GIRARDIN, S. E., I. G. BONECA, L. A. M. CARNEIRO, A. ANTIGNAC, M. JÉHANNO, J. VIALA, K. TEDIN, M.-K. TAHA, A. LABIGNE, U. ZÄTHRINGER, A. J. COYLE, P. S. DiSTEFANO, J. BERTIN, P. J. SANSONETTI et D. J. PHILPOTT. 2003a, «Nod1 detects a unique muropeptide from gram negative bacterial peptidoglycan», *Science*, vol. 300, n° 5625, p. 1584–1587. [21](#)

GIRARDIN, S. E., I. G. BONECA, J. VIALA, M. CHAMAILLARD, A. LABIGNE, G. THOMAS, D. J. PHILPOTT et P. J. SANSONETTI. 2003b, «Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (mdp) detection», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, n° 11, p. 8869–8872. [22](#)

GIRARDIN, S. E., M. JÉHANNO, D. MENGIN-LECREUL, P. J. SANSONETTI, P. M. ALZARI et D. J. PHILPOTT. 2005, «Identification of the critical residues involved in peptidoglycan detection by nod1», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, n° 46, p. 38 648–38 656. [22](#)

GIRARDIN, S. E., R. TOURNEBIZE, M. MAVRIS, A. PAGE, X. LI, G. R. STARK, J. BERTIN, P. S. DiSTEFANO, M. YANIV, P. J. SANSONETTI et D. J. PHILPOTT. 2001, «Card4/nod1 mediates nfkb and jnk activation by invasive shigella flexneri», *EMBO Reports*, vol. 2, n° 8, p. 736–742. [22](#)

GIRARDIN, S. E., L. H. TRAVASSOS, M. HERVÉ, D. BLANOT, I. G. BONECA, D. J. PHILPOTT, P. J. SANSONETTI et D. MENGIN-LECREULX. 2003c, «Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by nod1 and nod2», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, n° 43, p. 41 702–41 708. [21](#), [22](#)

GLOCKER, E.-O., D. KOTLARZ, K. BOZTUG, E. M. GERTZ, A. A. SCHÄFFER, F. NOYAN, M. PERRO, J. DIESTELHORST, A. ALLROTH, D. MURUGAN, N. HÄTSCHER, D. PFEIFER,

- K.-W. SYKORA, M. SAUER, H. KREIPE, M. LACHER, R. NUSTEDE, C. WOELLNER, U. BAUMANN, U. SALZER, S. KOLETZKO, N. SHAH, A. W. SEGAL, A. SAUERBREY, S. BUDERUS, S. B. SNAPPER, B. GRIMBACHER et C. KLEIN. 2009, «Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin 10 receptor», *The New England Journal of Medicine*, vol. 361, n° 21, p. 2033–2045. [20](#)
- GOWER-ROUSSEAU, C., J.-L. SALOMEZ, J.-L. DUPAS, R. MARTI, M. NUTTENS, A. VOTTE, M. LEMAHIEU, B. LEMAIRE, J. COLOMBEL et A. CORTOT. 1994, «Incidence of inflammatory bowel disease in northern france (1988–1990).», *Gut*, vol. 35, n° 10, p. 1433–1438. [30](#)
- GOWER-ROUSSEAU, C., F. VASSEUR, M. FUMERY, G. SAVOYE, J. SALLERON, L. DAUCHET, D. TURCK, A. CORTOT, L. PEYRIN-BIROULET et J. F. COLOMBEL. 2013, «Epidemiology of inflammatory bowel diseases : New insights from a french population-based registry (epimad)», *Digestive and Liver Disease*, vol. 45, n° 2, p. 89–94. [30](#)
- GUTIERREZ, O., C. PIPAON, N. INOHARA, A. FONTALBA, Y. OGURA, F. PROSPER, G. NUÑEZ et J. L. FERNANDEZ-LUNA. 2002, «Induction of nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor  $\kappa$ b activation», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 1, n° 277, p. 41 701–41 705. [21](#)
- HANSEN, J. J. 2015, «Immune responses to intestinal microbes in inflammatory bowel diseases», *Current Allergy and Asthma Reports*, vol. 15, n° 10, p. 61. [20](#)
- HART, A. L., H. O. AL-HASSI, R. J. RIGBY, S. J. BELL, A. V. EMMANUEL, S. C. KNIGHT, M. A. KAMM et A. J. STAGG. 2005, «Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases», *Gastroenterology*, vol. 129, n° 1, p. 50–65. [20](#)
- HARTON, J. A., M. W. LINHOFF, J. ZHANG et J. P.-Y. TING. 2002, «Cutting edge : Caterpillar : A large family of mammalian genes containing card, pyrin, nucleotide binding, and leucine rich repeat domains», *The Journal of Immunology*, vol. 169, n° 8, p. 4088–4093. [21](#)
- HASEGAWA, M., Y. FUJIMOTO, P. C. LUCAS, H. NAKANO, K. FUKASE, G. NUÑEZ et N. INOHARA. 2008, «A critical role of rick/rip2 polyubiquitination in nod-induced nf  $\kappa$ b activation», *EMBO Reports*, vol. 27, n° 2, p. 373–383. [23](#)
- HILDEBRAND, H., Y. FINKEL, L. GRAHNQUIST, J. LINDHOLM, A. EKBOM et J. ASKLING. 2003, «Changing pattern of paediatric inflammatory bowel disease in northern stockholm 1990–2001», *Gut*, vol. 52, n° 10, p. 1432–1434. [6](#)
- HIRAHARA, K. et T. NAKAYAMA. 2016, «Cd4+ t cell subsets in inflammatory diseases : beyond the th1/th2 paradigm», *International Immunology*, vol. 28, n° 4, p. 163–171. [20](#)

- HOEFKENS, E., K. NYS, J. M. JOHN, K. VAN STEEN, I. ARIJS, J. VAN DER GOTEN, G. VAN ASSCHE, P. AGOSTINIS, P. RUTGEERTS, S. VERMEIRE et I. CLEYNEN. 2013, «Genetic association and functional role of crohn disease risk alleles involved in microbial sensing, autophagy, and endoplasmic reticulum (er) stress», *Autophagy*, vol. 9, n° 12, p. 2046–5205. [29](#)
- HOMER, C. R., N. A. RICHMOND, AMY L. AND. REBERT et C. ACHKAR, JEAN-PAUL ANDE McDONALD. 2010, «Atg16l1 and nod2 interact in an autophagy dependent antibacterial pathway implicated in crohn's disease pathogenesis», *Gastroenterology*, vol. 139, n° 5, p. 1630–1641. [29](#)
- HOU, J. K., H. EL SERAG et S. THIRUMURTHI. 2009, «Distribution and manifestations of inflammatory bowel disease in asians, hispanics, and african americans : A systematic review», *American Journal of Gastroenterology*, vol. 104, n° 8, p. 2100–2109. [5](#)
- HUANG, H., M. FANG, L. JOSTINS, M. U. MIRKOV, G. BOUCHER, C. A. ANDERSON, V. ANDERSEN, I. CLEYNEN, A. CORTES, F. CRINS, M. D'AMATO, V. DEFFONTAINE, J. DMITRIEVA, E. DOCAMPO, M. ELANSARY, K. K.-H. FARH, A. FRANKE, A.-S. GORI, P. GOYETTE, J. HALFVARSON, T. HARITUNIANS, J. KNIGHT, I. C. LAWRENCE, C. W. LEES, E. LOUIS, R. MARIMAN, T. MEUWISSEN, M. MNI, Y. MOMOZAWA, M. PARKES, S. L. SPAIN, E. THÉÂTRE, G. TRYNKA, J. SATSANGI, S. VAN SOMMEREN, S. VERMEIRE, R. J. XAVIER, R. K. WEERSMA, R. H. DUERR, C. G. MATHEW, J. D. RIOUX, D. P. B. MCGOVERN, J. H. CHO, M. GEORGES, M. J. DALY et J. C. BARRETT. 2017, «Fine mapping inflammatory bowel disease loci to single variant resolution», *Nature*, vol. 547, n° 7662, p. 173–178. [27](#)
- HUGOT, J. P., M. CHAMAILLARD, H. ZOUALI, S. LESAGE, J. P. CÉZARD, J. BELAICHE, S. ALMER, C. TYSK, C. A. O'MORAIN, M. GASSULL, V. BINDER, Y. FINKEL, A. CORTOT, R. MODIGLIANI, P. LAURENT PUIG, C. GOWER ROUSSEAU, J. MACRY, J. F. COLOMBEL, M. SAHBATOU et G. THOMAS. 2001, «Association of nod2 leucine rich repeat variants with susceptibility to crohn's disease», *Nature*, vol. 411, n° 6837, p. 599–603. [9](#), [19](#), [27](#), [28](#), [30](#)
- HUGOT, J. P., P. LAURENT PUIG, C. GOWER ROUSSEAU, J. M. OLSON, J. C. LEE, L. BEAUGERIE, I. NAOM, J. L. DUPAS, A. V. GOSSUM, M. ORHOLM, C. BONAITI PELLIE, J. WEISSENBACH, C. G. MATHEW, J. E. LENNARD JONES, A. CORTOT, J. F. COLOMBEL et G. THOMAS. 1996, «Mapping of a susceptibility locus for crohn's disease on chromosome 16», *Nature*, vol. 379, n° 6568, p. 821–823. [9](#)
- HUGOT, J.-P., I. ZACCARIA, J. CAVANAUGH, H. YANG, S. VERMEIRE, M. LAPPALAINEN, S. STEFAN, V. ANNESE, D. JEWELL, E. FOWLER, S. BRANT, M. SILVERBERG, J. CHO, J. RIOUX, J. SATSANGI et M. PARKES. 2007, «Prevalence of card15/nod2 mutations in caucasian healthy people», *American Journal of Gastroenterology*, vol. 102, n° 6, p. 1259–1267. [28](#)

- ILIEV, I., I. SPADONI, E. MILETI, G. MATTEOLI, A. SONZOGNI, G. SAMPIETRO, D. FOSCHI, F. CAPRIOLI, G. VIALE et M. RESCIGNO. 2009, «Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells.», *Gut*, vol. 58, n° 11, p. 1481–1489. [20](#)
- INOHARA, N., T. KOSEKI, L. DEL PESO, Y. HU, C. YEE, S. CHEN, R. CARRIO, J. MERINO, D. LIU, J. NI et G. NÚÑEZ. 1999, «Nod1, an apaf1 like activator of caspase9 and nuclear factor  $\kappa$ b», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, n° 21, p. 14 560–14 567. [21](#)
- INOHARA, N. et G. NUÑEZ. 2001, «The nod : a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens», *Oncogene*, vol. 20, n° 44, p. 6473–8641. [21](#)
- INOHARA, N., Y. OGURA, A. FONTALBA, O. GUTIERREZ, F. PONS, J. CRESPO, K. FUKASE, S. INAMURA, S. KUSUMOTO, M. HASHIMOTO, S. J. FOSTER, A. P. MORAN, J. L. FERNANDEZ-LUNA et G. NUÑEZ. 2003, «Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through nod2. implications for crohn's disease.», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, n° 8, p. 5509–5512. [22](#)
- JAKOPIN, Z. 2014, «Nucleotide binding oligomerization domain (nod) inhibitors : A rational approach toward inhibition of nod signaling pathway.», *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 57, n° 16, p. 6897–6918. [25](#)
- VON KAMPEN, O., S. LIPINSKI, A. TILL, S. J. MARTIN, W. NIETFIELD, H. LEHRACH, S. SCHREIBER et P. ROSENSTIEL. 2010, «Caspase recruitment domain containing protein 8 (card8) negatively regulates nod2 mediated signaling», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, n° 26, p. 19 921–19 926. [25](#)
- KAPLAN, G. G. 2015, «The global burden of ibd : from 2015 to 2025», *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, vol. 12, n° 12, p. 720–727. [5](#)
- KAPLAN, G. G., J. HUBBARD, J. KORZENIK, B. E. SANDS, R. PANACCIONE, S. GHOSH, A. J. WHEELER et P. J. VILLENEUVE. 2010, «The inflammatory bowel diseases and ambient air pollution : A novel association», *American Journal of Gastroenterology*, vol. 105, n° 11, p. 2412–24 193. [10](#)
- KAPLAN, G. G. et S. C. NG. 2017, «Understanding and preventing the global increase of inflammatory bowel disease», *Gastroenterology*, vol. 452, n° 2, p. 313–321. [5](#), [6](#)
- KARBAN, A., M. ITAY, O. DAVIDOVICH, E. LESHINSKY-SILVER, G. KIMMEL, H. FIDDER, R. SHAMIR, M. WATERMAN, R. ELIAKIM et A. LEVINE. 2007, «Risk factors for perianal crohn's disease : The role of genotype, phenotype, and ethnicity», *American Journal of Gastroenterology*, vol. 102, n° 8, p. 1702–1708. [6](#)
- KASER, A., A.-H. LEE, A. FRANKE, J. N. GLICKMAN, S. ZEISSIG, H. TILG, E. E. NIEUWENHUIS, D. E. HIGGINS, S. SCHREIBER, L. H. GLIMCHER et R. S. BLUMBERG. 2008, «Xbp1

- links er stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease», *Cell*, vol. 134, n° 5, p. 743–756. [19](#)
- KESHAV, S. 2006, «Paneth cells : leukocyte like mediators of innate immunity in the intestine», *Journal of Leucocyte Biology*, vol. 80, n° 3, p. 500–508. [14](#)
- KHAN, R., A. LAWSON, L. MINNICH, K. MARTIN, A. NASIR, M. EMMETT et C. J. WELCH, UDALL. 2009, «Gastrointestinal norovirus infection associated with exacerbation of inflammatory bowel disease», *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, vol. 48, n° 3, p. 328–333. [11](#)
- KNIGHTS, D., M. S. SILVERBERG, R. K. WEERSMA, D. GEVERS, G. DIJKSTRA, H. HUANG, A. D. TYLER, S. VAN SOMMEREN, F. IMHANN, J. M. STEMPAK, H. HUANG, P. VANGAY, G. A. AL-GHALITH, C. RUSSELL, J. SAUK, J. KNIGHT, M. J. DALY, C. HUTTENHOWER et R. J. XAVIER. 2014, «Complex host genetics influence the microbiome in inflammatory bowel disease», *Genome Medicine*, vol. 6, n° 12, p. 107. [30](#)
- KOSTIC, A. D., R. J. XAVIER et D. GEVERS. 2014, «The microbiome in inflammatory bowel disease : Current status and the future ahead», *Gastroenterology*, vol. 146, n° 6, p. 1489–1499. [10](#)
- KRIEG, A., R. G. CORREA, J. B. GARRISON, G. LE NEGRATE, K. WELSH, Z. HUANG, W. T. KNOEFEL et J. C. REED. 2009, «Xiap mediates nod signaling via interaction with rip2», *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, vol. 106, n° 34, p. 14 524–14 529. [23](#)
- KUFER, T. A., E. KREMMER, D. J. BANKS et D. J. PHILPOTT. 2006, «Role for erbin in bacterial activation of nod2.», *Infection Immunity*, vol. 74, n° 6, p. 3115–3124. [25](#)
- LAPAQUETTE, P., A. GLASSER, A. HUETT, R. J. XAVIER et A. DARFEUILLE MICHAUD. 2010, «Crohn's disease associated adherent invasive e. coli are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly», *Cellular Microbiology*, vol. 12, n° 1, p. 99–113. [10](#)
- LAROUÏ, H., Y. YAN, Y. NARUI, S. A. INGERSOLL, S. AYYADURAI, M. A. CHARANIA, F. ZHOU, B. WANG, K. SALAITA, S. V. SITARAMAN et D. MERLIN. 2011, «L ala α d glu meso diaminopimelic acid (dap) interacts directly with leucine rich region domain of nucleotide binding oligomerization domain 1, increasing phosphorylation activity of receptor interacting serine/threonine protein kinase 2 and its interaction with nucleotide binding oligomerization domain 1», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, n° 35, p. 31 003–31 013. [22](#)
- LATZ, E., T. S. XIAO et A. STUTZ. 2013, «Activation and regulation of the inflammasomes.», *Nature Reviews Immunology*, vol. 13, n° 6, p. 397–411. [25](#)

- LEE, J. C., D. BIASCI, R. ROBERTS, R. B. GEARRY, J. C. MANSFIELD, T. AHMAD, N. J. PRESCOTT, J. SATSANGI, D. C. WILSON, L. JOSTINS, C. A. ANDERSON, J. A. TRAHERNE, P. A. LYONS, M. PARKES et K. G. SMITH. 2017, «Genome wide association study identifies distinct genetic contributions to prognosis and susceptibility in crohn's disease», *Nature Genetics*, vol. 49, n° 2, p. 262–268. [27](#)
- LESAGE, S., H. ZOUALI, J.-P. CÉZARD, A.-S. JANNOT, G. THOMAS et J.-P. HUGOT. 2002, «Card15/nod2 mutational analysis and genotype phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease», *American Journal of Human Genetics*, vol. 70, n° 4, p. 845–857. [30](#)
- LEVINE, B., N. MIZUSHIMA et H. W. VIRGIN. 2011, «Autophagy in immunity and inflammation», *Nature*, vol. 469, n° 7330, p. 323–335. [19](#)
- LOFTUS, C., E. LOFTUS JR., W. HARMSSEN, A. ZINSMEISTER, W. TREMAINE, L. MELTON et W. SANDBORN. 2007, «Update on the incidence and prevalence of crohn's disease and ulcerative colitis in olmsted county, minnesota, 1940-2000», *Inflammatory Bowel Disease*, vol. 13, n° 3, p. 254–261. [7](#)
- LOFTUS JR., E. V., M. D. SILVERSTEIN, W. J. SANDBORN, W. J. TREMAINE, W. S. HARMSSEN et A. R. ZINSMEISTER. 1998, «Crohn's disease in olmsted county, minnesota, 1940–1993 : Incidence, prevalence, and survival», *American Journal of Epidemiology*, vol. 114, n° 6, p. 1161–1168. [7](#)
- MACHO FERNANDEZ, E., B. POT et C. GRANGETTE. 2011, «Beneficial effect of probiotics in ibd : are peptidoglycan and nod2 the molecular key effectors?», *Gut Microbes*, vol. 2, n° 5, p. 280–286. [ix](#), [23](#)
- MAEDA, S., L.-C. HSU, H. LIU, L. A. BANKSTON, M. IIMURA, M. F. KAGNOFF, L. ECKMANN et M. KARIN. 2005, «Nod2 mutation in crohn's disease potentiates nf kb activity and il 1β processing», *Science*, vol. 307, n° 5710, p. 734–738. [29](#)
- MAGALHAES, J. G., D. J. PHILPOTT, M. NAHORI, M. JÉHANNO, J. FRITZ, L. BOURHIS, J. VIALA, J. HUGOT, M. GIOVANNINI, J. BERTIN, M. LEPOIVRE, D. MENGIN-LECREULX, P. J. SANSONETTI et S. E. GIRARDIN. 2005, «Murine nod1 but not its human orthologue mediates innate immune detection of tracheal cytotoxin», *EMBO Reports*, vol. 6, n° 12, p. 1201–1207. [21](#)
- MAHID, S. S., K. S. MINOR, R. E. SOTO, C. A. HORNUNG et S. GALANDIUK. 2006, «Smoking and inflammatory bowel disease : A meta analysis», *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 81, n° 11, p. 1462–1471. [10](#)
- MALIK, T. A. 2015, «Inflammatory bowel disease : Historical perspective, epidemiology, and risk factors.», *Surgical Clinics of North America*, vol. 95, n° 6, p. 1105–1122. [3](#)

- MALMBORG, P., L. GRAHNQUIST, J. LINDHOLM, S. MONTGOMERY et H. HILDEBRAND. 2013, «Increasing incidence of paediatric inflammatory bowel disease in northern stockholm county, 2002–2007», *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, vol. 57, n° 1, p. 29–34. [6](#)
- MALOY, K. J. et F. POWRIE. 2011, «Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease», *Nature*, vol. 474, n° 7351, p. 298–306. [20](#)
- MARTINON, F., A. MAYOR et J. TSCHOPP. 2009, «The inflammasomes : Guardians of the body», *Annual Review of Immunology*, vol. 27, p. 229–265. [21](#)
- MCDONALD, C., V. CHEN, FELICIA F. AND OLLENDORFF, Y. OGURA, S. MARCHETTO, P. LÉCINE, J.-P. BORG et G. NUÑEZ. 2005, «A role for erbin in the regulation of nod2 dependent nf kb signaling», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, n° 48, p. 40 301–40 309. [25](#)
- MIRKOV, M. U., B. VERSTOCKT et I. CLEYNEN. 2017, «Genetics of inflammatory bowel disease : beyond nod2», *Lancet Gastroenterology and Hepatology*, vol. 2, n° 3, p. 224–234. [27](#)
- MOLLER, F., V. ANDERSEN, J. WOHLFAHRT et T. JESS. 2015, «Familial risk of inflammatory bowel disease : A population-based cohort study 1977–2011», *American Journal of Gastroenterology*, vol. 110, n° 4, p. 564–571. [6](#)
- MOLODECKY, N. A., I. S. SOON, D. M. RABI, W. A. GHALI, M. FERRIS, G. CHERNOFF, E. I. BENCHIMOL, R. PANACCIONE, S. GHOSH, H. W. BARKEMA et G. G. KAPLAN. 2012, «Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases. with time, based on systematic review.», *Gastroenterology*, vol. 142, n° 1, p. 46–54. [ix](#), [xi](#), [3](#), [4](#), [7](#)
- MOMOZAWA, Y., M. MNI, K. NAKAMURA, W. COPPIETERS, S. ALMER, L. AMININEJAD, I. CLEYNEN, J. COLOMBEL, P. DE RIJK, O. DEWIT, Y. FINKEL, M. GASSULL, D. GOOSSENS, D. LAUKENS, M. LÉMANN, C. LIBIOULLE, C. O’MORAIN, C. REENAERS, P. RUTGEERTS, C. TYSK, D. ZELENIKA, M. LATHROP, J. DEL-FAVERO, J. HUGOT, M. DE VOS, D. FRANCHIMONT, S. VERMEIRE, E. LOUIS et M. GEORGES. 2011, «Resequencing of positional candidates identifies low frequency il23r coding variants protecting against inflammatory bowel disease», *Nature Genetics*, vol. 43, n° 1, p. 43–47. [30](#)
- MORGAN, X. C., T. L. TICKLE†, H. SOKOL, D. GEVERS, K. L. DEVANEY, D. V. WARD, J. A. REYES, S. A. SHAH, N. LELEIKO, S. B. SNAPPER, A. BOUSVAROS, J. KORZENIK, B. E. SANDS, R. J. XAVIER et C. HUTTENHOWER. 2012, «Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment», *Genome Biology*, vol. 13, n° 9, p. R79. [30](#)

- NABHANI, Z. A., G. DIETRICH, J.-P. HUGOT et F. BARREAU. 2017, «Nod2 : The intestinal gate keeper», *PLoS Pathogens*, vol. 13, n° 3, p. e1006177. [27](#)
- NG, S. C., G. KAPLAN, R. BANERJEE, S.-C. WEI, W. TANG, Z. ZENG, M.-H. CHEN, H. YANG, H. J. DE SILVA, M. A. NIRIELLA, D. E. ONG, K.-L. LING, I. HILMI, P. PISESPONGSA, S. ANIWAN, J. LIMSRIVILAI, M. ABDULLAH, V. H. CHONG, Q. CAO, Y. MIAO, A. K. ONG-GO, S. BELL, O. NIEWIADOMSKI, M. A. KAMM, K. K. NG, H. H. YU, Y.-F. WANG, Q. OUYANG, K. L. GOH, H.-H. LIN, W.-C. LIN, K. WU, M. SIMADIBRATA, F. K. CHAN et J. SUNG. 2016, «78 incidence and phenotype of inflammatory bowel disease from 13 countries in asia pacific : Results from the asia pacific crohn's and colitis epidemiologic study 2011-2013», *Gastroenterology*, vol. 150, n° suppl 1, p. S21. [6](#)
- NG, S. C., H. Y. SHI, N. HAMIDI, F. E. UNDERWOOD, W. TANG, E. I. BENCHIMOL, R. PANACCIONE, S. GHOSH, J. C. WU, F. K. CHAN, J. J. SUNG et G. G. KAPLAN. 2018, «Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century : a systematic review of population based studies», *The Lancet*, vol. 390, n° 10114, p. 2769–2778. [ix, 3, 5](#)
- NORMAN, J. M., S. A. HANDLEY, M. T. BALDRIDGE, L. DROIT, C. Y. LIU, B. C. KELLER, A. KAMBAL, C. L. MONACO, G. ZHAO, P. FLESHNER, T. S. STAPPENBECK, D. P. MCGOVERN, A. KESHAVARZIAN, E. A. MUTLU, J. SAUK, D. GEVERS, R. J. XAVIER, D. WANG, M. PARKES et H. W. VIRGIN. 2015, «Disease specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease», *Cell*, vol. 160, n° 3, p. 447–460. [11](#)
- OGURA, Y., D. K. BONEN, N. INOHARA, D. L. NICOLAE, F. F. CHEN, R. RAMOS, H. BRITTON, T. MORAN, R. KARALIUSKAS, R. H. DUERR, J.-P. ACHKAR, S. R. BRANT, T. M. BAYLESS, B. S. KIRSCHNER, S. B. HANAUER, G. NUÑEZ et J. H. CHO. 2001a, «A frameshift mutation in nod2 associated with susceptibility to crohn's disease», *Nature*, vol. 411, n° 6837, p. 603–606. [27](#)
- OGURA, Y., N. INOHARA, A. BENITO, F. F. CHEN, S. YAMAOKA et G. NUÑEZ. 2001b, «Nod2, a nod1/apaf1 family member that is restricted to monocytes and activates nfkb», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, n° 7, p. 4812–4818. [21, 22](#)
- OGURA, Y., S. LALA, W. XIN, E. SMITH, T. DOWDS, F. CHEN, E. ZIMMERMANN, M. TRETIAKOVA, J. CHO, J. HART, J. GREENSON, S. KESHAV et G. NUÑEZ. 2001c, «Expression of nod2 in paneth cells : a possible link to crohn's ileitis», *Gut*, vol. 276, n° 7, p. 4812–4818. [21](#)
- OTT, S. J., T. KÜHBACHER, M. MUSFELDT, P. ROSENSTIEL, S. HELLMIG, A. REHMAN, O. DREWS, W. WEICHERT, K. N. TIMMIS et S. SCHREIBER. 2008, «Fungi and inflammatory bowel diseases : Alterations of composition and diversity», *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, vol. 43, n° 7, p. 831–841. [11](#)

- OUELLETTE, A. 2010, «Paneth cells and innate mucosal immunity», *Current Opinion in Gastroenterology*, vol. 26, n° 6, p. 547–553. [20](#)
- PERMINOW, G., S. BRACKMANN, L. G. LYCKANDER, A. FRANKE, A. BORTHNE, A. RYDNING, G. AAMODT, S. SCHREIBER, M. H. VATN et T. I.-I. GROUP. 2009, «A characterization in childhood inflammatory bowel disease, a new population-based inception cohort from south-eastern norway, 2005–07, showing increased incidence in crohn’s disease», *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, vol. 44, n° 4, p. 446–456. [6](#)
- PIRONI, L., F. BONVICINI, P. GIONCHETTI, A. D’ERRICO, F. RIZZELLO, C. CORSINI, L. FORONI et G. GALLINELLA. 2009, «Parvovirus b19 infection localized in the intestinal mucosa and associated with severe inflammatory bowel disease», *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 47, n° 5, p. 1591–1595. [11](#)
- QIN, X. 2012, «Etiology of inflammatory bowel disease : A unified hypothesis.», *World Journal of Gastroenterology*, vol. 18, n° 15, p. 708–1722. [3](#), [30](#)
- REHMAN, A., C. SINA, O. GAVRILOVA, R. HÄSLER, S. OTT, J. F. BAINES, S. SCHREIBER et P. ROSENSTIEL. 2011, «Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities», *Gut*, vol. 60, n° 10, p. 1354–1362. [30](#)
- RICHMOND, A. L., A. KABI, C. R. HOMER, N. MARINA–GARCÍA, K. P. NICKERSON, A. I. NESVIZHSKII, A. SREEKUMAR, A. M. CHINNAIYAN, G. NUÑEZ et C. McDONALD. 2012, «The nucleotide synthesis enzyme cad inhibits nod2 antibacterial function in human intestinal epithelial cells», *Gastroenterology*, vol. 142, n° 7, p. 1483–1492.e6. [25](#)
- RIVAS, M. A., M. BEAUDOIN, A. GARDET, C. STEVENS, Y. SHARMA, C. K. ZHANG, G. BOUCHER, S. RIPKE, D. ELLINGHAUS, N. BURTT, T. FENNELL, A. KIRBY, A. LATIANO, P. GOYETTE, T. GREEN, J. HALFVARSON, T. HARITUNIANS, J. M. KORN, F. KURUVILLA, C. LAGACÉ, B. NEALE, K. S. LO, P. SCHUMM, L. TÖRKVIST, M. C. DUBINSKY, S. R. BRANT, M. S. SILVERBERG, R. H. DUERR, D. ALTSHULER, S. GABRIEL, G. LETTRE, A. FRANKE, M. D’AMATO, D. P. MCGOVERN, J. H. CHO, J. D. RIOUX et M. J. XAVIER, RAMNIK J. AND DALY. 2011, «Deep resequencing of gwas loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease», *Nature Genetics*, vol. 43, n° 11, p. 1066–1073. [27](#), [30](#)
- SABBAH, A., T. H. CHANG, R. HARNACK, V. FROHLICH, K. TOMINAGA, P. H. DUBE, Y. XIANG et S. BOSE. 2009, «Activation of innate immune antiviral responses by nod2», *Nature Immunology*, vol. 10, n° 10, p. 1073–1080. [22](#)
- SALZMAN, N. H., M. A. UNDERWOOD et C. L. BEVINS. 2007, «Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota : A hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa», *Seminars in Immunology*, vol. 19, n° 2, p. 70–83. [14](#)

- SANTOS, M. P. C., C. GOMES et J. TORRES. 2018, «Familial and ethnic risk in inflammatory bowel disease», *Annals of Gastroenterology*, vol. 31, n° 1, p. 14–23. [6](#)
- SEDLACK, R. E., F. T. NOBREGA, L. T. KURLAND et W. G. SAUER. 1972, «Inflammatory colon disease in rochester, minnesota, 1935–1964», *Gastroenterology*, vol. 62, p. 935–941. [7](#)
- SEDLACK, R. E., J. WHISNANT, L. R. ELVEBACK et L. T. KURLAND. 1980, «Incidence of crohn's disease in olmsted county, minnesota, 1935-1975», *American Journal of Epidemiology*, vol. 112, n° 6, p. 759–763. [7](#)
- SHAH, S. C., H. KHALILI, C. GOWER-ROUSSEAU, O. OLEN, E. I. BENCHIMOL, E. LYNGE, K. R. NIELSEN, P. BRASSARD, M. VUTCOVICI, A. BITTON, C. N. BERNSTEIN, D. LEDDIN, H. TAMIM, T. STEFANSSON, E. V. LOFTUS JR., B. MOUM, W. TANG, S. C. NG, R. GEARRY, B. SINCIC, S. BELL, B. E. SANDS, P. L. LAKATOS, Z. VÉGH, C. OTT, G. G. KAPLAN, J. BURISCH et J.-F. COLOMBEL. 2018, «Sex-based differences in incidence of inflammatory bowel diseases—pooled analysis of population-based studies from western countries», *Gastroenterology*, vol. 155, n° 4, p. 1079–1089. [6](#)
- SHIVASHANKAR, R., W. TREMAINE, W. HARMSSEN et E. LOFTUS JR. 2017, «Incidence and prevalence of crohn's disease and ulcerative colitis in olmsted county, minnesota from 1970 through 2010», *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, vol. 15, n° 6, p. 857–863. [7](#)
- SIMMS, L., J. DOECKE, M. WALSH, N. HUANG, E. FOWLER et G. RADFORD-SMITH. 2008, «Reduced  $\alpha$ defensin expression is associated with inflammation and not nod2 mutation status in ileal crohn's disease», *Gut*, vol. 57, n° 7, p. 903–910. [28](#)
- SOKOL, H., V. LEDUCQ, H. ASCHARD, H. P. PHAM, S. JEGOU, C. LANDMAN, D. COHEN, G. LIGUORI, A. BOURRIER, I. NION LARMURIER, J. COSNES, P. SEKSIK, P. LANGELLA, D. SKURNIK, M. L. RICHARD et L. BEAUGERIE. 2017, «Fungal microbiota dysbiosis in ibd», *Gut*, vol. 66, n° 6, p. 1039–1048. [11](#)
- SÖDERHOLM<sup>1</sup>, J., G. OLAISON, K. PETERSON, L. FRANZÉN, T. LINDMARK, M. WIRÉN, C. TAGESSON et R. SJÖDAHL. 2002, «Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of crohn's disease», *Gut*, vol. 50, n° 3, p. 307–313. [19](#)
- TAN, G., R.-H. LI, C. LI, F. WU, X.-M. ZHAO, J.-Y. MA, S. LEI, W.-D. ZHANG et F.-C. ZHI. 2015a, «Down regulation of human enteric antimicrobial peptides by nod2 during differentiation of the paneth cell lineage», *Scientific Reports*, vol. 5, p. 8383. [28](#)
- TAN, G., B. ZENG et F.-C. ZHI. 2015b, «Regulation of human enteric  $\alpha$ defensins by nod2 in the paneth cell lineage», *European Journal of Cell Biology*, vol. 94, n° 1, p. 60–66. [25](#)

- TANABE, T., M. CHAMAILLARD, Y. OGURA, L. ZHU, S. QIU, J. MASUMOTO, P. GHOSH, A. MORAN, M. M. PREDERGAST, G. TROMP, C. J. WILLIAMS, N. INOHARA et G. NÚÑEZ. 2004, «Regulatory regions and critical residues of nod2 involved in muramyl dipeptide recognition», *EMBO Reports*, vol. 23, n° 7, p. 1587–1597. [22](#)
- THIA, K. T., W. J. SANDBORN, W. S. HARMSSEN, A. R. ZINSMEISTER et E. V. J. LOFTUS. 2010, «Risk factors associated with progression to intestinal complications of crohn's disease in a population based cohort», *Gastroenterology*, vol. 139, n° 4, p. 1147–1155. [8](#)
- TO, N., D. GRACIE et A. FORD. 2016, «The importance of smoking cessation in improving disease course in crohn's disease», *American Journal of Gastroenterology*, vol. 111, n° 8, p. 1198. [10](#)
- TORRES, J., S. MEHANDRU, J.-F. COLOMBEL et L. PEYRIN-BIROULET. 2017, «Crohn's disease», *The Lancet*, vol. 389, n° 10080, p. 1741–1755. [ix](#), [18](#)
- TRAVASSOS, L. H., L. A. CARNEIRO, M. RAMJEET, S. HUSSEY, Y.-G. KIM, J. G. MAGALHÃES, L. YUAN, F. SOARES, E. CHEA, L. LE BOURHIS, I. G. BONECA, A. ALLAOUI, N. L. JONES, G. NUÑEZ, S. E. GIRARDIN et D. J. PHILPOTT. 2010, «Nod1 and nod2 direct autophagy by recruiting atg16l1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry», *Nature Immunology*, vol. 11, n° 1, p. 55–62. [27](#), [29](#)
- UNGARO, R., C. BERNSTEIN, R. GEARRY, A. HVIID, K. L. KOLHO, M. KRONMAN, S. SHAW, H. VAN KRUNINGEN, J. F. COLOMBEL et A. ATREJA. 2014, «Antibiotics associated with increased risk of new onset crohn's disease but not ulcerative colitis : A meta analysis», *American Journal of Gastroenterology*, vol. 109, n° 11, p. 1728–1738. [10](#)
- VAISHNAVA, S., M. YAMAMOTO, K. M. SEVERSON, K. A. RUHN, X. YU, O. KOREN, R. LEY, E. K. WAKELAND et L. V. HOOPER. 2011, «The antibacterial lectin regIII promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine», *Science*, vol. 334, n° 6053, p. 255–258. [14](#)
- VASSEUR, F., B. SENDID, T. JOUAULT, A. STANDAERT-VITSE, L. DUBUQUOY, N. FRANCOIS, C. GOWER-ROUSSEAU, P. DESREUMAUX, F. BROLY, S. VERMEIRE, J. COLOMBEL et D. POULAIN. 2012, «Variants of nod1 and nod2 genes display opposite associations with familial risk of crohn's disease and anti saccharomyces cerevisiae antibody levels.», *Inflammatory Bowel Disease*, vol. 18, n° 3, p. 430–438. [30](#)
- VEREECKE, L., S. VIEIRA-SILVA, T. BILLIET, J. H. VAN ES, C. MC GUIRE, K. SLOWICKA, M. SZE, M. VAN DEN BORN, G. DE HERTOOGH, H. CLEVERS, J. RAES, P. RUTGEERTS, S. VERMEIRE, R. BEYAERT et G. VAN LOO. 2014, «A20 controls intestinal homeostasis through cell specific activities», *Nature Communications*, vol. 5, p. 5103. [25](#)

- VIJAYAJRATNAM, S., A. C. PUSHKARAN, A. BALAKRISHNAN, A. K. VASUDEVAN, R. BISWAS et C. G. MOHAN. 2017, «Understanding the molecular differential recognition of muramyl peptide ligands by Iir domains of human nod receptors», *Biological Journal*, vol. 474, n° 16, p. 2691–2711. [22](#)
- WEAVER, C. T. et R. D. HATTON. 2009, «Interplay between the th17 and treg cell lineages : a (co)evolutionary perspective», *Nature Reviews Immunology*, vol. 9, n° 12, p. 883–889. [20](#)
- WEBER, C. R., D. R. RALEIGH, L. SU, L. SHEN, E. A. SULLIVAN, Y. WANG et J. R. TURNER. 2010, «Epithelial myosin light chain kinase activation induces mucosal interleukin 13 expression to alter tight junction ion selectivity», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, n° 16, p. 12 037–12 046. [19](#)
- WEHKAMP, J., N. H. SALZMAN, E. PORTER, S. NUDING, M. WEICHENTHAL, R. E. PETRAS, B. SHEN, E. SCHAEFFELER, M. SCHWAB, R. LINZMEIER, R. W. FEATHERS, H. CHU, H. LIMA JR., K. FELLERMANN, T. GANZ, E. F. STANGE et C. L. BEVINS. 2005, «Reduced paneth cell  $\alpha$ -defensins in ileal crohn's disease», *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*, vol. 102, n° 50, p. 18 129–18 134. [28](#)
- WEINBERG, I., T. NEUMAN, M. MARGALIT, F. AYMAN, D. G. WOLF et A. BEN YEHUDA. 2009, «Epstein barr virus related diarrhea or exacerbation of inflammatory bowel disease : Diagnostic dilemma», *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 47, n° 5, p. 1588–1590. [11](#)
- WERTS, C., S. GIRARDIN et D. PHILPOTT. 2006, «Tir, card and pyrin : three domains for an antimicrobial triad», *Cell Death and Differentiation*, vol. 13, n° 5, p. 798–815. [22](#)
- WILSON, J., C. HAIR, R. KNIGHT, A. CATTO SMITH, S. BELL, M. KAMM, P. DESMOND, J. MC-NEIL et W. CONNELL. 2010, «High incidence of inflammatory bowel disease in australia : A prospective population based australian incidence study», *Inflammatory Bowel Disease*, vol. 16, n° 9, p. 1550–1556. [5](#)
- WINDHEIM, M., C. LANG, M. PEGGIE, L. A. PLATER et P. COHEN. 2007, «Molecular mechanisms involved in the regulation of cytokine production by muramyl dipeptide.», *Biochemical Journal*, vol. 404, n° 2, p. 179–190. [25](#)
- YAN, B., R. PANACCIONE et L. SUTHERLAND. 2008, «I am jewish : what is my risk of developing crohn's disease?», *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 14, n° Suppl 2, p. S26–S27. [6](#)
- YANG, S. K., S. YUN, J. H. KIM, J. Y. PARK, H. Y. KIM, Y. H. KIM, D. K. CHANG, J. S. KIM, I. S. SONG, J. B. PARK, E. R. PARK, K. J. KIM, G. MOON et S. H. YANG. 2008, «Epidemiology of inflammatory bowel disease in the songpa kangdong district, seoul, korea, 1986 2005 : A kasid study», *Inflammatory Bowel Disease*, vol. 14, n° 4, p. 542–549. [5](#)

ZEISSIG, S., N. BÜRCEL, D. GÜNZEL, J. RICHTER, J. MANKERTZ, U. WAHNSCHAFFE, A. J. KROESEN, M. ZEITZ, M. FROMM et J. D. SCHULZKE. 2007, «Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active crohn's disease», *Gut*, vol. 56, n° 1, p. 61–72. [19](#)

ZUREK, B., I. SCHOULTZ, A. NEERINCX, L. M. NAPOLITANO, K. BIRKNER, E. BENNEK, G. SELLGE, M. LERM, G. MERONI, J. D. SÖDERHOLM et T. A. KUFER. 2012, «Trim27 negatively regulates nod2 by ubiquitination and proteasomal degradation», *PLoS One*, vol. 7, n° 7, p. e41 255. [25](#)



# Chapitre 2

## Sujets, matériels et méthodes

*« Je ne peux pas changer la direction du vent, mais je peux orienter mes voiles pour atteindre ma destination. »*

---

James Dean

### Sommaire

---

<b>2.1 Sujets</b> . . . . .	<b>52</b>
2.1.1 Registre EPIMAD . . . . .	52
2.1.2 Protocole MC-WES . . . . .	52
2.1.3 Famille étudiée . . . . .	53
<b>2.2 Whole Exome Sequencing et analyses bio-informatiques</b> . . . . .	<b>55</b>
<b>2.3 Séquençage Sanger : Confirmation des variants <i>NOD2</i></b> . . . . .	<b>55</b>
<b>2.4 Prédictions structurelles : <i>NOD2</i></b> . . . . .	<b>56</b>
<b>2.5 Prédictions et annotations <i>in silico</i></b> . . . . .	<b>58</b>
<b>2.6 Références</b> . . . . .	<b>58</b>

---

## 2.1 Sujets

Les patients inclus dans ce travail sont issus du registre EPIMAD.

### 2.1.1 Registre EPIMAD

Le registre EPIMAD est le premier registre français d'enregistrement des nouveaux cas de MICI dans la région Nord-Ouest de la France. Son but initial est de connaître les incidences pour la MC et pour la rectocolite hémorragique dans 4 départements : le Nord, le Pas-de-Calais, la Somme et la Seine-Maritime. Les enregistrements prospectifs des nouveaux cas ont débuté le 1er janvier 1988. Aujourd'hui (au 01/06/2019) le registre recense 29 492 patients, dont 12 551 atteints de MC (certaine ou probable).

Ce registre est le plus grand registre mondial des MICI en population générale. Les données issues du registre sont aussi utilisées dans le cadre d'autres études et de projets de recherche. C'est ainsi que plusieurs familles multiplexes de patients atteints de MC, ne présentant aucune des 3 mutations majeures du gène *NOD2*, ont été identifiées. Une famille multiplexe est une famille où sont retrouvés 3 ou plus de 3 apparentés au premier degré atteints de la maladie de Crohn.

### 2.1.2 Protocole MC-WES

Le protocole MC-WES (Recherche de nouvelles mutations génétiques à effet majeur dans la maladie de Crohn) (en annexe) est une étude d'épidémiologie génétique, monocentrique, dont l'objectif principal était d'identifier de nouvelles mutations génétiques à effet majeur dans la maladie de Crohn. C'est une étude familiale avec contrôle(s) intrafamilial.

**Déroulement de l'étude :** La participation au protocole a été proposée aux membres des familles multiplexes issues du Registre EPIMAD, présentant des arbres typiques d'une agrégation familiale avec plus de 3 patients atteints de maladie de Crohn sans mutations majeures du gène *NOD2* : R702W, G908R et L1007fs.

Ont été inclus dans le protocole les patients atteints de MC (cas) et leurs apparentés sains (contrôle intra-familial). Pour la famille 49M, 7 sujets ont été inclus : 4 patients atteints de MC et 3 sujets contrôles intra-familiaux.

Après que l'information éclairée ait été délivrée aux participants et après signature du consentement éclairé, un examen clinique et un entretien a été réalisé afin d'approfondir les antécédents des patients et des sujets contrôles. Ensuite, un prélèvement sanguin de 30 ml a été effectué pour l'analyse génétique. Et afin de constituer une collection biologique, des selles ont été récupérées ainsi qu'un prélèvement salivaire d'au moins 500 µl.

Ce travail a obtenu les avis favorables du Comité de Protection des Personnes Nord Ouest IV et de l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé). Ce projet est enregistré dans la base de données des essais cliniques, Clinical Trials : NCT02851134.

### 2.1.3 Famille étudiée

La famille F49M a été recrutée dans le protocole MC-WES F49M.

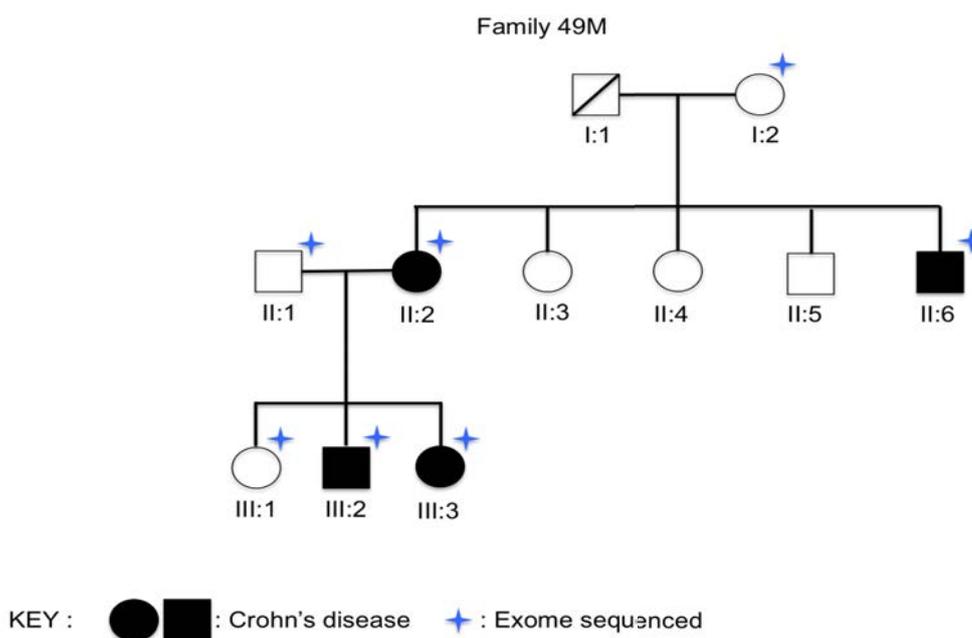


FIGURE 2.1 – Arbre généalogique de la famille multiplexe EPIMAD F49M

Dans cette famille, quatre patients atteints de MC (II : 2, II : 6, III : 2, III : 3) et 3 témoins intra-familiaux (I : 2, II : 1, III : 1) ont été recrutés, couvrant ainsi 3 générations. L'entretien et l'examen clinique ont permis d'exclure un diagnostic de MC chez les sujets apparentés non atteints (I : 2, II : 1, III : 1). De plus, pour le patient II : 1, aucun antécédent familial de MC n'a été mis en évidence. Les sujets apparentés non atteints II : 3, II : 4 et II : 5 ont refusé de participer à l'étude, mais ne seraient pas atteints de la MC selon le résultat des entretiens réalisés avec les sujets recrutés. Les critères de diagnostic de la MC sont fondés sur des critères cliniques, radiologiques, résultats endoscopiques et histologiques, comme décrit précédemment [GOWER-ROUSSEAU et collab. \[1994\]](#); [MOLINIÉ et collab. \[2004\]](#). Les phénotypes ont été définis selon la classification de Montréal. L'âge au moment du diagnostic, la présentation clinique et le phénotype de la MC différaient entre les patients de cette famille (Tableau 2.1).

TABLEAU 2.1 – Classification de Montréal au diagnostic des patients. L1, atteinte de l'intestin grêle; L2, atteinte colonique; L3, atteinte iléo-colonique; B1, non fistulisante et non sténosante; B2, sténosante; B3, Fistulisante.

Identification patient	Age au diagnostis (an)	Localisation	Phénotype
II :2	30	L3	B2
II :6	24	L1	B3
III :2	8	L3	B1
III :3	15	L3	B1

L'ADN génomique a été préparé à partir de 10 ml de sang total en utilisant la méthode de l'automate Autopure LS suivant les protocoles des fabricants.

## 2.2 Whole Exome Sequencing et analyses bio-informatiques

L'analyse [WES](#) a été réalisée chez 7 sujets de la famille F49M : 4 patients atteints de [MC](#) et 3 sujets contrôles intra-familiaux. Pour ce faire, nous avons utilisé la capture NimbleGen SeqCap E2 Exome v3 en combinaison avec le séquençage nouvelle génération d'Illumina (via séquenceur HiSeq 4000 en PE 2x150), selon les protocoles des fabricants.

La détection des variants a été effectuée avec le logiciel GATK v3.3, et les variants candidats ont été filtrés avec une profondeur minimale de 8. Les séquences lues ont été alignées au génome de référence humain (GRCh37/hg19) à l'aide du logiciel BWA v0.7.13. La cible a été couverte avec une profondeur moyenne de 127,7 séquences dans les 7 échantillons. Les variants ont ensuite été annotés avec la base de données Ensembl v75 à l'aide de API Perl, et seules les variants non synonymes, stop, perte ou gain de fonctions, frame-shift, site d'épissage et miRNA ont été conservées pour analyse ultérieure. Après la sélection des variants présents uniquement chez tous les membres atteints de la famille, les variants restant ont également été annotés avec dbSNP v135 et dbNSFP 3.0b2 (prédictions fonctionnelles in silico, fréquences alléliques, classification GO, expression et données de voie de signalisation).

Pour l'analyse finale, n'ont été retenus que les variants retrouvés chez tous les sujets atteints de [MC](#) et absents chez les sujets contrôles de la famille et ayant une fréquence dans la base de données 1000 génomes <1%.

## 2.3 Séquençage Sanger : Confirmation des variants *NOD2*

La présence des mutations du gène *NOD2* a été confirmée par séquençage Sanger, en utilisant le protocole standard [XIANG et collab. \[2012\]](#).

L'ADN génomique a été préparé à partir de 10 ml de sang total (c.f. 2.1.3.). Les séquences codantes du gène *NOD2* (exons 1-12, GenBank NG\_007508.1) ont été amplifiées à partir de l'ADN génomique en utilisant les amorces directes et inverses présentées dans le tableau 2.2.

Un volume de 30 µl de la réaction d'amplification par [Polymerase Chain Reaction \(PCR\)](#) a été réalisée avec 30 à 40 ng d'ADN génomique, 1,0 µM de chacune des amorces directes et inverses et 15 µl de 2 × Taq Master Mix (SinoBio Biltech Co. Ltd). La programmation de la [PCR](#) était la suivante : une étape initiale de dénaturation à 94° C pendant 5 min, suivie de 35 cycles de dénaturation thermique de l'ADN à 94° C pendant 30 secondes, puis d'hybridation des amorces à 55° C pendant 30 secondes, d'une extension des amorces à 72° C pendant 30 secondes et une dernière extension à 72° C pendant 5 min. Les produits ainsi amplifiés ont été purifiés avec un kit cycle-pure (OMEGA; BioTek) et séquencés sur le séquenceur d'ADN automatisé ABI 3730XL (Applied Biosystems). Les données de séquençage ont été comparées par paire avec la séquence *NOD2* de type sauvage (GenBank

NG\_007508.1).

TABLEAU 2.2 – Amorces utilisées dans les réactions de polymérisation en chaîne pour l’amplification de *NOD2* XIANG et collab. [2012]

Exon	Annealing temperature (°C)	Primer direction	Sequence (5' → 3')	Amplicon size (bp)
1	55.0	Forward	GTAGACAGATCCAGGCTCAC	384
		Reverse	ACCAGCCAAGGATGCGACAG	
2	55.0	Forward	TGACCACCCTGCATCTGGCTT	627
		Reverse	ACCAAGTTACCCACAGGCTG	
3	55.0	Forward	CAGTAAGCCTTCCCACATTG	451
		Reverse	AACACCTTTAGTTAGCCCTCA	
4a	55.0	Forward	CTGGCTCTCCTATCCCTTCA	555
		Reverse	TGCTTCTTGACCAACATCAG	
4b	55.0	Forward	TCTCTTTGTCTTCCCATTGAG	462
		Reverse	AGGGCTGAGGTCTCTTGGA	
4c	55.0	Forward	GCTTCTCTGAACAGGGCATC	689
		Reverse	TGCTGTGATCTGAAGTTGTG	
4d	55.0	Forward	AGGTGTCGTGCCAGGGAGTA	755
		Reverse	CACACTTAGCCTTGATGGTG	
5, 6	55.0	Forward	GCACAGATGCTGGCACTTC	565
		Reverse	CAGATCAGACTGACTCAGGAAT	
7	55.0	Forward	GTAAACTAGACCTAGCAGCGA	277
		Reverse	CTCCATGCAGGTCCCTCTTC	
8	55.0	Forward	GGAGGAGGACTGTTAGTTCAT	362
		Reverse	AGAGGACAAGGGACATTTCCA	
9	55.0	Forward	AGACCAGGAGAGCACCACGA	301
		Reverse	CAGTCAATCACTCAATCATCCA	
10	55.0	Forward	TGTGAGTTCATCATCTTCCATA	297
		Reverse	ATCCTTGTCCACCTAGACCA	
11	55.0	Forward	CTCATTGGGAATCTCAGACAT	391
		Reverse	CAGAGAATCAGATCCTTCACAT	
12	55.0	Forward	GAGAGTCAGCCCATCCCAG	476
		Reverse	AGCAGAGGCCAGTCCCATACT	

## 2.4 Prédiction structurelle : NOD2

Les prédictions structurelles de la protéine NOD2 native humaine (acides aminés 219 à 1040) et des variants humains R702W, G908R et N1010K des protéines NOD2 (acides aminés 219 à 1040) ont été obtenus à partir du serveur M4T (Multiple Mapping Method with Multiple Templates, version 3.0) à l’aide de la séquence déduite d’acides aminés de chaque protéine. La structure protéique 3D prédite a été comparée avec la structure protéique 3D NOD2 du lapin (*Oryctolagus cuniculus* (Oc)) (Oc NOD2; 86% d’homologie de séquence avec la protéine native NOD2 humaine) MAEKAWA et collab. [2016] en utilisant le système de visualisation moléculaire PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System,

Version 2.0 Schrödinger, LLC). La topologie des protéines était presque complètement conservée dans les structures protéiques 3D prédites. La Figure 2.2 présente la structure protéique 3D de NOD2 humaine native.

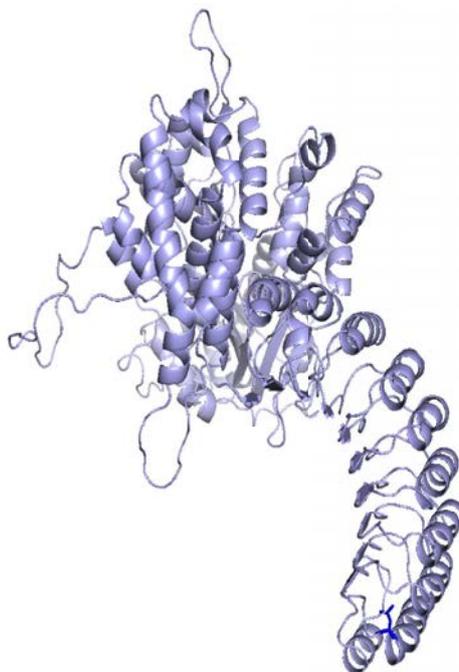


FIGURE 2.2 – Préviation structurelle de la protéine NOD2 humaine native (acides aminés 219 à 1040).

Pour déterminer si les protéines NOD2 étaient structurellement homologues à la protéine native, le protein SuperPose server v.1.0 [MAITI et collab. \[2004\]](#) a été utilisé pour mesurer la déviation racine-moyenne-carré ([Root-Mean-Squared Deviation \(RMSD\)](#)), c'est à dire la distance moyenne entre les atomes carbonés  $\alpha$  (les atomes du squelette, Figure 2.3) des protéines superposées.

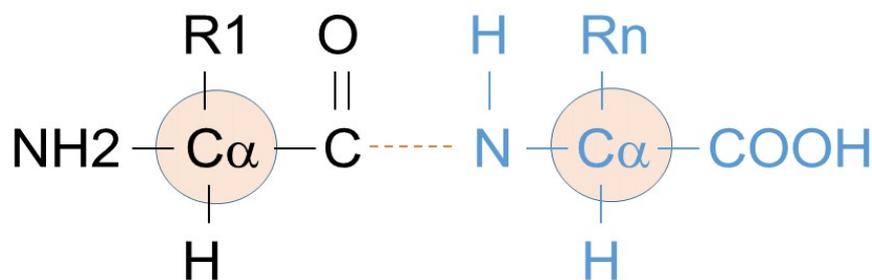


FIGURE 2.3 – Identification des carbonés  $\alpha$  dans une structure protéique).

Lorsque le **RMSD** est inférieur à 1,5 Å, les deux structures ou domaines 3D, dont l'alignement de séquence est supérieur à 30%, peuvent alors être considérées comme presque homologues. Le résultat le plus significatif est en corrélation avec le plus grand nombre de résidus alignés.

## 2.5 Prédictions et annotations *in silico*

La prédiction *in silico* de la pathogénicité pour les mutations faux-sens du gène *NOD2* a été réalisée à l'aide du logiciel CADD (Version 1.3) qui permet le calcul du score CADD Phred **KIRCHER et collab. [2014]**. Un variant est prédit comme pathogène si le score CADD Phred est supérieur à 20. Les outils prédictifs couramment utilisés pour l'annotation des variants, notamment SIFT **NG et HENIKOFF [2001]**, PolyPhen2 **ADZHUBEI et collab. [2010]** et le score de Grantham ont également été utilisés. Un variant est prédit comme délétère si le score SIFT est inférieur à 0,05. Le tableau 2.3 présente la signification du score de PolyPhen2.

TABLEAU 2.3 – Prédiction en fonction du score de PolyPhen2

Score PolyPhen2	Prédiction qualitative
> 0.908	probablement délétère
0.908 > > 0.446	possiblement délétère
0.446 >	bénin

le score de Grantham est basé sur les propriétés physico-chimiques et le volume moléculaire de l'acide aminé et il permet de prédire la distance entre deux acides aminés du point de vue évolutif. Un score de Grantham élevé est considéré comme délétère. A titre indicatif, la leucine et l'isoleucine sont les acides aminés les plus similaires avec un score de Grantam de 5 et les acides aminés les plus distants sont la cystéine et le tryptophane avec un score de Grantham de 215.

Cette même analyse a été employée pour les autres variants retrouvés par l'analyse WES.

## 2.6 Références

- ADZHUBEI, I. A., S. SCHMIDT, L. PESHKIN, V. E. RAMENSKY, A. GERASIMOVA, P. BORK, A. S. KONDRASHOV et S. R. SUNYAEV. 2010, «A method and server for predicting damaging missense mutations», *Nature Methods*, vol. 7, n° 4, p. 248–249. [58](#)
- GOWER-ROUSSEAU, C., J.-L. SALOMEZ, J.-L. DUPAS, R. MARTI, M. NUTTENS, A. VOTTE, M. LEMAHIEU, B. LEMAIRE, J. COLOMBEL et A. CORTOT. 1994, «Incidence of inflammatory bowel disease in northern france (1988–1990).», *Gut*, vol. 35, n° 10, p. 1433–1438. [53](#)

- KIRCHER, M., D. M. WITTEN, P. JAIN, B. J. O'ROAK, G. M. COOPER et J. SHENDURE. 2014, «A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants», *Nature Genetics*, vol. 46, n° 3, p. 310–315. [58](#)
- MAEKAWA, S., U. OHTO, T. SHIBATA, K. MIYAKE et T. SHIMIZU. 2016, «Crystal structure of nod2 and its implications in human disease.», *Nature Communications*, vol. 10, n° 7, p. 11 813. [56](#)
- MAITI, R., G. H. VAN DOMSELAAR, H. ZHANG et D. S. WISHART. 2004, «Superpose : a simple server for sophisticated structural superposition.», *Nucleic Acids Research*, vol. 32, n° Web Server issue, p. W590–W594. [57](#)
- MOLINIÉ, F., C. GOWER-ROUSSEAU, T. YZET, V. MERLE, B. GRANDBASTIEN, R. MARTI, E. LEREBOURS, J. DUPAS, J. COLOMBEL, J. SALOMEZ et A. CORTOT. 2004, «Opposite evolution in incidence of crohn's disease and ulcerative colitis in northern france (1988–1999).», *Gut*, vol. 53, n° 6, p. 843–848. [53](#)
- NG, P. C. et S. HENIKOFF. 2001, «Predicting deleterious amino acid substitutions», *Genome Research*, vol. 11, n° 5, p. 863–874. [58](#)
- XIANG, H., T. ZHANG, M. CHEN, X. ZHOU, Z. LI, N. YAN, S. LI, Y. HAN, Q. GONG et X. LIU. 2012, «Nod2/card15 gene mutation identified in a chinese family with blau syndrome», *Molecular Vision*, vol. 18, p. 617–623. [xi](#), [55](#), [56](#)



# Chapitre 3

## Résultats

« Il n'y a pas de réussite facile, ni  
d'échecs définitifs. »

---

Marcel Proust

### Sommaire

---

<b>3.1</b>	<b>Caractérisation d'une nouvelle variation du gène <i>NOD2</i></b>	<b>62</b>
<b>3.2</b>	<b>Autres variations génétiques retrouvées dans la famille F49M</b>	<b>67</b>
3.2.1	Variant du gène <i>BPIFB2</i>	67
3.2.2	Variant du gène <i>DEFB132</i>	69
3.2.3	Variant du gène <i>NLRP7</i>	69
<b>3.3</b>	<b>Références</b>	<b>72</b>

---

### 3.1 Caractérisation d'une nouvelle variation du gène *NOD2*

Le séquençage **WES** des parties codantes du génome de 7 personnes, dont 4 patients atteints de **MC**, a été réalisé. Deux mutations du gène *NOD2* ont été identifiées. La mutation L1007fs (rs2066847) présente chez le sujet sain II :1 et chez les patients III :2 , III :3. Une nouvelle mutation faux-sens hétérozygote du gène *NOD2*, c.3030A> C; p. (N1010K) (NM\_001293557.2), a été détectée à l'état hétérozygote chez tous les membres atteints de la famille (Figure 3.1A).

Cette mutation est localisée dans le dernier exon du gène *NOD2*. La mutation L1007fs (rs2066847) est présente, mais elle est transmise par l'intermédiaire du mari non atteint (II : 1). De plus, aucune des mutations majeures du gène *NOD2* R702W, G908R et L1007fs n'était présente chez les membres atteints de la génération II (figure 3.1A). De plus, dans une étude précédente, les sujets (I : 2, II : 2, II : 6, II : 1, III : 2, III : 3) avaient été génotypés pour les variants du gène *NOD2* R702W, G908R et L1007fs **VASSEUR et collab. [2012]**. La présence de ces deux mutations, p.N1010K et p.L1007fs chez les deux sujets atteints III :2 et III :3, a été confirmée par séquençage Sanger (figure 1B). Le gène *NOD2* a été séquencé par la méthode de Sanger chez tous les sujets inclus de la famille afin de vérifier la présence ou l'absence des mutations c.3030A> C; p (N1010K) et c.3019 dupC; p.L1007fs (rs2066847). Ce séquençage en Sanger a aussi permis de confirmer l'absence de toute autre mutation du gène *NOD2*.

Comme la mutation p.L1007fs, la nouvelle mutation p.N1010K du gène *NOD2* est située dans le domaine de répétition riche en leucine (LRR) de la protéine *NOD2*, domaine dont les variations sont reconnues pour être impliquées dans la **MC** (Figure 3.2A) **OGURA et collab. [2001]**.

La mutation faux-sens c.3030A> C; p. (N1010K) est absente des bases de données publiques GnomAD, ExAC et Kaviar. La couverture des résultats des **WES** des échantillons utilisés dans les bases de données publiques est considérée comme correcte. En effet, 99,79% des échantillons contrôles présentent une couverture > 20X pour cette région. Cette nouvelle mutation du gène *NOD2* apparaît donc comme un événement génétique très rare. L'effet délétère de la mutation N1010K a été étudiée en utilisant plusieurs indicateurs de prédiction *in silico* : CADD Phred, qui évalue l'effet délétère potentiel global, SIFT qui évalue l'effet délétère potentiel de la protéine, PolyPhen2 qui évalue l'effet délétère potentiel du domaine protéique. Ont aussi été étudiés le score de Grantham qui représente l'écart physico-chimique entre les 2 acides aminés et le score **RMSD** qui représente l'écart moyen entre les carbones  $\alpha$  des 2 protéines dans la modélisation 3D. Le tableau 3.1 présente ces prédictions *in silico* et montre que l'effet délétère de la mutation N1010K est fortement suggéré.

Dans CADD-Phred et SIFT, la mutation N1010K (Asp1010Lys) apparaît comme délétère (respectivement 22,6 et zéro) et dans PolyPhen2, comme potentiellement délétère (0.996). L'estimation de l'effet délétère par SIFT est basée sur la conservation de l'acide

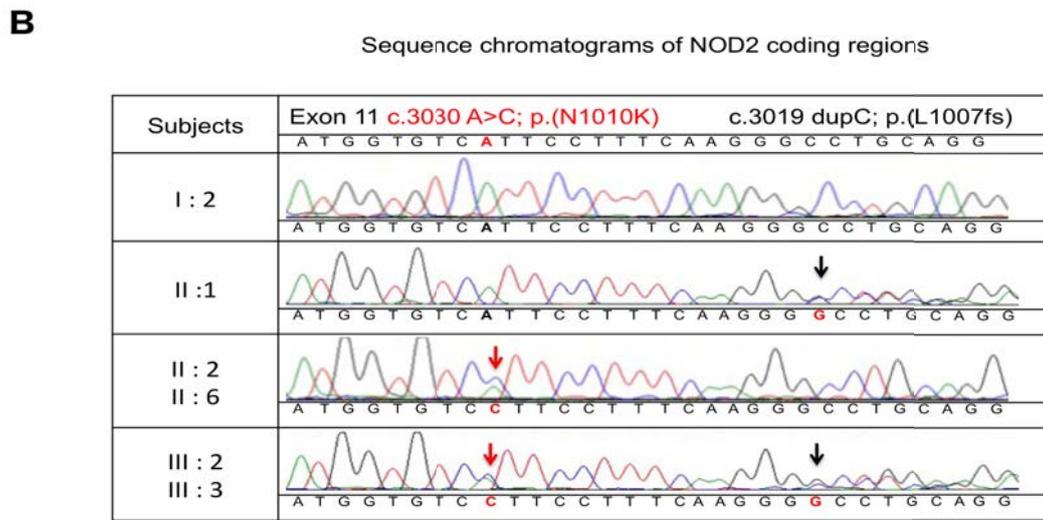
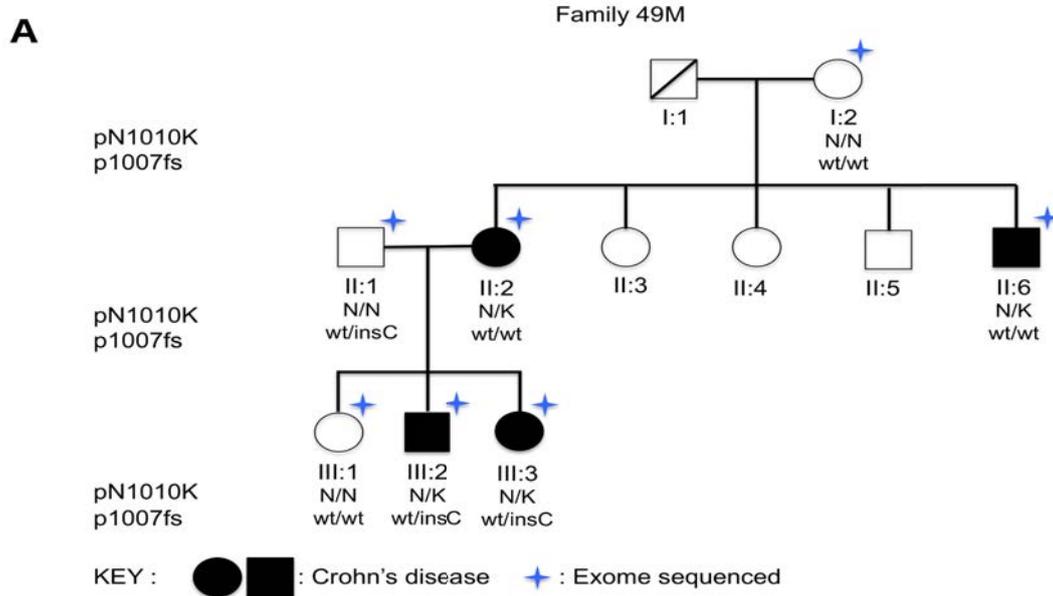


FIGURE 3.1 – (A) Arbre génétique de la famille F49M présentant le ségrégation des mutations c.3030A>C; p.(N1010K) et c.3019dupC; p.(L1007fs). (B) Chromatogrammes pour la région codante de *NOD2* dans l'exon 11.

Les flèches rouges indiquent la substitution nucléotidique c.3030A>C consistant en la substitution acide aminé N1010K. Les flèches noires indiquent la mutation c.3019dupC (rs2066847).

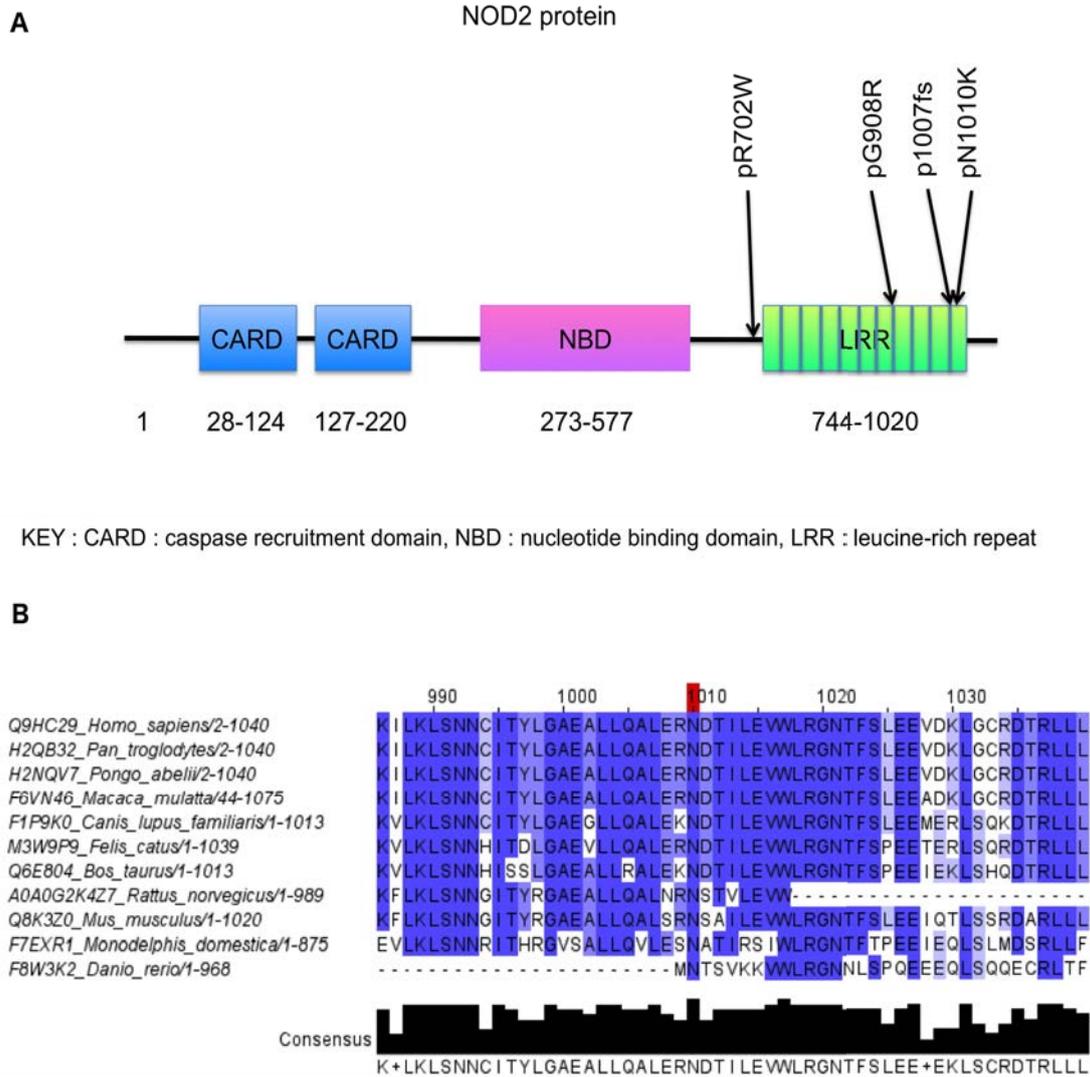


FIGURE 3.2 – (A) Localisation des mutations p.R702W (rs2066844), p.G908R (rs2066845), p.L1007fs (rs2066847) et p.N1010K modifiant la protéine NOD2. (B) Alignements et conservation des acides aminés des protéines NOD2 chez 11 espèces.

TABLEAU 3.1 – Comparaison des fréquences et des valeurs des indicateurs de prédiction de la mutation N1010K avec les mutations connues associées à la MC : R702W et G908R. Indicateurs de prédiction *in silico* des effets délétères des mutations de NOD2. NA = Non Applicable car les outils *in silico* ne traitent que les mutations faux-sens et pas les mutations insertion/délétion.

	<b>R702W</b>	<b>G908R</b>	<b>L1007fs</b>	<b>N1010K</b>
ExAC MAF in Non-Finnish CEU	0.04307	0.01187	0.02319	0
GnomAD MAF	0.02355	0.007589	0.01520	0
Kaviar MAF	0.2409	0.009595	0.01279	0
CADD Phred	24.6	29.8	35.0	22.6
SIFT	0.01	0.01	N/A	0
PolyPhen2	0.72	0.986	N/A	0.996
Grantham Score	101	125	N/A	94
<b>RMSD</b>	2.87 Å	3.34 Å	N/A	3.48 Å

aminé, alors que PolyPhen2 prend également en compte les informations biochimiques disponibles. Bien que l'asparagine et la lysine soient deux acides aminés hydrophiles, l'impact de la substitution N1010K est considéré comme ayant un effet significatif selon le score de Grantham (94). En effet, le score de Grantham permet de prédire la distance entre deux acides aminés du point de vue évolutif. Un score de Grantham faible reflète une faible distance évolutive. Un score de Grantham plus élevé reflète une plus grande distance d'évolution. Les variants avec des scores plus élevés de Grantham sont considérés comme plus délétères : plus deux acides aminés sont distants, moins les acides aminés risquent d'être substitués l'un à l'autre ; et plus les deux acides aminés sont éloignés, plus leur substitution est délétère. De plus, l'alignement de la séquence de la protéine NOD2 a montré un niveau élevé de conservation de l'acide aminé N1010 parmi les Vertébrés (Figure 2B).

Ces résultats ont aussi été corroborés par la modélisation protéique 3D obtenue par simulation cristallographique (Figure 3.3) : le déplacement moyen des carbones  $\alpha$  de chaque acide aminé a été mesuré et a permis la quantification de la déformation globale de la protéine liée à la mutation. En effet, la valeur de **RMSD** sur le domaine des acides aminés 219 à 1040 pour les protéines NOD2 mutées hR702W, hG908R et hN1010K sont respectivement égales à : 2,86 Å, 3,34 Å et 3,48 Å. Il n'y a donc pas d'homologie structurale entre la structure prédite en 3D de la protéine NOD2 native humaine et les protéines NOD2 mutées hR702W, hG908R et hN1010K.

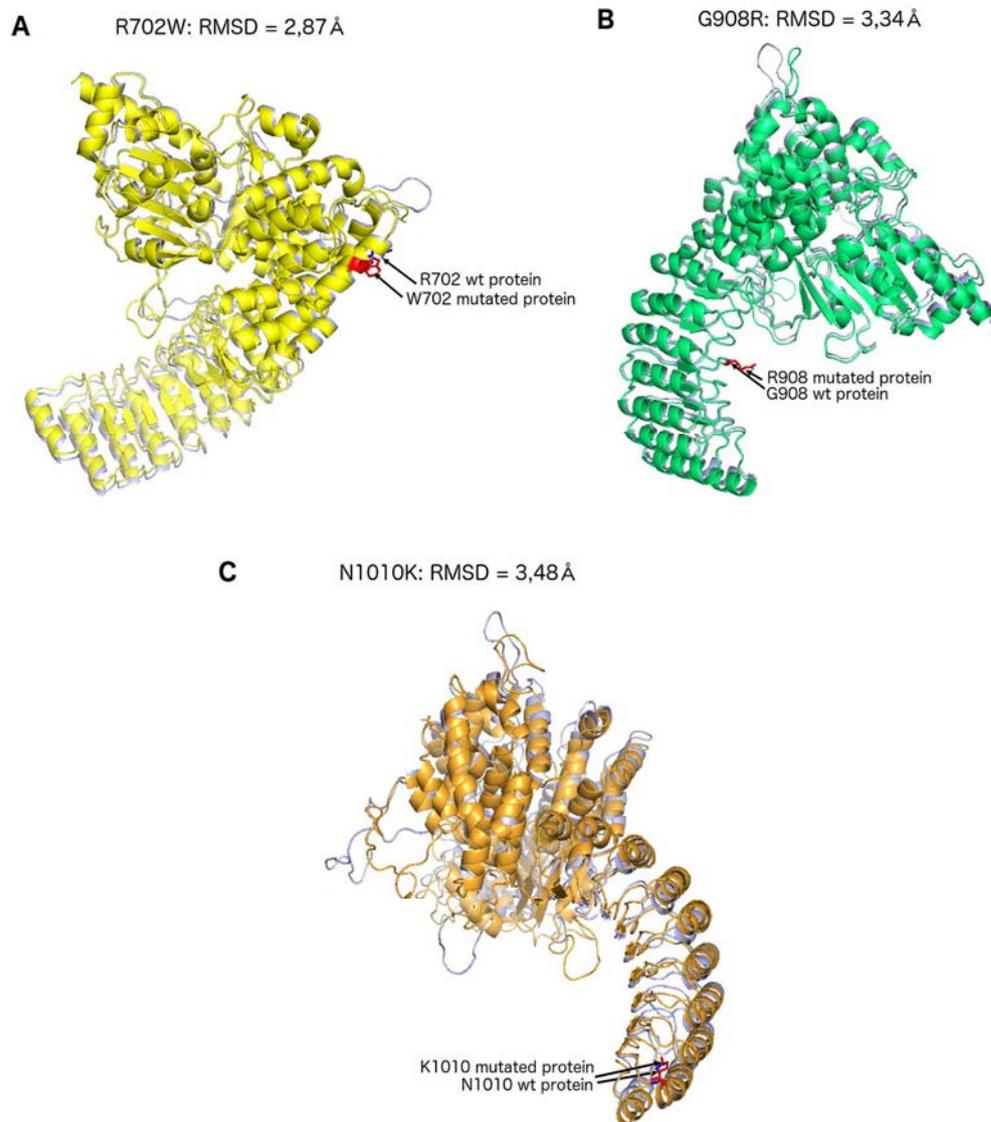


FIGURE 3.3 – Prévissions Prévissions structurelles de la protéine humaine native NOD2 (acides aminés 219 à 1040) et des protéines humaines mutées NOD2.

(A) Prévissions structurelles de la protéine humaine native NOD2 (acides aminés 219 à 1040) et de la protéine humaine mutée NOD2 R702W (acides aminés 219 à 1040); (B) prédications structurelles de la protéine native humaine NOD2 (acides aminés 219 à 1040) et de la protéine humaine mutée NOD2 G908R (acides aminés 219 à 1040); (C) prédications structurelles de la protéine native humaine NOD2 (acides aminés 219-1040) et de la protéine humaine mutée NOD2 N1010K (acides aminés 219-1040).

## 3.2 Autres variations génétiques retrouvées dans la famille F49M

L'analyse des résultats de WES des membres de la famille multiplexe F49M a permis d'identifier de nombreux variants. En effet, comme expliqué dans le chapitre 2, seuls les variants communs à tous les sujets atteints de MC et absents chez les contrôles intra-familiaux et ayant une fréquence < 1% dans la base de données 1000 génomes ont été retenus. Ainsi 39 variants ont été retenus sur ces critères (tableau 3.2).

Dans cette partie, le variant N1010K de *NOD2* ne sera plus étudié puisqu'il l'a été dans la première partie.

Chaque phénotype associé à des variations de ces 39 variants retenus a été recherché dans les bases de données Ensembl.org, GeneCards.org, OMIM.org, afin d'apprécier un rôle potentiel de ceux-ci dans la maladie de Crohn et donc dans l'aggrégation familiale de la MC dans la famille F49M.

De plus, l'effet délétère des 39 variants rares a été étudié en utilisant les indicateurs de prédiction *in silico* CADD Phred, SIFT et PolyPhen2. On a été retenus uniquement les variants ayant un effet délétère dans ces outils de prédiction *in silico*. Dans CADD Phred, un variant est prédit comme délétère si le score est supérieur à 20. Dans SIFT, un variant est prédit comme délétère si le score est inférieur à 0,05. Dans PolyPhen2, un variant est prédit comme délétère si le score est supérieur à 0,908. Le tableau 3.3 présente ces résultats pour les 3 variants retenus au vu de ces résultats (sans compter le variant du gène *NOD2*). Le variant du gène *NLRP7* a été retenu car la protéine NLRP7 intervient dans la voie de signalisation de l'inflammation.

Concernant tous les autres variants retrouvés, après avoir effectué la bibliographie pour chacun d'eux et des recherches dans les bases de données, nous n'avons rien relevé qui pourrait les rendre suspects. C'est pourquoi ils n'ont pas été retenus.

### 3.2.1 Variant du gène *BPIFB2*

Le premier variant retenu est le variant p.D359H du gène *BPIFB2*. Il s'agit d'une mutation faux-sens G>C en position 31607551 sur le chromosome 20 (position GRCh37) (NM\_025227.2). Cette mutation a pour conséquence, au niveau de la protéine BPIFB2, la substitution d'un acide aspartique par une histidine.

La protéine BPIFB2 (BPI fold containing family B member 2) est impliquée dans la voie de signalisation des défensines ainsi que dans celle du système immunitaire inné. Or nous avons vu précédemment que la MC est associée à une diminution de la production de défensines par les cellules de Paneth, entraînant une altération de l'intégrité de la barrière intestinale WEHKAMP et collab. [2005].

De plus, selon les prédictions *in silico* CADD-Phred, SIFT et PolyPhen2, la mutation p.D359H du gène *BPIFB2* apparaît comme délétère (respectivement 26,1 ; 0,01 et 0,886)

TABLEAU 3.2 – Liste des variants identifiés par l'analyse des résultats du WES.

Seuls les variants communs à tous les sujets atteints de MC, absents chez les contrôles intra-familiaux et ayant une fréquence < 1% dans la base de données 1000 génomes ont été retenus. Sub : substitution, 1KG CEU : 1000 Genomes, résidents de l'Utah avec ascendance de l'Europe de l'ouest et de l'Europe du nord, NFE : Européens non Finlandais, inconnu : variant inconnu dans aucune population.

Gène	INDEL SNP	Position GRCh37	modification	Fréquence 1KG CEU	Pathway/Phénotype associé au gène
<i>ATP10A</i>	SNP	15 :25963545	A455A	0	Syndrome d'Angelman système immunitaire inné voie signalisation défensive
<i>BPIFB2</i>	SNP	20 :31607551	D359H	0,0186	
<i>BRSK1</i>	INDEL	19 :55795407	delG	0	Ménopause système immunitaire inné voie signalisation défensive
<i>DEFB132</i>	SNP	20 :239757	G33V	0,0004	
<i>DNAH14</i>	SNP	1 :225328632	A551S	0 (NFE)	Microtubules
<i>EVA1A</i>	SNP	2 :75720637	D62N	0,001 (NFE)	Asthme
<i>FAM104B</i>	Sub	X :55172686	ACT>GTC S61N	inconnu	Non connu
<i>FAM104B</i>	INDEL	X :55172689	delA	inconnu	Non connu
<i>FAM104B</i>	SNP	X :55172572	T97I	0 (NFE)	Non connu
<i>FAM104B</i>	SNP	X :55172606	P86S	0	Non connu
<i>FAM104B</i>	SNP	X :55172680	P61R	0	Non connu
<i>FAM71E2</i>	SNP	19 :55870260	P659L	0,0159	Non connu
<i>FAT1</i>	SNP	4 :187584587	M1149T	0.0056	Gène suppresseur de tumeur
<i>GOLGA6L2</i>	SNP	15 :23689142	A125T	0	Cancer du testicules
<i>GOLGA8N</i>	SNP	15 :32895575	I456T	7,1e-05 (NFE)	Non connu
<i>ITPKB</i>	SNP	1 :226924484	C226R	8,9e-06 (NFE)	Asthme, Parkinson
<i>NLRP7</i>	SNP	19 :55451083	I368M	0,001 (NFE)	Mole hydatiforme Inflammasomes
<i>NOD2</i>	SNP	16 :50763792	N1010K	inconnu	Facteur de risque MC
<i>OBSCN</i>	SNP	1 :228447463	R180H	0,005	Dégénérescence Maculaire
<i>OR11H1</i>	SNP	22 :16449050	A252V	1,7e-05 (NFE)	Non connu
<i>OR2T7</i>	SNP	1 :248604881	D125V	0,021 (NFE)	Non connu
<i>OR4C5</i>	SNP	11 :48387155	Y288C	0,032 (NFE)	Défaut pression oculaire
<i>OR4M2</i>	SNP	15 :22368855	F94L	0,018 (NFE)	Défaut du goût/olfaction
<i>OR4M2</i>	SNP	15 :22369132	R186Q	0,018 (NFE)	Défaut du goût/olfaction
<i>OR4M2</i>	SNP	15 :22369179	S202C	0,017 (NFE)	Défaut du goût/olfaction
<i>PAK6</i>	SNP	15 :40558623	R262Q	0,015	Schizophrénie
<i>PCDHB10</i>	INDEL	5 :140574170	delAGGCCG	inconnu	Non connu
<i>PCDHB11</i>	SNP	5 :140580941	G167S	0,002 (NFE)	Non connu
<i>SGK2</i>	INDEL	20 :42199705	delGTGTGT	inconnu	Non connu
<i>SKA3</i>	SNP	13 :21750538	R27* STOP	0,087 (NFE)	non connu
<i>SRD5A1</i>	SNP	5 :6633779	A39G	inconnu	Obésité-ovaire polykystique
<i>SYT5</i>	SNP	19 :55689664	Y51S	3,9e-05 (NFE)	non connu
<i>ZNF717</i>	SNP	3 :75786132	Q831R	inconnu	Diabète
<i>ZNF717</i>	SNP	3 :75787015	G537S	inconnu	Diabète
<i>ZNF717</i>	SNP	3 :75787081	C515S	inconnu	Diabète
<i>ZNF717</i>	SNP	3 :75787127	Y499* STOP	0	Diabète
<i>ZNF717</i>	SNP	3 :75787416	C403Y	0	Diabète
<i>ZNF717</i>	INDEL	3 :75787048	insACTTATA	inconnu	Diabète
<i>CHST15</i>	INDEL	10 :125780753	delG	inconnu	maladies cardio-vasculaires

TABLEAU 3.3 – Indicateurs de prédiction *in silico* des effets délétères des mutations des gènes *BPIFB2*, *DEFB132* et *NLRP7*.

	<i>BPIFB2</i>	<i>DEFB132</i>	<i>NLRP7</i>
CADD Phred	26,1	9,661	0,001
SIFT	0,01	0	0,25
PolyPhen2	0,886	0,965	0,012
Score Grantham	81	109	10

(tableau 3.3). Bien que l'acide aspartique et l'histidine soient deux acides aminés hydrophiles, l'impact de la substitution D359H est considérée comme ayant un effet significatif selon le score de Grantham (81). Comme vu précédemment, le score de Grantham permet de prédire la distance entre deux acides aminés du point de vue évolutif. Un score de Grantham élevé est considéré comme délétère. A titre indicatif, la leucine et l'isoleucine sont les acides aminés les plus similaires avec un score de Grantham de 5 et les acides aminés les plus distants sont la cystéine et le tryptophane avec un score de Grantham de 215.

### 3.2.2 Variant du gène *DEFB132*

Le variant suivant retenu est le variant p.G33V du gène *DEFB132*. Il s'agit d'une mutation faux-sens G>T en position 239757 sur le chromosome 20 (position GRCh37) (NM\_207469.2). Cette mutation a pour conséquence, au niveau de la protéine *DEFB132*, la substitution d'une glycine par une valine.

La protéine *DEFB132* fait partie de la famille des  $\beta$ -défensines. Les défensines sont des polypeptides cationiques riches en cystéine qui jouent un rôle important dans la réponse immunitaire contre les microorganismes. Et comme la protéine *BPIFB2*, elle est impliquée dans les voies de signalisation des défensines et du système immunitaire inné.

De plus, selon SIFT et PolyPhen2, la mutation p.G33VH du gène *DEFB132* apparaît comme délétère (respectivement 0 et 0,965) et probablement délétère dans CADD Phred (9,661) (tableau 3.3). La glycine, acide aminé neutre est remplacée par une valine, acide aminé hydrophobe. Et l'impact de la substitution G33V est considéré comme ayant un effet significatif selon le score de Grantham (109).

### 3.2.3 Variant du gène *NLRP7*

Le variant suivant retenu est le variant p.I368M du gène *NLRP7*. Il s'agit d'une mutation faux-sens A>C en position 55451083 sur le chromosome 19 (position GRCh37). Cette mutation a pour conséquence, au niveau de la protéine *NLRP7*, la substitution d'une isoleucine par une méthionine.

La protéine *NLRP7* fait partie de la famille des **NLR** (comme NOD2 et *NLRP3*) et plus particulièrement du sous groupe des NLRP (domaine N-terminal = domaine pyrine, PYD) (cf. partie 1.3.1). Les protéines NLRP sont impliquées dans l'activation des caspases pro-

inflammatoires par le biais des complexes multiprotéiques : inflammasomes. La protéine NLRP7 peut agir en tant que régulateur de rétroaction ou sécrétion d'interleukine 1- $\beta$  dépendante de la caspase-1 (Figure 3.4). C'est pourquoi, il nous a semblé important de conserver ce variant afin d'aller plus loin dans les investigations.

Cependant, dans CADD-Phred, SIFT et PolyPhen2, la mutation p.I368M du gène *NLRP7* apparaît comme tolérée (respectivement 0,001 ; 0,25 et 0,012) (tableau 3.3). De la même manière, l'isoleucine, acide aminé hydrophobe est remplacé par une méthionine qui est aussi un acide aminé hydrophobe. L'impact de la substitution I368M est donc considéré comme nul et n'ayant pas d'effet significatif selon le score de Grantham (10).

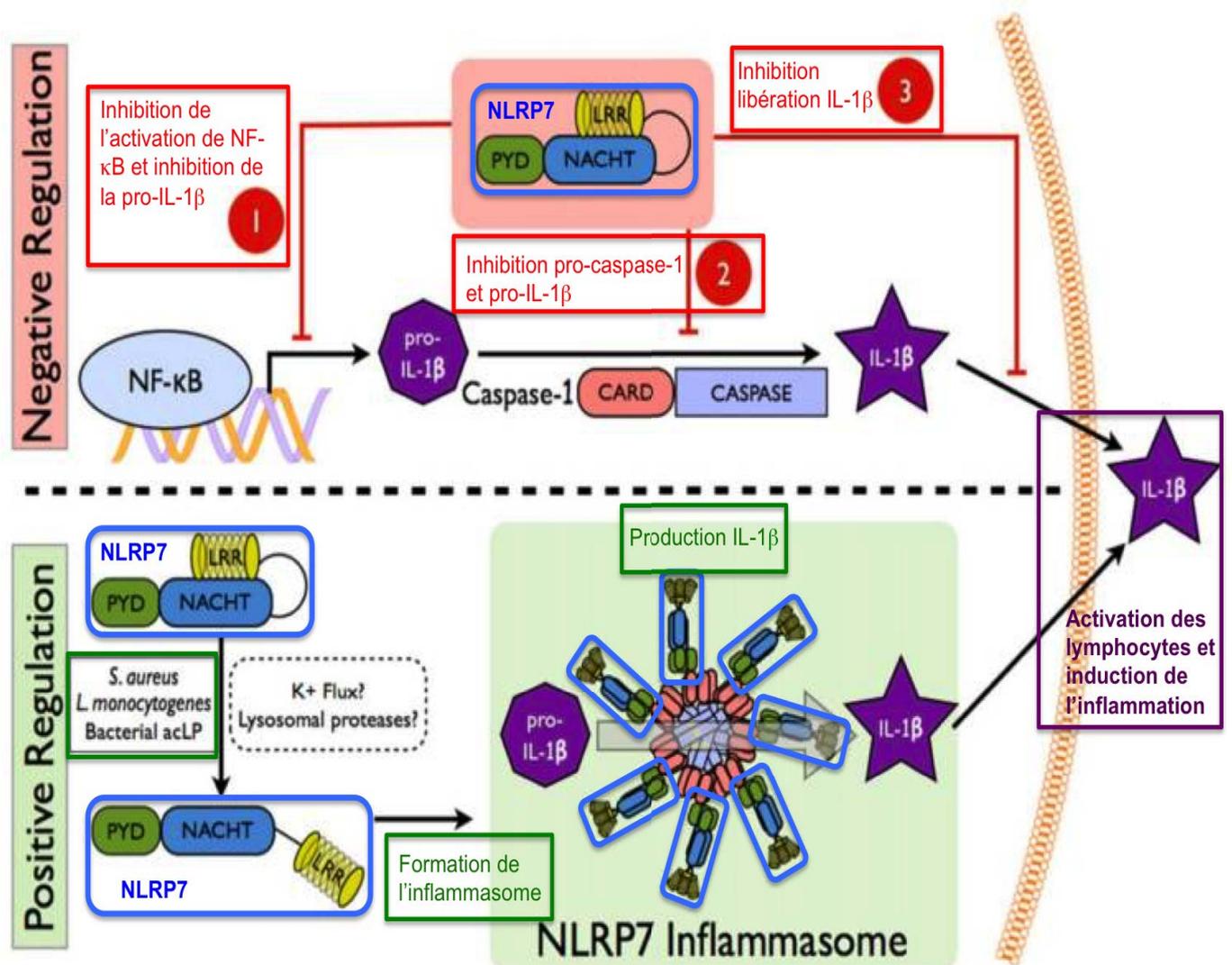


FIGURE 3.4 – Modes d'action de NLRP7 dans l'inflammation et la défense de l'hôte d'après RADIAN et collab. [2013]

**A :** Description des mécanismes par lesquels NLRP7 inhibe la libération de IL-1 $\beta$ . (1) NLRP7 inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B par un mécanisme inconnu, pouvant impliquer FAF1, qui empêche la transcription de la pro-IL-1 $\beta$ . (2) NLRP7 interagit directement avec la pro-caspase-1 et la pro-IL-1 $\beta$ , ce qui pourrait empêcher leur activation ou leur recrutement dans des inflammasomes. (3) NLRP7 se localise dans l'appareil de Golgi et pourrait affecter le trafic des vésicules matures contenant de l'IL-1 $\beta$  nécessaires à leur libération. **B :** Mécanisme de formation de l'inflammasome de NLRP7 en réponse à la détection de lipoprotéines acylées bactériennes.

### 3.3 Références

- OGURA, Y., N. INOHARA, A. BENITO, F. F. CHEN, S. YAMAOKA et G. NÚÑEZ. 2001, «Nod2, a nod1/apaf1 family member that is restricted to monocytes and activates nfkb», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, n° 7, p. 4812–4818. [62](#)
- RADIAN, A. D., L. DE ALMEIDA, A. ANDREA DORFLEUTNER et C. STEHLIK. 2013, «Nlrp7 and related inflammasome activating pattern recognition receptors and their function in host defense and disease», *Microbes Infection*, vol. 18, n° 0, p. 630–639. [x](#), [71](#)
- VASSEUR, F., B. SENDID, T. JOUAULT, A. STANDAERT-VITSE, L. DUBUQUOY, N. FRANCOIS, C. GOWER-ROUSSEAU, P. DESREUMAUX, F. BROLY, S. VERMEIRE, J. COLOMBEL et D. POULAIN. 2012, «Variants of nod1 and nod2 genes display opposite associations with familial risk of crohn's disease and anti saccharomyces cerevisiae antibody levels.», *Inflammatory Bowel Disease*, vol. 18, n° 3, p. 430–438. [62](#)
- WEHKAMP, J., N. H. SALZMAN, E. PORTER, S. NUDING, M. WEICHENTHAL, R. E. PETRAS, B. SHEN, E. SCHAEFFELER, M. SCHWAB, R. LINZMEIER, R. W. FEATHERS, H. CHU, H. LIMA JR., K. FELLERMANN, T. GANZ, E. F. STANGE et C. L. BEVINS. 2005, «Reduced paneth cell  $\alpha$ -defensins in ileal crohn's disease», *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*, vol. 102, n° 50, p. 18 129–18 134. [67](#)

# Chapitre 4

## Discussion et perspectives

« Celui qui n'a jamais commis  
d'erreur n'a jamais tenté  
d'innover. »

---

Albert Einstein

### Sommaire

---

<b>4.1</b>	<b>Caractérisation d'une nouvelle variation du gène <i>NOD2</i></b>	<b>74</b>
<b>4.2</b>	<b>Autres mutations génétiques retrouvées dans la famille F49M</b>	<b>76</b>
4.2.1	Mutations des gènes <i>BPIFB2</i> et <i>DEFB132</i>	76
4.2.2	Mutation du gène <i>NLRP7</i>	78
<b>4.3</b>	<b>Conclusion générale</b>	<b>79</b>
<b>4.4</b>	<b>Références</b>	<b>80</b>

---

## 4.1 Caractérisation d'une nouvelle variation du gène *NOD2*

L'analyse des résultats de l'étude MC-WES avec des contrôles intra-familiaux a permis de mettre en évidence une nouvelle mutation du gène *NOD2* : N1010K. Celle-ci peut être liée à la présence d'une agrégation familiale de la MC dans la famille F49M. Nous avons vu que le gène *NOD2* code pour une protéine de la famille des récepteurs de type NOD (NLR). Elle contribue à la détection des bactéries intracellulaires et à leur destruction, ce qui stimule la réponse inflammatoire par l'activation du facteur NF- $\kappa$ B [PHILPOTT et collab. \[2014\]](#). Trois mutations majeures modifiant la fonction de la partie C-terminale de la protéine ont été rapportées comme facteurs génétiques majeurs de prédisposition à la MC : p.R702W, p.G908R et p.L1007fs. Cependant, d'autres mutations rares du gène *NOD2* ont déjà été rapportées et seraient impliquées dans la susceptibilité à la MC [LESAGE et collab. \[2002\]](#); [RIVAS et collab. \[2011\]](#). En ce qui concerne les haplotypes au locus de *NOD2* chez les patients III : 2 et III : 3, ceux-ci présentent deux mutations du gène *NOD2*. Ces deux mutations sont situées sur deux haplotypes différents, puisque c.3030A> C; p.(N1010K) est hérité de la mère et c.3019dupC; p(L1007fs) est hérité du père. Ainsi, ces patients sont des hétérozygotes composites.

On peut supposer que la mutation N1010K de *NOD2* a un impact sur la fonction de la protéine NOD2. En effet, comme les mutations R702W, G908R et L1007fs, la mutation faux-sens N1010K est située dans le domaine de répétition riche en leucine (LRR) de la protéine NOD2. Ce motif est conservé au cours de l'évolution dans de nombreuses protéines et associé à l'immunité innée [INOHARA et collab. \[2005\]](#). Comme vu au chapitre 1, on sait que le domaine LRR est impliqué dans la reconnaissance des profils moléculaires associés aux agents pathogènes, y compris les composants des bactéries, tels que le peptidoglycane muramyl dipeptide bactérien ciblant la protéine NOD2 [INOHARA et collab. \[2003\]](#). De plus, les polymorphismes génétiques ayant un impact sur le domaine LRR sont les facteurs de risque génétique les plus importants dans la MC [CHO \[2008\]](#); [HUGOT et collab. \[2001\]](#).

Le résidu asparagine, bien conservé, qui est impliqué dans la mutation N1010K est un acide aminé polaire comme la lysine. Cependant, la proximité d'un acide aminé thréonine (T1012), conservé, au sein de la séquence de la protéine NOD2 pourrait former un motif [Asn-X-Ser / Thr] qui pourrait être une cible potentielle pour la N-glycosylation. Ceci pourrait ainsi conduire à une substitution délétère [GAVEL et VON HEIJNE \[1990\]](#). De plus, la substitution N1010K est considérée comme ayant un effet significatif selon le score de Grantham basé sur la différence physico-chimique entre l'asparagine et la lysine. Ainsi, en plus du fait que cet acide aminé qui est fortement conservé est localisé dans le domaine fonctionnel de NOD2 et que la mutation N1010K est absente de toutes les bases de données, la mutation N1010K est prédite comme étant délétère par les outils de prédiction *in silico* CADD Phred et SIFT, et probablement délétère par PolyPhen2. Les résultats de prédiction *in silico* pour les deux mutations faux-sens connues, R702W et G908R sont

similaires (tableau 4.1).

TABLEAU 4.1 – Comparaison de la mutation N1010K avec les mutations connues associées à la **MC** : R702W et G098R. Indicateurs de prédiction *in silico* des effets délétères des mutations de *NOD2*.

	<b>R702W</b>	<b>G908R</b>	<b>L1007fs</b>	<b>N1010K</b>
ExAC MAF in Non-Finnish CEU	0.04307	0.01187	0.02319	0
GnomAD MAF	0.02355	0.007589	0.01520	0
Kaviar MAF	0.2409	0.009595	0.01279	0
CADD Phred	24.6	29.8	35.0	22.6
SIFT	0.01	0.01	N/A	0
PolyPhen2	0.72	0.986	N/A	0.996
Grantham Score	101	125	N/A	94
<b>RMSD</b>	2.87 Å	3.34 Å	N/A	3.48 Å

La modélisation des protéines suggère que N1010K pourrait être associé à une altération de la structure 3D de la protéine *NOD2* native. Il n'y a pas d'homologie structurale entre la structure 3D native et les protéines *NOD2* mutées prédites hN1010K, hR702W et hG908R. C'est à dire que lorsque les structures protéiques sont comparées, elle ne se superposent pas exactement, il existe un décalage de ces structures protéiques (*NOD2* native, et *NOD2* mutées). Une analyse cristallographique a précédemment montré que le domaine LRR, entre les résidus 745 et 1020, comporte dix unités LRR formant une structure ayant la forme d'un fer à cheval dans une courbure unique avec des hélices  $\alpha$  à sa surface convexe et des brins  $\beta$  sur les faces concaves. Ainsi, le domaine LRR interagit étroitement avec les domaines HD1 et HD2 via cette structure 3D de la protéine *NOD2* **MAEKAWA et collab. [2016]**. En effet, le module *NOD* contient un domaine de liaison aux nucléotides (NBD), une hélice (WH, winged helix) et 2 domaines hélice (HD1 et HD2). Lors de la liaison du ligand, HD2 intervient dans les changements de conformation des domaines NBD, WH et HD1 pour permettre l'échange adénosine diphosphate – adénosine triphosphate, l'auto-oligomérisation et la signalisation en aval. Maekawa et ses collaborateurs ont émis l'hypothèse que les **Single Nucleotide Polymorphism (SNP)** associés à la **MC**, situés dans le domaine LRR perturberaient l'interaction entre HD1 ou HD2 et le domaine LRR **MAEKAWA et collab. [2016]**. Par conséquent, la mutation N1010K pourrait perturber ou atténuer l'association entre le domaine HD2 et le domaine LRR et pourrait agir comme une mutation perte de fonction. Cette hypothèse est renforcée par la conservation importante du résidu N1010.

Selon la classification de Montréal, deux des quatre patients seraient plus gravement atteints que les autres membres de la famille et présenteraient un diagnostic plus précoce de la maladie **GOWER-ROUSSEAU et collab. [1994]**. Les deux patients, III : 2 et III : 3, sont hétérozygotes composites L1007fs, N1010K. La mutation L1007fs est une mutation avec décalage de cadre de lecture qui génère une protéine *NOD2* tronquée, qui ne parvient pas à se localiser sur la membrane plasmique **BARNICH et collab. [2005]**; **OGURA et collab. [2001]**. Cette mutation produisant une protéine tronquée est un facteur de risque géné-

tique majeur de la **MC** **HUGOT et collab.** [2001]; **OGURA et collab.** [2001]. La concomitance de deux allèles mutés (L1007fs, N1010K) concernant le domaine LRR pourrait expliquer la survenue plus précoce de la **MC** chez ces patients hétérozygotes composites (III : 2 et III : 3). Girardelli et ses collaborateurs ont suggéré un effet cumulatif de mutations hétérozygotes dans la **MC**, mais ils ont uniquement envisagé des mutations dans deux gènes différents : K953E dans le gène *NOD2* et S159G / G351R dans le gène *IL10RA* **GIRARDELLI et collab.** [2014]. Des variations homozygotes de L1007fs ont été identifiées chez les patients présentant une plus grande perte de réponse à la liaison du muramyl dipeptide par *NOD2*. Ce même effet n'a pas été rapporté chez des hétérozygotes composites L1007fs et R702W **CHEN et collab.** [2017]. Considérant la proximité entre les mutations L1007fs et N1010K (3 acides aminés) dans le domaine LRR et une possible perte de fonction due à la mutation N1010K, on peut supposer qu'il existerait dans ce cas un impact similaire à celui d'une mutation homozygote de L1007fs.

Ces résultats suggèrent donc fortement que la mutation N1010K pourrait être un nouveau facteur de risque impliqué dans la susceptibilité génétique de la maladie de Crohn, elle pourrait expliquer l'agrégation familiale de la **MC** dans la famille F49M. Comme la mutation N1010K du gène *NOD2* est absente dans toutes les bases de données publiques (ExAC, GnomAD, Kaviar et 1000 Genomes), il est peu probable que cette mutation rare N1010K présente, en population générale, aussi bien chez des patients atteints de **MC** que chez des sujets contrôles des fréquences alléliques compatible avec une étude cas-contrôle. Cependant, on peut émettre l'hypothèse qu'un génotypage réalisé dans de grands groupes de patients atteints de la maladie de Crohn pourrait révéler cette mutation chez d'autres patients.

## 4.2 Autres mutations génétiques retrouvées dans la famille F49M

L'analyse des résultats de l'étude MC-WES avec contrôles intra-familiaux a permis de détecter 3 autres mutations suspectes dans l'agrégation familiale de la **MC** dans la famille F49M (sans compter le variant N1010K du gène *NOD2*) : les mutations D359H du gène *BPIFB2*, G33V du gène *DEFB132* et I368M du gène *NLRP7*.

Ces 3 mutations sont rares en population (<1%) et sont présentes chez tous les sujets atteints (II :2, II :6, III :2 et III :3) sous forme hétérozygote et absentes chez les contrôles intrafamiliaux (I :2, II :2 et III :1).

### 4.2.1 Mutations des gènes *BPIFB2* et *DEFB132*

Nous avons vu que le gène *BPIFB2* code pour une protéine de la famille des protéines de liaison lipopolysaccharide / transfert de lipides (LT / LBP). Il est aussi connu sous le

nom *BPIL1* pour bactericidal/permeability-increasing protein-like 1. La protéine BPIFB2 est impliquée dans la voie de signalisation des défensines ainsi que dans celle du système immunitaire inné (cf. [genecards.org](http://genecards.org)). Or nous avons vu précédemment que la MC est associée à une diminution de la production de défensines par les cellules de Paneth, entraînant une altération de l'intégrité de la barrière intestinale [WEHKAMP et collab. \[2005\]](#). De la même manière, nous avons vu que la protéine DEFB132 est aussi impliquée dans ces mêmes voies de signalisation. En effet, le gène *DEFB132* code pour une protéine qui fait partie de la famille des  $\beta$ -défensines. Les défensines sont des polypeptides cationiques riches en cystéine qui jouent un rôle important dans la réponse immunologique contre les microorganismes. Par contre, à ce jour, aucune mutation dans ces deux gènes n'a été associée à la MC.

On ne peut exclure que les mutations D359H du gène *BPIFB2* et G33V du gène *DEFB132* n'aient pas d'impact sur la fonction des protéines respectives BPIFB2 et DEFB132.

Concernant la mutation du gène *BPIFB2*, l'acide aspartique qui est impliquée dans la mutation D359H est un acide aminé hydrophile comme l'histidine. Cependant, l'acide aspartique est acide et peut être méthylé alors que l'histidine est basique et n'est pas méthylée. De plus, la structure 3D de la protéine BPIFB2 est prédite comme ayant une forme caractéristique de boomerang, avec deux régions similaires à corps cylindrique et deux poches de liaison potentielles hydrophobes, aussi retrouvées chez les autres membres de la famille LT / LBP [MULERO et collab. \[2002\]](#). La mutation D359H est proche de la région N-terminale qui, dans la structure 3D de la protéine, se trouve vers le site actif (figure 4.1) et le défaut de méthylation pourrait être délétère pour la fonction de la protéine. De plus, l'impact de la substitution D359H est prédit comme ayant un effet significatif selon le score de Grantham basé sur la différence physico-chimique entre l'acide aspartique et l'histidine. En plus des arguments précédents, la mutation faux-sens D359H est prédite comme délétère dans les outils de prédiction *in silico* CADD Phred, SIFT et PolyPhen2.

Concernant la mutation G33V du gène *DEFB132*, la glycine qui est impliquée dans la mutation G33V est un acide aminé neutre alors que la valine, qui la remplace, est un acide aminé hydrophobe. La structure 3D de cette protéine n'a pas encore été établie. Néanmoins, on sait qu'elle est principalement composée d'hélice  $\alpha$  et on peut supposer que la mutation intervertissant un acide aminé neutre par un acide aminé hydrophobe pourrait être délétère pour la fonction de cette protéine. En effet, la glycine est le seul acide aminé achiral qui, lorsqu'il est majoritairement impliqué dans une hélice  $\alpha$ , implique une hélice à pas de rotation gauche, les autres acides aminés biologiques chiraux L, comme la valine, déstabilisent ce type de structure. De plus, l'impact de la substitution G33V est considéré comme ayant un effet significatif selon le score de Grantham basé sur la différence physico-chimique entre la glycine et la valine. En plus des arguments précédents, la mutation faux-sens G33V est prédite comme délétère par les outils de prédiction *in silico* SIFT et PolyPhen2 et potentiellement délétère par CADD Phred.

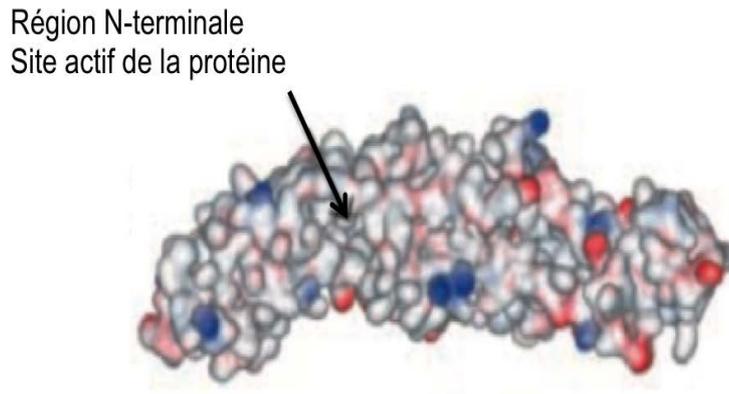


FIGURE 4.1 – Structure 3D de la protéine BIPFB2. D’après [MULERO et collab. \[2002\]](#)

Les résidus basiques (chargés positivement) sont bleus, tandis que les résidus acides (chargés négativement) sont rouges. La vue est orientée de manière à ce que la région contenant le site de liaison en région N-terminale soit bien visible.

Ainsi, on peut supposer que bien que les deux mutations D359H du gène *BPIFB2* et G33V du gène *DEFB132*, soient localisés sur deux gènes différents mais qui sont impliquées dans les mêmes voies de signalisation, elles pourraient agir ensemble et déterminer un effet dysfonctionnel cumulatif impliqué également dans l’aggregation familiale de la *MC* dans la famille F49M.

#### 4.2.2 Mutation du gène *NLRP7*

Concernant la mutation I368M du gène *NLRP7*, nous avons vu que la protéine *NLRP7* fait partie de la famille des *NLR* (comme *NOD2* et *NLRP3*) et plus particulièrement du sous groupe des *NLRP* (domaine N-terminal = domaine pyrine, *PYD*). Les protéines *NLRP* sont impliquées dans l’activation des caspases pro-inflammatoires par le biais des complexes multiprotéiques : inflammasomes. La protéine *NLRP7* peut agir en tant que régulateur de rétroaction ou sécrétion d’interleukine 1- $\beta$  dépendante de la caspase-1 (Figure 3.4). *NLRP7* joue donc un rôle important dans la réaction pro-inflammatoire.

De plus, la mutation I368M se situe dans le domaine *NACHT* de la protéine qui permet l’oligomérisation (Figure 4.2).

Cependant, l’impact de la substitution I368M ne peut pas être considérée comme ayant un effet significatif selon le score de Grantham basé sur la différence physico-chimique entre l’isoleucine et la Méthionine. De plus, la mutation faux-sens I368M est prédite comme tolérée selon les outils de prédiction *in silico* CADD Phred, SIFT et PolyPhen2.

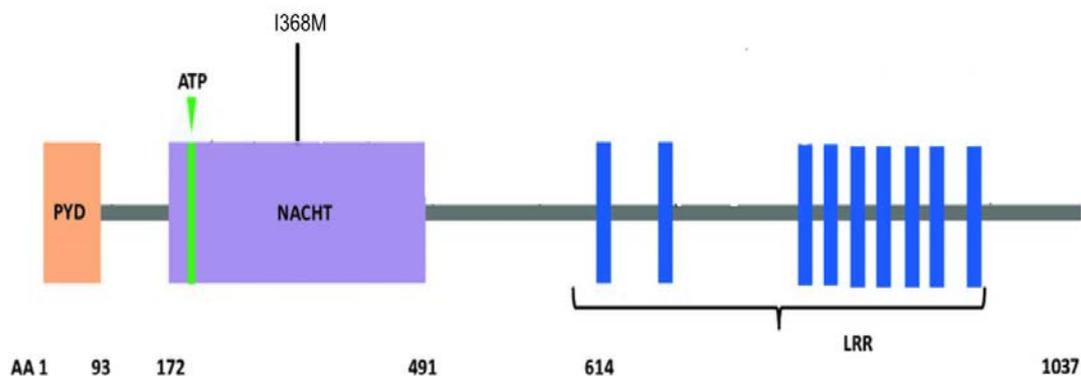


FIGURE 4.2 – Structure de la protéine NLRP7 et position de la mutation I368M, d'après [SILLS et col-lab. \[2017\]](#)

Ainsi, nous n'avons pas d'arguments pour soutenir l'hypothèse que la mutations I368M du gène *NLRP7* (impliquée dans la voie de signalisation pro-inflammatoire) soit impliquée dans l'aggregation familiale de la *MC* dans la famille F49M.

### 4.3 Conclusion générale

Nous avons vu que les résultats concernant les mutations du gène *NOD2*, suggèrent fortement que la mutation N1010K pourrait être un nouveau facteur de risque impliqué dans la susceptibilité génétique à la maladie de Crohn et qu'elle pourrait être un facteur génétique en rapport avec l'agrégation familiale de la *MC* dans la famille F49M. Comme la mutation N1010K du gène *NOD2* est absente de toutes les bases de données publiques (ExAC, GnomAD, Kaviar et 1000 Genomes), il est peu probable que cette mutation rare N1010K ait une fréquence allélique compatible avec une étude cas-contrôle. C'est pourquoi, nous n'avons pas envisagé son génotypage chez des patients issus du registre EPI-MAD et chez des témoins (étude cas-témoins). On peut cependant émettre l'hypothèse qu'un génotypage à grande échelle (dans de grands groupes de patients atteints de la maladie de Crohn) pourrait révéler cette mutation chez certains patients.

Les résultats concernant les mutations des autres gènes, suggèrent que seules les mutations D359H et G33V respectivement des gènes *BPIFB2* et *DEFB132*, avec un possible effet cumulatif, pourraient être impliquées dans l'aggregation familiale de la *MC*. Ainsi, Pour la famille F49M, l'agrégation familiale pourrait reposer sur l'accumulation de plusieurs mutations à effet délétère. Une étude dans la famille F49M, des variants de susceptibilité à la *MC* pour la plupart issus des études *GWAS*, est en cours (Vasseur F, communication personnelle). Les valeurs des scores polygéniques chez les sujets atteints et non

atteints de la famille F49M devraient ajouter un éclairage sur la susceptibilité génétique à la MC dans cette famille.

Les recherches futures devront se concentrer sur l'identification de nouveaux variants de susceptibilité à la MC comme l'a rapporté Y. Momozawa (MOMOZAWA et collab. [2011]). Des études fonctionnelles devraient être effectuées pour déterminer l'effet délétère des mutations N1010K du gène *NOD2*, D359H du gène *BPIFB2* et G33V du gène *DEFB132*.

En parallèle, des analyses WES dans 2 autres familles multiplexes issues du registre EPIMAD ont été effectuées et les données sont disponibles. L'analyse de leurs résultats devraient mettre en évidence d'autres facteurs de risques génétiques et constituer deux autres sujets potentiels de thèse.

La mutation N1010K du gène *NOD2* a été enregistrée dans HGMD Professional (The Human Gene Mutation Database) et sera accessible dans la version 2019.3 à l'automne 2019.

## 4.4 Références

- BARNICH, N., T. HISAMATSU, J. E. AGUIRRE, R. XAVIER, H.-C. REINECKER et D. K. PODOLSKY. 2005, «Grim19 interacts with nucleotide oligomerization domain 2 and serves as downstream effector of anti bacterial function in intestinal epithelial cells», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, n° 19, p. 19 021–19 026. 75
- CHEN, Y., M. SALEM, M. BOYD, J. BORNHOLDT, Y. LI, M. COSKUN, J. B. SEIDELIN, A. SANDELIN et O. H. NIELSEN. 2017, «Relation between nod2 genotype and changes in innate signaling in crohn's disease on mrna and mirna levels», *NPJ Genomic Medicine*, vol. 2, p. 3. 76
- CHO, J. H. 2008, «The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease», *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, n° 6, p. 458–466. 74
- GAVEL, Y. et G. VON HEIJNE. 1990, «Sequence differences between glycosylated and non glycosylated asn-x-thr/ser acceptor sites : implications for protein engineering», *Protein engineering*, vol. 3, n° 5, p. 433–442. 74
- GIRARDELLI, M., J. VUCH, A. TOMMASINI, S. CROVELLA et A. M. BIANCO. 2014, «Novel missense mutation in the nod2 gene in a patient with early onset ulcerative colitis : Causal or chance association?», *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 15, n° 3, p. 3834–3841. 76

- GOWER-ROUSSEAU, C., J.-L. SALOMEZ, J.-L. DUPAS, R. MARTI, M. NUTTENS, A. VOTTE, M. LEMAHIEU, B. LEMAIRE, J. COLOMBEL et A. CORTOT. 1994, «Incidence of inflammatory bowel disease in northern france (1988–1990).», *Gut*, vol. 35, n° 10, p. 1433–1438. [75](#)
- HUGOT, J. P., M. CHAMAILLARD, H. ZOUALI, S. LESAGE, J. P. CÉZARD, J. BELAICHE, S. ALMER, C. TYSK, C. A. O’MORAIN, M. GASSULL, V. BINDER, Y. FINKEL, A. CORTOT, R. MODIGLIANI, P. LAURENT PUIG, C. GOWER ROUSSEAU, J. MACRY, J. F. COLOMBEL, M. SAHBATOU et G. THOMAS. 2001, «Association of nod2 leucine rich repeat variants with susceptibility to crohn’s disease», *Nature*, vol. 411, n° 6837, p. 599–603. [74](#), [76](#)
- INOHARA, N., M. CHAMAILLARD, C. McDONALD et G. NUÑEZ. 2005, «Nod lrr proteins : Role in host microbial interactions and inflammatory disease», *Annual Review of Biochemistry*, vol. 74, p. 355–383. [74](#)
- INOHARA, N., Y. OGURA, A. FONTALBA, O. GUTIERREZ, F. PONS, J. CRESPO, K. FUKASE, S. INAMURA, S. KUSUMOTO, M. HASHIMOTO, S. J. FOSTER, A. P. MORAN, J. L. FERNANDEZ-LUNA et G. NUÑEZ. 2003, «Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through nod2. implications for crohn’s disease.», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, n° 8, p. 5509–5512. [74](#)
- LESAGE, S., H. ZOUALI, J.-P. CÉZARD, A.-S. JANNOT, G. THOMAS et J.-P. HUGOT. 2002, «Card15/nod2 mutational analysis and genotype phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease», *American Journal of Human Genetics*, vol. 70, n° 4, p. 845–857. [74](#)
- MAEKAWA, S., U. OHTO, T. SHIBATA, K. MIYAKE et T. SHIMIZU. 2016, «Crystal structure of nod2 and its implications in human disease.», *Nature Communications*, vol. 10, n° 7, p. 11 813. [75](#)
- MOMOZAWA, Y., M. MNI, K. NAKAMURA, W. COPPIETERS, S. ALMER, L. AMININEJAD, I. CLEYNEN, J. COLOMBEL, P. DE RIJK, O. DEWIT, Y. FINKEL, M. GASSULL, D. GOOSSENS, D. LAUKENS, M. LÉMANN, C. LIBIOULLE, C. O’MORAIN, C. REENAERS, P. RUTGEERTS, C. TYSK, D. ZELENKA, M. LATHROP, J. DEL-FAVERO, J. HUGOT, M. DE VOS, D. FRANCHIMONT, S. VERMEIRE, E. LOUIS et M. GEORGES. 2011, «Resequencing of positional candidates identifies low frequency il23r coding variants protecting against inflammatory bowel disease», *Nature Genetics*, vol. 43, n° 1, p. 43–47. [80](#)
- MULERO, J. J., B. J. BOYLE, S. BRADLEY, J. M. BRIGHT, S. T. NELKEN, T. T. HO, N. K. MIZE, J. D. CHILDS, D. G. BALLINGER, J. E. FORD et F. RUPP. 2002, «Three new human members of the lipid transfer/lipopolysaccharide binding protein family (lt/lbp)», *Immunogenetics*, vol. 54, n° 5, p. 293–300. [x](#), [77](#), [78](#)

OGURA, Y., D. K. BONEN, N. INOHARA, D. L. NICOLAE, F. F. CHEN, R. RAMOS, H. BRITTON, T. MORAN, R. KARALIUSKAS, R. H. DUERR, J.-P. ACHKAR, S. R. BRANT, T. M. BAYLESS, B. S. KIRSCHNER, S. B. HANAUER, G. NUÑEZ et J. H. CHO. 2001, «A frameshift mutation in nod2 associated with susceptibility to crohn's disease», *Nature*, vol. 411, n° 6837, p. 603–606. [75](#), [76](#)

PHILPOTT, D. J., M. T. SORBARA, S. J. ROBERTSON, K. CROITORU et S. E. GIRARDIN. 2014, «Nod proteins : regulators of inflammation in health and disease», *Nature Reviews Immunology*, vol. 14, n° 1, p. 9–23. [74](#)

RIVAS, M. A., M. BEAUDOIN, A. GARDET, C. STEVENS, Y. SHARMA, C. K. ZHANG, G. BOUCHER, S. RIPKE, D. ELLINGHAUS, N. BURTT, T. FENNEL, A. KIRBY, A. LATIANO, P. GOYETTE, T. GREEN, J. HALFVARSON, T. HARITUNIANS, J. M. KORN, F. KURUVILLA, C. LAGACÉ, B. NEALE, K. S. LO, P. SCHUMM, L. TÖRKVIST, M. C. DUBINSKY, S. R. BRANT, M. S. SILVERBERG, R. H. DUERR, D. ALTSHULER, S. GABRIEL, G. LETTRE, A. FRANKE, M. D'AMATO, D. P. MCGOVERN, J. H. CHO, J. D. RIOUX et M. J. XAVIER, RAMNIK J. AND DALY. 2011, «Deep resequencing of gwas loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease», *Nature Genetics*, vol. 43, n° 11, p. 1066–1073. [74](#)

SILLS, E. S., A. J. OBREGON-TITO, H. GAO, T. K. MC WILLIAMS, A. T. GORDON, C. A. ADAMS et R. SLIM. 2017, «Pathogenic variant in nlrp7 (19q13.42) associated with recurrent gestational trophoblastic disease : Data from early embryo development observed during in vitro fertilization», *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, vol. 44, n° 1, p. 40–46. [x](#), [79](#)

WEHKAMP, J., N. H. SALZMAN, E. PORTER, S. NUDING, M. WEICHENTHAL, R. E. PETRAS, B. SHEN, E. SCHAEFFELER, M. SCHWAB, R. LINZMEIER, R. W. FEATHERS, H. CHU, H. LIMA JR., K. FELLERMANN, T. GANZ, E. F. STANGE et C. L. BEVINS. 2005, «Reduced paneth cell  $\alpha$ -defensins in ileal crohn's disease», *Proceedings of the National Academy of Science of United States of América*, vol. 102, n° 50, p. 18 129–18 134. [77](#)

# **Annexe A**

## **Annexes**

**A.1 Publication dans International Journal of Molecular Sciences,  
Impact Factor : 4.183**



Article

# A Novel Rare Missense Variation of the *NOD2* Gene: Evidences of Implication in Crohn's Disease

Sara Frade-Proud'Hon-Clerc <sup>1,\*</sup>, Thomas Smol <sup>2,3</sup> , Frédéric Frenois <sup>2</sup>, Olivier Sand <sup>4</sup>, Emmanuel Vaillant <sup>4</sup>, Véronique Dhennin <sup>4</sup> , Amélie Bonnefond <sup>4,5</sup>, Philippe Froguel <sup>4,5</sup>, Mathurin Fumery <sup>6</sup>, Nathalie Guillon-Dellac <sup>7,8</sup>, Corinne Gower-Rousseau <sup>7,8</sup> and Francis Vasseur <sup>1</sup>

<sup>1</sup> EA2694—Santé Publique: épidémiologie et qualité des soins, University Lille, CHU Lille, F-59000 Lille, France; francis.vasseur@univ-lille2.fr

<sup>2</sup> EA 7364—RADEME—Maladies RAres du Développement embryonnaire et du Métabolisme, University Lille, F-59000 Lille, France; Thomas.SMOL@chru-lille.fr (T.S.); Frederic.FRENOIS@chru-lille.fr (F.F.)

<sup>3</sup> CHU Lille, Institut de Génétique Médicale, F-59000 Lille, France

<sup>4</sup> CNRS UMR 8199, European Genomic Institute for Diabetes (EGID), Institut Pasteur de Lille, University of Lille, F-59000 Lille, France; Olivier.sand@cnrs.fr (O.S.); Emmanuel.Vaillant@cnrs.fr (E.V.); veronique.dhennin@cnrs.fr (V.D.); Amelie.bonnefond@cnrs.fr (A.B.); philippe.froguel@cnrs.fr (P.F.)

<sup>5</sup> Department of Medicine, Section of Genomics of Common Disease, Imperial College London, London SW7 2AZ, UK

<sup>6</sup> Registre Epimad, Gastroenterology Unit, Amiens University Hospital, F-80054 Amiens, France; fumery.mathurin@chu-amiens.fr

<sup>7</sup> Registre Epimad, Service de Santé Publique, d'Épidémiologie, d'Économie de la Santé et de la Prévention, Maison Régionale de la Recherche Clinique, CHU Lille, F-59000 Lille, France; nathalie.guillon@chru-lille.fr (N.G.-D.); corinne.gower@chru-lille.fr (C.G.-R.)

<sup>8</sup> Inserm, UMR 995—LIRIC, Université de Lille, F-59000 Lille, France

\* Correspondence: sara.frade@chru-lille.fr; Tel.: +33-320-444-145

Received: 12 November 2018; Accepted: 3 February 2019; Published: 15 February 2019



**Abstract:** The *NOD2* gene, involved in innate immune responses to bacterial peptidoglycan, has been found to be closely associated with Crohn's Disease (CD), with an Odds Ratio ranging from 3–36. Families with three or more CD-affected members were related to a high frequency of *NOD2* gene variations, such as R702W, G908R, and 1007fs, and were reported in the EPIMAD Registry. However, some rare CD multiplex families were described without identification of common *NOD2* linked-to-disease variations. In order to identify new genetic variation(s) closely linked with CD, whole exome sequencing was performed on available subjects, comprising four patients in two generations affected with Crohn's disease without R702W and G908R variation and three unaffected related subjects. A rare and, not yet, reported missense variation of the *NOD2* gene, N1010K, was detected and co-segregated across affected patients. In silico evaluation and modelling highlighted evidence for an adverse effect of the N1010K variation with regard to CD. Moreover, cumulative characterization of N1010K and 1007fs as a compound heterozygous state in two, more severe CD family members strongly suggests that N1010K could well be a new risk factor involved in Crohn's disease genetic susceptibility.

**Keywords:** Crohn's disease; *NOD2* gene; variation; WES

## **A.2 Protocole MC-WES**

**« Recherche de nouvelles mutations génétiques à effet majeur dans la maladie  
de Crohn »  
MC-WES**

N° de code attribué par le promoteur : 2013\_53  
N° ID-RCB : 2014-A00023-44

**Investigateur Principal :** Dr Corinne GOWER  
Pôle de Santé Publique,  
MRRC, CHRU de Lille  
Tél : 03.20.43.35.41  
Mail : corinne.gower@chru-lille.fr

**Co-Investigateurs :** Dr Nathalie GUILLON  
Pôle de Santé Publique  
MRRC, CHRU Lille  
Tél : 03.20.44.60.41  
Mail : nathalie.guillon@chru-lille.fr

**Collaborateurs scientifiques:** Sara FRADE  
Fédération de la Recherche Clinique, CHRU de Lille  
Tel : 03.20.44.41.45  
Mail : [sara.frade@chru-lille.fr](mailto:sara.frade@chru-lille.fr)

**Méthodologie et épidémiogénétique :**  
Dr. Francis VASSEUR,  
Plate forme d'aide méthodologique – EA 2694  
Pôle de Santé Publique  
MRRC, CHRU Lille

**Promoteur de l'étude :** CHRU de Lille  
Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation  
1 avenue Oscar Lambret  
59037 LILLE Cedex  
tél : 03 20 44 59 69

Expertisé par la Fédération de Recherche Clinique du CHRU de Lille le : 06/01/2014

**Version n°1.1 du 24/02/2014**

**Date et signature :**

## SOMMAIRE

<b>1</b>	<b>SYNOPSIS</b> .....	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Rationnel</b> .....	<b>7</b>
	<b>Justification scientifique et description générale de la recherche</b> .....	<b>7</b>
2.1	Contexte scientifique .....	7
2.2	Hypothèse .....	8
2.3	Faisabilité .....	11
2.4	Résultats attendus.....	11
<b>3</b>	<b>Objectif de la recherche</b> .....	<b>12</b>
3.1	Objectif principal.....	12
3.2	Objectifs secondaires et les hypothèses générées .....	12
<b>4</b>	<b>Conception de la recherche</b> .....	<b>12</b>
4.1	Plan Expérimental .....	12
4.2	Définition de la population étudiée .....	13
4.2.1	Critères d'inclusion.....	13
4.2.2	Critères de non-inclusion.....	14
4.3	Critères d'évaluation.....	14
4.3.1	Critère principal, permettant de répondre à l'objectif principal :.....	14
4.3.2	Critères secondaires permettant de répondre aux objectifs secondaires: 14	
4.4	Calcul du nombre de sujets.....	14
4.5	Méthode et stratégie d'analyse.....	15
<b>5</b>	<b>Logistique de l'étude</b> .....	<b>15</b>
5.1	Equipes participantes et expérience de l'équipe dans le domaine .....	15
5.2	Lieux de réalisation de la recherche.....	15
5.3	Déroulement pratique de la recherche .....	16
5.4	Durée .....	19
5.5	Critères d'arrêt de participation à l'étude.....	19
5.6	Interdiction de participation simultanée – Période d'exclusion .....	19
5.7	Bénéfices, risques et contraintes de l'étude .....	20
5.8	Comité Scientifique .....	20
<b>6</b>	<b>Traitements</b> .....	<b>20</b>
<b>7</b>	<b>Biologie et/ou collection biologique</b> .....	<b>20</b>
7.1	Conditions de prélèvement et de traitement des liquides biologiques .....	20
7.1.1	Prélèvements sanguins.....	20
7.1.2	Prélèvements de selles .....	21
7.2	Mode d'étiquetage, de transport et de stockage des prélèvements .....	21
7.3	Méthode utilisée pour assurer la traçabilité et la conservation des prélèvements .....	21
7.4	Classification « type assurance » au niveau des risques .....	23
<b>8</b>	<b>Evénements indésirables</b> .....	<b>23</b>
8.1	Définitions .....	23
8.2	Evénements indésirables et risques liés au protocole.....	23
8.3	Procédures mises en place en vue de l'enregistrement et de la notification des événements indésirables.....	24
<b>9</b>	<b>Droit d'accès aux données et documents sources</b> .....	<b>25</b>
<b>10</b>	<b>Contrôle et assurance de la qualité</b> .....	<b>25</b>
10.1	Déroulement de l'essai.....	25
10.2	Monitoring de l'étude .....	25
10.3	Clôture de l'étude .....	26
<b>11</b>	<b>Considérations éthiques et légales</b> .....	<b>26</b>

<b>12</b>	<b>Traitement des données et conservation des documents et des données relatives à la recherche .....</b>	<b>28</b>
<b>13</b>	<b>Financement et assurance .....</b>	<b>28</b>
13.1	Financement.....	28
13.1.1	Analyse détaillée des coûts.....	28
13.1.2	Source de financement .....	29
13.2	Assurance .....	29
<b>14</b>	<b>Publication- Valorisation .....</b>	<b>29</b>
<b>15</b>	<b>Liste des annexes .....</b>	<b>29</b>

# 1 SYNOPSIS

PROMOTEUR	CHRU de Lille, Délégation à la recherche clinique et à l'innovation 1 avenue Oscar Lambret, 59037 LILLE Cedex Tél : 03 20 44 59 69
TITRE	Recherche de nouvelles mutations génétiques à effet majeur dans la maladie de Crohn
COORDONNATEUR	Dr Corinne GOWER
NOMBRE DE CENTRES	1
TYPE D'ETUDE	Recherche biomédicale Etude de recherche d'épidémiologie génétique
OBJECTIFS	<p><u>Objectif principal :</u> Identifier de nouvelles mutations génétiques à effet majeur dans la maladie de Crohn.</p> <p><u>Objectifs secondaires :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Déterminer dans les formes familiales de maladie de Crohn, les profils génétiques des patients atteints de maladie de Crohn et de leurs apparentés sains concernant les nombreux facteurs mineurs de susceptibilité génétique déjà répertoriés dans la maladie de Crohn</li> <li>- Constitution d'une collection biologique d'ADN, de sérum et de selles. En effet de nombreux travaux mettent en évidence une influence des caractères génétiques sur la composition du microbiote fécal. Cette collection biologique pourra être utilisée dans une prochaine étude.</li> </ul>
PLAN EXPERIMENTAL	Etude familiale avec contrôle intrafamilial, étude de recherche d'épidémiogénétique
CRITERES D'EVALUATION	<p><u>Critère principal :</u> Sélection des mutations génétiques identifiées par Whole exome sequencing (WES), au sein d'une même famille, présentes chez le (ou les) sujet(s) atteint(s) de maladie de Crohn (MC) et absentes chez le sujet sain,</p> <p><u>Critères secondaires :</u> Détermination des profils génétiques des patients atteints de maladie de Crohn et de leurs apparentés sains concernant les nombreux facteurs mineurs de susceptibilité génétique déjà répertoriés dans la maladie de Crohn.</p>
CRITERES D'INCLUSION	<p><b><u>Critères d'inclusion spécifiques au patient Proband</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Homme ou femme</li> <li>- âgé de 5 à 80 ans</li> <li>- Patient atteint de maladie de Crohn</li> <li>- Appartenir à une famille présentant au moins 3 sujets atteints de maladie de Crohn</li> <li>- Etre d'accord sur le principe de contacter ses apparentés au 1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup> et/ou 3<sup>ème</sup> degré</li> <li>- Patient ayant signé le consentement éclairé « Patient</li> </ul>

	<p>Probant »</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Etre capable de recevoir l'information éclairée spécifique</li> <li>- Avoir donné son accord de participation et avoir signé le consentement éclairé spécifique. Si le patient est mineur, le ou les titulaires de l'autorité parentale devront avoir été informés et devront avoir signé le consentement, de même que l'enfant.</li> <li>- Etre assuré social ou ayant droit d'un assuré social</li> </ul> <p><b><u>Critères d'inclusion spécifiques aux apparentés du patient probant et identifiés comme indemnes de maladie de Crohn</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Homme ou femme</li> <li>- âgé de 18 à 80 ans</li> <li>- Etre capable de recevoir l'information éclairée spécifique</li> <li>- Avoir donné son accord de participation et avoir signé le consentement éclairé spécifique.</li> <li>- Etre assuré social ou ayant droit d'un assuré social</li> </ul> <p>Dans le cas où nous n'arriverions pas à obtenir le consentement de 3 personnes atteintes de MC et d'une personne apparentée saine, dans la même famille, les échantillons prélevés seront uniquement utilisés pour la collection biologique.</p>
<p>CRITERES DE NON INCLUSION</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Impossibilité de recevoir une information éclairée.</li> <li>- Refus de signer le formulaire de consentement</li> <li>- Impossibilité de réunir le probant et au moins trois sujets additionnels apparentés au probant (un sujet sain et deux sujets atteints de maladie de Crohn)</li> <li>- Patient non affilié à un régime de sécurité sociale</li> <li>- Femmes enceintes ou allaitantes</li> <li>- Majeurs protégés</li> </ul>
<p>NOMBRE DE PARTICIPANTS</p>	<p>30 familles multiplexes</p>
<p>STRATEGIE D'ANALYSE STATISTIQUE</p>	<p>Aucun test statistique ne sera appliqué : une comparaison des séquences d'ADN exoniques sera réalisée entre les sujets atteints et un sujet sain d'une même famille.</p> <p>Une analyse bioinformatique complète des données de séquençage produites, sera réalisée au sein de chaque famille de façon indépendante. Cette analyse effectuée par l'UMR 8199 permettra de sélectionner les mutations rares présentes chez les patients atteints de maladie de Crohn et absentes chez l'apparenté non atteint. Les mutations répondant à ces critères seront ensuite génotypées sur l'ensemble de la famille afin de préciser leur association avec la maladie de Crohn</p>
<p>DEROULEMENT DE L'ETUDE</p>	<p><u>Etape 1 : inclusion des familles</u></p> <p>Seront ciblées les familles multiplexes, issues du Registre EPIMAD, présentant des arbres typiques d'une agrégation familiale (plus de 3 patients atteints de maladie de Crohn) sans implication des mutations du gène <i>NOD2</i>, facteur génétique majeur de susceptibilité à la maladie de Crohn.</p> <p>Au cours d'une consultation de suivi, le Dr Gower expliquera l'étude, au probant atteint de maladie de Crohn et faisant partie d'une des familles multiplexes sélectionnées. Il sera, ensuite, demandé au probant de proposer aux membres de sa famille de 1<sup>er</sup>, 2<sup>d</sup> et 3<sup>ème</sup> degré, quelque soit le statut vis à vis de la MC, de participer à l'étude. Il leur transmettra un document d'information sur le déroulement de l'étude et son objectif, un coupon réponse à l'attention du Dr Gower, ainsi que des kits de prélèvement de selles. En cas, d'accord de participation, il sera demandé à chaque participant de revenir avec ses prélèvements de selles.</p>

	<p>Dans le cas de probant ou d'apparenté mineurs, l'investigateur expliquera l'étude aux parents et à l'enfant. Après avoir répondu à toutes leurs questions, si l'enfant et ses parents souhaitent qu'il participe à l'étude, ils donnerons leur accord par écrit en signant les consentements éclairés adéquats (consentement pour les parents et consentement pour participant mineur). Il sera proposé une signature du consentement à l'enfant mineur, en fonction de son niveau de compréhension.</p> <p>Un rendez-vous avec le Dr Gower sera ensuite pris avec les membres de la famille ayant transmis leur souhait de participer à l'étude (via retour du coupon réponse), afin que l'investigateur puisse leur expliquer l'étude et répondre à toutes les questions qu'ils peuvent se poser.</p> <p>Les différents sujets donneront leur accord de participation écrit en signant un consentement éclairé.</p> <p><u>Etape 2 : prélèvement</u></p> <p>Après signature du consentement éclairé, un prélèvement sanguin de 30 ml sera effectué pour l'analyse génétique et les selles seront récupérées. Pour les enfants, le volume maximal de sang prélevé en 1 fois sera fonction du poids et n'excèdera pas 1% de leur volume de sang total.</p> <p><u>Etape 3 : Analyses génétiques</u></p> <p>Les échantillons d'ADN seront transmis par le CRB à l'unité UMR CNRS 8199.</p> <p>Dans un premier temps, l'absence de mutation du gène <i>NOD2</i> sera vérifiée chez le probant de chaque famille.</p> <p>Puis une analyse par Whole Exome Sequencing (WES) sera effectuée chez au moins 4 sujets par famille (trois patients atteints de maladie de Crohn, un sujet non atteint et apparenté avec les patients atteints). Les variations génétiques (mutations) présentes chez les patients et absentes chez le sujet non atteint seront génotypées chez tous les membres de la famille pour confirmer leur association avec la maladie de Crohn.</p>
<p>PROCEDURE D'INVESTIGATION SPECIFIQUE A L'ETUDE ET DIFFERENCES PAR RAPPORT A LA PRISE EN CHARGE HABITUELLE</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Un prélèvement sanguin (30 ml chez les adultes et n'excédant pas 1% du volume sanguin total chez l'enfant), sur EDTA, sera effectué pour l'analyse génétique, la constitution de la collection biologique d'ADN et de sérum.</li> <li>- Récupération du prélèvement de selles, pour la constitution de la collection biologique de selles et pour le dosage de calprotectine pour les sujets sains.</li> </ul>
<p>EVALUATION DES BENEFICES ET DES RISQUES LIES À LA RECHERCHE</p>	<p>Il n'y a pas pour le participant de bénéfice attendu liée à cette recherche.</p>
<p>PERIODE D'EXCLUSION</p>	<p>Il n'y a pas de période d'exclusion à l'issue de la recherche.</p>
<p>JUSTIFICATION DE LA CONSTITUTION OU NON D'UN COMITE DE SURVEILLANCE</p>	<p>Cette étude ne nécessite pas la mise en place d'un comité de surveillance.</p>
<p>DUREE DE L'ETUDE</p>	<p>3 ans</p>

## 2 Rationnel

### Justification scientifique et description générale de la recherche

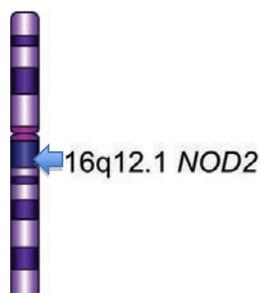
#### 2.1 Contexte scientifique

La maladie de Crohn (MC) est une Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin (MICI) qui touche environ 100 000 personnes en France et plus d'un million en Europe. Bien que nos connaissances aient récemment progressées, l'origine de cette maladie reste inconnue. L'hypothèse la plus communément admise est que la MC est liée à une dérégulation de la réaction immunitaire muqueuse vis-à-vis d'un microbiote intestinal déséquilibré (dysbiose) sous l'influence de facteurs environnementaux et de facteurs génétiques de susceptibilité.

Dans cette étude, nous nous intéressons plus particulièrement aux facteurs génétiques de prédisposition à la maladie. Les dernières avancées (en 2010) montrent qu'il existe plus de 100 facteurs de susceptibilité génétique<sup>1</sup>. L'un de ces facteurs a été identifié en 2001 : les mutations, du gène *CARD15/NOD2*<sup>2,3,4,5,6</sup> sont des facteurs génétiques majeurs de susceptibilité à la maladie de Crohn. Ce gène code pour une protéine qui appartient à une famille des protéines intracellulaires contenant un "caspase recruitment domain" (CARD), un "nucleotide binding domain" et un domaine régulateur en C terminal.

Cette famille représente des récepteurs intracellulaires de bactéries et de leurs produits de dégradation et transduit un signal conduisant à l'activation de NFκB<sup>7</sup>.

Trois mutations du gène *NOD2* (R702W, G908R, 1007fs) représentent la majorité (81%) des variants du gène associé à la maladie de Crohn, et leur présence confère un sur-risque important de maladie de Crohn avec des odd ratios (OR) de 1,97 à 34,66 selon les mutations impliquées et le statut génétique du patient<sup>9</sup>.



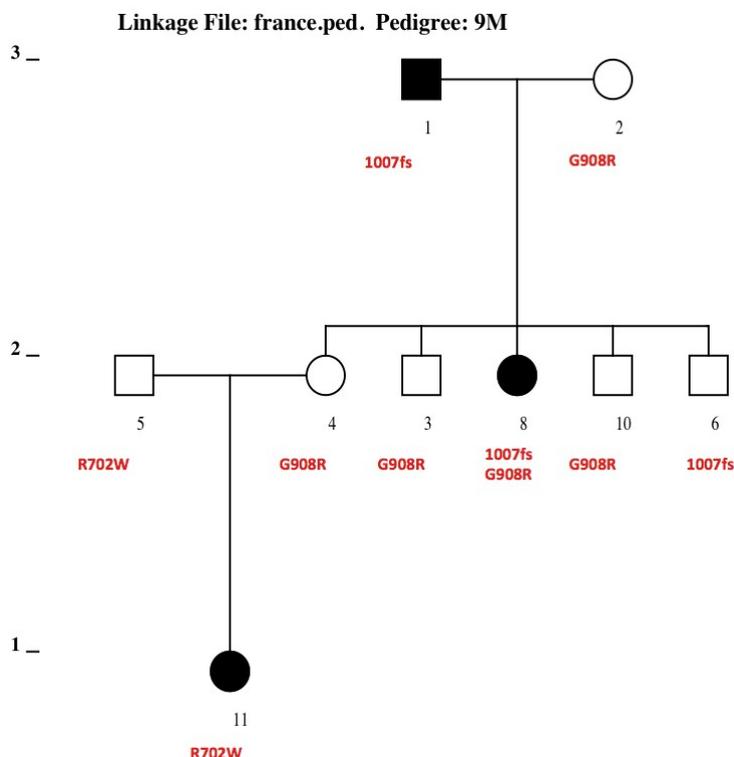
		<b>Sur risque de maladie de Crohn (Odd Ratios)</b>	
Réf dbSNP	mutation	Sujet +/- hétérozygote	Sujet -/- homozygote
rs2066844	R702W Arg702Trp	OR= 1,97	OR= 3,29
rs2066845	G908R Gly908Arg	OR= x 3,05	OR= 12,13
rs2066847	1007fs Exon 11 insertion C décalage du cadre de lecture	OR= 4,55	OR= 34,66

#### Gène *NOD2* et ses variants majeurs de susceptibilité à la MC

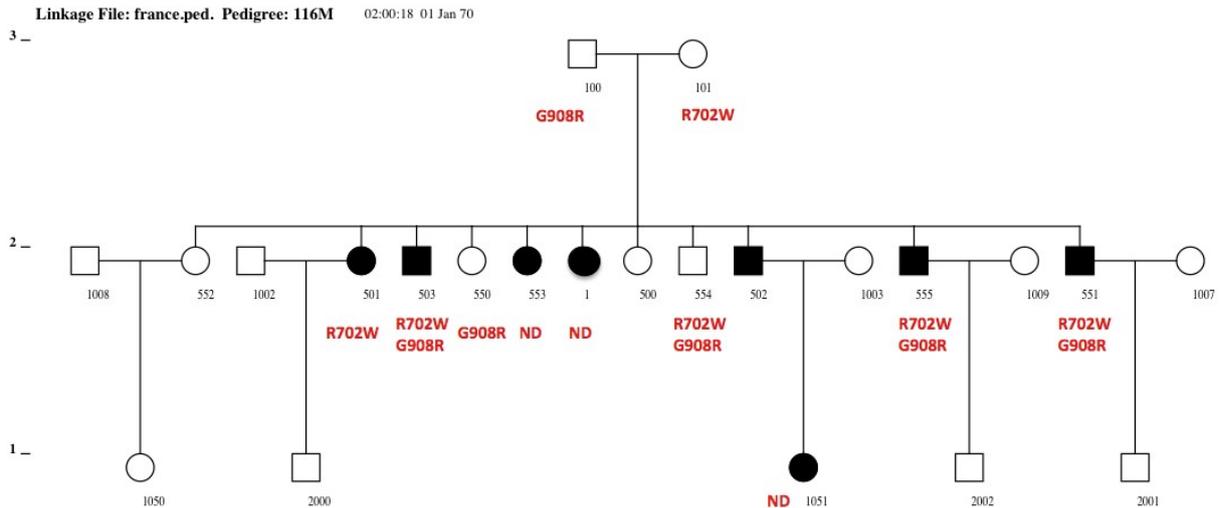
Les études de Genome Wide Association (GWAS)<sup>10</sup> ont mis en évidence de nombreux facteurs génétiques de susceptibilité à la MC comme les mutations du gène *IRGM*, codant pour une protéine impliquée dans l'élimination des bactéries intestinales et responsables d'une augmentation du nombre des bactéries intestinales qui induirait une inflammation chronique<sup>11,12</sup>. Cependant la centaine de variants génétiques de susceptibilité (en dehors des mutations du gène *NOD2*) révélée par les approches GWAS n'ont montré que des effets mineurs sur l'augmentation du risque génétique avec des OR compris entre 1,05 et 1,3 et sans aucune mesure avec le sur risque conféré par les mutations du gène *NOD2*.

## 2.2 Hypothèse

Le Registre Inserm InVS EPIMAD répertorie depuis 1988 dans le Nord, le Pas de Calais, la Somme et la Seine Maritime, tout les cas incidents de Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin : maladie de Crohn et rectocolite hémorragique. Au moment de l'enregistrement des patients dans le registre, un questionnaire permet de constituer l'arbre génétique de sa famille. Des travaux antérieurs ont permis de mettre en évidence des familles dites "exceptionnelles" (familles multiplexes) puisqu'elles présentent une forte agrégation de la maladie de Crohn avec plus de trois patients atteints dans la famille.



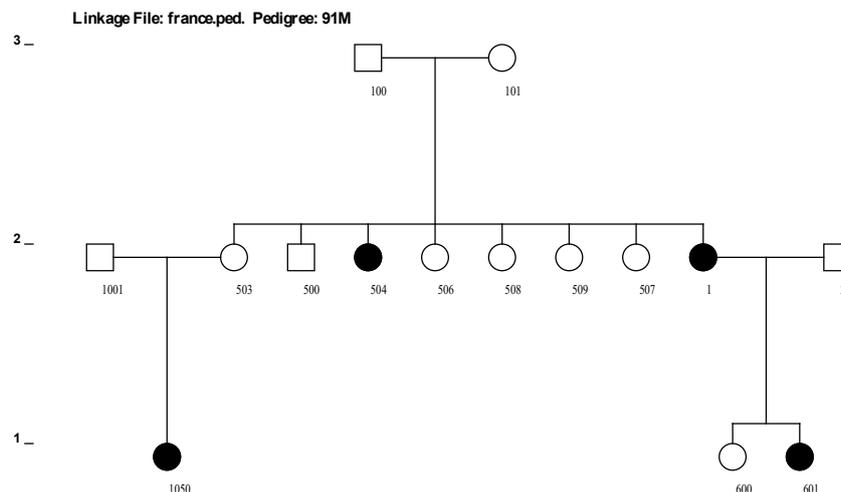
Famille multiplexe 9M, dans laquelle l'agrégation familiale s'explique par la présence dans la famille des 3 mutations majeures du gène *NOD2* : R702W, G908R et 1007fs.



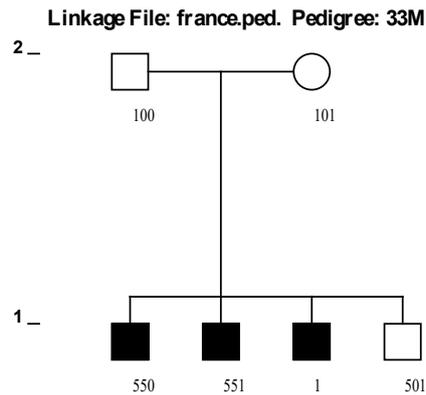
Famille multiplexe 116M, dans laquelle l'agrégation familiale s'explique par la présence dans la famille de 2 mutations majeures du gène *NOD2* : R702W et G908R.

Ces deux exemples des familles 9M et 116M montrent que la prévalence des mutations du gène *NOD2* dans ces familles explique l'agrégation familiale, compte tenu du sur-risque génétique important associé aux mutations du gène *NOD2*.

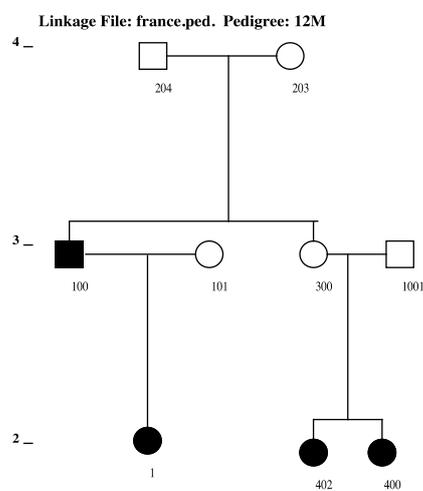
Mais parmi toutes les familles multiplexes répertoriées par le Registre InVS EPIMAD, un certain nombre présente une agrégation familiale qui ne peut pas être relié au gène *NOD2*.



Famille multiplexe 91M, dans laquelle aucun sujet ne présente de mutation du gène *NOD2*.



Famille multiplexe 33M, dans laquelle aucun sujet ne présente de mutation du gène *NOD2*.



Famille multiplexe 12M, dans laquelle aucun sujet ne présente de mutation du gène *NOD2*.

Dans ces familles, des études antérieures n'ont pas mis en évidence les mutations du gène *NOD2*. L'agrégation familiale imputée à un facteur génétique majeur de susceptibilité à la maladie de Crohn, ne peut être reliée à la présence éventuelle de mutations du gène *NOD2*. Nous formulons l'hypothèse d'un nouveau facteur génétique majeur de susceptibilité, présent dans ces familles. L'identification par whole exome sequencing (WES) d'un facteur génétique majeur, commun à plusieurs familles ou spécifique de chaque famille est l'objectif de ce protocole.

Actuellement, des recherches sont en cours et les premiers résultats montrent une influence de la géographie d'habitation sur la composition du microbiote. Cette influence ne semble pas être seulement due à l'alimentation mais impliquerait aussi les caractères génétiques.

Il semble donc aujourd'hui, indispensable de connaître l'impact des variations génétiques sur la composition du microbiote. C'est pourquoi, il nous semble important de constituer une collection biologique d'ADN, de sérum et de selles, afin de pouvoir étudier cet aspect lors d'une prochaine étude.

### 2.3 Faisabilité

Les méthodes modernes de biologie moléculaire permettent aujourd'hui de séquencer la totalité des séquences d'ADN codantes des gènes (les exons) d'un patient (WES pour *whole-exome sequencing*)<sup>13</sup>. La technique de WES permet de détecter toutes les variations génétiques et toutes les mutations dans les séquences codantes d'un patient. Le WES peut être une alternative puissante et efficace dans l'élucidation de causes génétiques de maladies telles que la MC.

Comme le WES peut potentiellement conduire à l'identification d'un grand nombre de variants génétiques dans les exons séquencés chez les patients, différentes méthodes sont utilisées pour faciliter l'identification des mutations potentiellement causales : sélection de plusieurs patients affectés par la maladie génétique ou sélection de familles présentant plusieurs sujets apparentés atteints d'une maladie donnée<sup>14,15</sup>.

A partir du Registre InVS EPIMAD, des familles multiplexes présentant des généalogies typiques d'une agrégation familiale avec intervention d'un facteur génétique majeur, autre que les mutations du gène *NOD2* ont déjà été identifiés. Il est donc logique de proposer une approche par WES dans ces familles (patients atteints de MC et apparenté sain) du Registre InVS EPIMAD.

Nous proposons de comparer les résultats de WES de 3 sujets atteints de MC avec ceux d'un apparenté non atteint. Le sujet appelé probant sera le premier sujet, atteint de MC, de la famille enregistré dans le Registre InVS EPIMAD. Ainsi toute variation génétique présente chez le ou les sujets atteints et absente chez l'apparenté sain sera potentiellement un facteur de susceptibilité majeur à la MC. Les variations génétiques répondant à ces critères seront alors génotypées chez tous les membres de la famille pour vérifier leur association avec la maladie de Crohn. Les variations génétiques ainsi mises en évidence, pourront être ultérieurement génotypées dans les cohortes de patients du Registre InVS EPIMAD et chez des sujets indemnes de maladie de Crohn, afin de rechercher en population générale leur implication dans la susceptibilité génétique à la maladie de Crohn.

### 2.4 Résultats attendus

Nous nous attendons à trouver de nouveaux facteurs génétiques à effet majeur dans la maladie de Crohn. Les gènes impliqués dans cette nouvelle susceptibilité génétique orienteront vers d'éventuels « *pathways* » dont les dysfonctionnements pourront être rattachés à la maladie de Crohn, assurant à la fois une meilleure connaissance fondamentale de la maladie et la mise en évidence d'éventuelles nouvelles cibles thérapeutiques.

### **3 Objectif de la recherche**

#### **3.1 Objectif principal**

Il s'agit de mettre en évidence des mutations génétiques à effet majeur dans la maladie de Crohn par WES chez trois individus atteints et un sujet sain, issus de familles référencées dans le Registre Inserm InVS EPIMAD.

#### **3.2 Objectifs secondaires et les hypothèses générées**

- Détermination des profils génétiques des patients atteints de maladie de Crohn et de leurs apparentés sains concernant les nombreux facteurs mineurs de susceptibilité génétique déjà répertoriés dans la maladie de Crohn. Grâce à des études antérieures nous connaissons la fréquence de ces variants mineurs chez des sujets témoins et chez des patients atteints de formes non familiales de maladie de Crohn. Les profils génétiques des patients issus des familles multiplexes permettraient de montrer une éventuelle sur-représentation de ces variants génétiques à effet mineurs dans cette population. La sur-représentation de ces variants mineurs pourrait être une explication alternative ou complémentaire à la forte agrégation familiale de maladie de Crohn dans ces familles.
- Constitution d'une collection biologique d'ADN, de sérum et de selles. En effet de nombreux travaux mettent en évidence une influence des caractères génétiques sur la composition du microbiote fécal. Cette collection biologique pourra être utilisée dans une prochaine étude.

### **4 Conception de la recherche**

#### **4.1 Plan Expérimental**

Type de recherche :

Etude génétique familiale avec contrôle intrafamilial.

Catégorie de la recherche :

Recherche d'épidémiologie génétique.

Randomisation :

Sans randomisation.

## 4.2 Définition de la population étudiée

### 4.2.1 Critères d'inclusion

#### **Critères d'inclusion communs à l'ensemble des participants d'une même famille**

- Homme ou femme
- âgé de 5 à 80 ans
- Etre capable de recevoir l'information éclairée spécifique
- Avoir donné son accord de participation et avoir signé le consentement éclairé spécifique. Si le patient est mineur, le ou les titulaires de l'autorité parentale devront avoir été informés et devront avoir signé le consentement, de même que l'enfant.
- Etre assuré social ou ayant droit d'un assuré social

#### **Critères d'inclusion spécifiques au patient Proband**

- Homme ou femme
- âgé de 5 à 80 ans
- Patient atteint de maladie de Crohn
- Appartenir à une famille présentant au moins 3 sujets atteints de maladie de Crohn
- Etre d'accord sur le principe de contacter ses apparentés au 1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup> et/ou 3<sup>ème</sup> degré
- Patient ayant signé le consentement éclairé « Patient Proband »
- Etre capable de recevoir l'information éclairée spécifique
- Avoir donné son accord de participation et avoir signé le consentement éclairé spécifique. Si le patient est mineur, le ou les titulaires de l'autorité parentale devront avoir été informés et devront avoir signé le consentement, de même que l'enfant.
- Etre assuré social ou ayant droit d'un assuré social

#### **Critères d'inclusion spécifiques aux apparentés du patient Proband et identifiés comme indemnes de maladie de Crohn**

- Homme ou femme
- Agé de 18 à 80 ans
- Etre capable de recevoir l'information éclairée spécifique
- Avoir donné son accord de participation et avoir signé le consentement éclairé spécifique.
- Etre assuré social ou ayant droit d'un assuré social

Dans le cas où nous n'arriverions pas à obtenir le consentement de 3 personnes atteintes de MC et d'une personne apparentée saine, dans la même famille, les échantillons prélevés seront uniquement utilisés pour la collection biologique.

#### 4.2.2 Critères de non-inclusion

- Impossibilité de recevoir une information éclairée.
- Refus de signer le formulaire de consentement
- Impossibilité de réunir le probant et au moins deux sujets additionnels apparentés au probant (un sujet sain et un sujet atteint de maladie de Crohn)
- Patient non affilié à un régime de sécurité sociale
- Femmes enceintes ou allaitantes
- Majeurs protégés

#### 4.3 Critères d'évaluation

##### 4.3.1 Critère principal permettant de répondre à l'objectif principal :

Sélection des mutations génétiques, au sein d'une même famille, présentes chez les sujets atteints de MC et absentes chez le sujet sain, identifiées par WES. Validation de l'association par génotypage chez tous les membres de la famille.

##### 4.3.2 Critères secondaires permettant de répondre aux objectifs secondaires:

Pour répondre à cet objectif secondaire, les variants génétiques à effet mineur déjà répertoriés dans la littérature seront référencés chez les patients atteints et leur éventuelle sur-représentation sera analysée et comparée aux données antérieures déjà obtenues chez des patients atteints de formes non familiales et chez des sujets témoins.

#### 4.4 Calcul du nombre de sujets

Dans ce type d'étude, il n'y a pas de calcul du nombre nécessaire de sujets. En effet, les familles seront analysées de manière indépendante pour l'objectif principal.

Le nombre de familles multiplexes connues dans le registre EPIMAD est de 120. Trois d'entre elles sont déjà très bien caractérisées aussi bien du point de vue phénotypique que concernant la génétique des mutations du gène *NOD2* :

- famille 91M, 6 sujets potentiels
- famille 33M, 4 sujets potentiels
- famille 12M, 7 sujets potentiels.

Ces trois familles seront ciblées en première intention.

#### 4.5 Méthode et stratégie d'analyse

Aucun test statistique ne sera appliqué : une comparaison séquences d'ADN sera réalisée entre le sujet atteint et les sujets sains d'une même famille.

Une analyse par WES sera réalisée chez quatre individus (trois atteints, un non-atteint) issus des familles. Une analyse bioinformatique complète des données de séquençage produites, au sein de chaque famille de façon indépendante sera réalisée. Cette analyse permettra de sélectionner les mutations des séquences codantes co-ségrégant avec la maladie et de vérifier l'absence de ces mutations chez l'apparenté non atteint. Selon l'expérience de l'équipe UMR 8199, cette étape nous permettra d'identifier entre 50 à 100 mutations potentiellement associées à la maladie, et qui devront être étudiées ensuite au sein de la famille étendue. Ces mutations seront génotypées chez tous les membres de la famille étendue afin de réaliser une étude de co-ségrégation intrafamiliale au sein de chaque famille.

### 5 Logistique de l'étude

#### 5.1 Equipes participantes et expérience de l'équipe dans le domaine

**Dr GOWER**, Pôle de Santé Publique, MRRRC CHRU Lille

**Dr GUILLON**, Pôle de Santé Publique, MRRRC CHRU Lille

**Dr VASSEUR**, Pole Santé Publique, MRRRC CHRU Lille

**Sara FRADE**, DRC, MRRRC CHRU Lille

**Pr FROGUEL**, UMR CNRS 8199, Institut Pasteur de Lille

#### 5.2 Lieux de réalisation de la recherche

##### Service clinique :

Hôpital Huriez, service des maladies de l'appareil digestif – CHRU de Lille

##### Plateaux techniques et/ou laboratoires de recherche :

Laboratoire CNRS UMR8199

##### Collection biologique :

Centre d'Investigation Clinique, CRB, Hôpital Cardiologique, Bd du Pr Jules Leclercq, 59037 Lille Cedex.

### 5.3 Déroulement pratique de la recherche

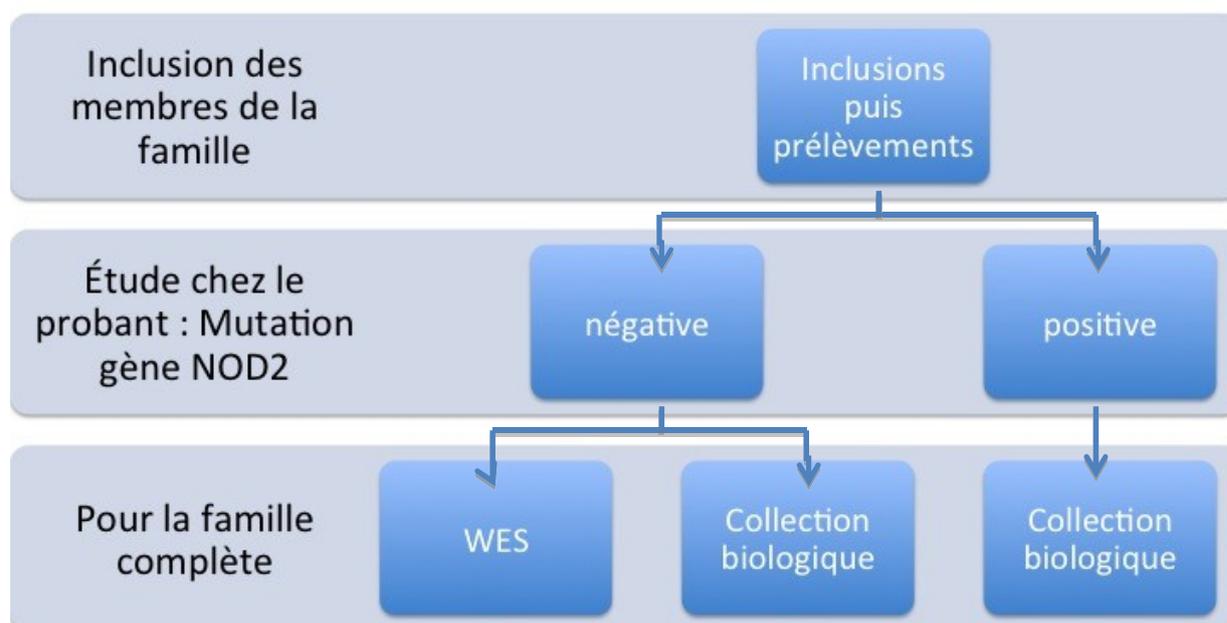


Schéma du déroulement de l'étude

#### Etape 1 : inclusion des familles

Seront ciblées les familles multiplexes, issues du Registre InVS EPIMAD, présentant des arbres typiques d'une agrégation familiale (plus de 3 patients atteints de maladie de Crohn) sans implication des mutations du gène *NOD2*, facteur génétique majeur de susceptibilité à la maladie de Crohn.

#### Visite pour le probant :

Au cours d'une consultation de suivi, l'investigateur expliquera l'étude, au probant, atteint de maladie de Crohn et faisant partie d'une des familles multiplexes sélectionnées. Est considéré comme probant le patient enregistré en premier dans le Registre InVS EPIMAD.

L'investigateur profitera de cette consultation pour mettre à jour l'arbre généalogique de la famille.

Il sera, ensuite, demandé au probant de proposer aux membres de sa famille de 1<sup>er</sup>, 2<sup>d</sup> et 3<sup>ème</sup> degré, quelque soit le statut vis à vis de la MC, de participer à l'étude. Il leur transmettra un document d'information sur le déroulement de l'étude et son objectif, un coupon réponse à l'attention du Dr Gower, ainsi que des kits de prélèvement de selles. En cas, d'accord de participation, il sera demandé à chaque participant de revenir avec ses prélèvements de selles.

Dans le cas de probant ou apparenté mineurs, l'investigateur expliquera l'étude aux parents et à l'enfant. Après avoir répondu à toutes leurs questions, si l'enfant et ses parents souhaitent qu'il participe à l'étude, ils donneront leur accord par écrit en signant les consentements éclairés adéquats (consentement pour les parents et consentement pour participant mineur). Il sera proposé une signature du consentement à l'enfant mineur, en fonction de son niveau de compréhension.

### **Visite pour les apparentés au 1<sup>er</sup>, 2<sup>d</sup> et 3<sup>ème</sup> degré :**

Un rendez-vous avec l'un des investigateurs sera pris avec les membres de la famille ayant transmis leur souhait de participer à l'étude (via retour du coupon réponse), afin que l'investigateur puisse leur expliquer l'étude et répondre à toutes les questions qu'ils peuvent se poser.

Les différents sujets donneront leur accord de participation écrit en signant un consentement éclairé.

Pour s'assurer que les sujets sains ne sont pas suspects d'avoir une pathologie inflammatoire digestive sous-jacente, seront effectués :

- un questionnaire clinique
- un dosage de la calprotectine.

En effet, la calprotectine fécale est un marqueur de l'inflammation digestive<sup>19</sup>. Sa quantification dans les selles par ELISA est proposée pour déterminer l'origine inflammatoire des diarrhées. Elle permet de différencier les maladies inflammatoires du tube digestif des pathologies fonctionnelles. Seuls les apparentés sains ayant un taux normal de calprotectine fécale et aucun argument clinique évocateur de pathologie inflammatoire digestive seront inclus.

### **Etape 2 : prélèvements**

Après signature du consentement éclairé, différents prélèvements seront effectués :

- Un prélèvement sanguin, sur EDTA, sera effectué pour l'analyse génétique, la constitution de la collection biologique d'ADN et de sérum. Pour les adultes, le volume de sang prélevé sera de 30 ml. Pour les enfants, le volume maximal de sang prélevé en une seule fois sera fonction du poids et n'excèdera pas 1% de leur volume de sang total conformément aux recommandations du guideline : « ethical considerations for clinical trials on medicinal products conducted with the paediatric population » publié par la Commission Européenne en Janvier 2008

([http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol10/ethical\\_considerations.pdf](http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol10/ethical_considerations.pdf))

- Récupération du prélèvement de selles, pour la constitution de la collection biologique de selles et pour le dosage de calprotectine pour les sujets sains.

### Etape 3 : Analyses génétiques

Les échantillons pour l'extraction d'ADN seront transmis par le CRB à l'unité UMR CNRS 8199.

Avant de mettre en oeuvre les analyses lourdes et coûteuses de whole exome sequencing, tous les probands seront explorés à la recherche de mutations du gène *NOD2*, afin de s'assurer que ces mutations ne sont pas impliquées dans l'agrégation familiale.

Il est prévu de séquencer le gène *NOD2*, plus précisément, les 12 exons, les jonctions intron/exon et un fragment de 300bp de l'intron 8 (pour permettre la mise en évidence d'une mutation sur un site de branchement d'épissage (IVS8 + 158 C>T) récemment rapportée associée à la maladie de Crohn<sup>18</sup>

Si une mutation du gène *NOD2* est détectée, on ne pourra pas exclure que l'agrégation familiale observée pour la MC soit en relation avec la mutation du gène *NOD2*. Cette famille ne sera pas étudiée par WES. Ce type de famille effectuera uniquement la partie collection biologique (ADN, sérum, selles) de l'étude.

Si cette vérification s'avère négative et que l'on peut donc supposer la présence d'un facteur génétique majeur autre que les mutations du gène *NOD2*, le WES sera réalisée chez trois patients atteints de la famille et un apparenté sain.

L'apparenté sain choisi (en cas d'accord de plusieurs membres sains) sera celui de degré d'apparenté le plus proche par rapport au probant. En cas de même degré, on privilégiera le plus âgé, qui a la probabilité la plus faible de développer plus tard une MC.

### La méthode WES :

Les librairies exomiques individuelles seront préparées à partir de 3µg d'ADN génomique, selon la technologie Agilent (SureSelect Human All Exon kit). Sera utilisée, la version la plus récente du kit de capture d'exons proposée par Agilent. Actuellement, ce kit permet de capturer 50Mbp de séquences génomiques uniques. Le système Illumina HiSeq sera utilisé afin de générer les séquences.

Les séquences obtenues seront comparées et tout variant, présent chez les sujet atteints et absent chez l'apparenté sain, sera retenu.

La détection de toutes les variations de séquences nucléotidiques sera réalisée par le logiciel CASAVA (Illumina), avec une profondeur de lecture  $\geq 8\times$  à chaque position de variation nucléotidique par rapport au génome humain de référence.

Les nouvelles mutations potentiellement impliquées dans la susceptibilité génétique à la maladie de Crohn seront génotypées chez tous les membres de la famille afin de s'assurer de leur association avec la maladie.

#### 5.4 Durée

- durée de la période d'inclusion : 1 an
- durée de la participation à l'étude pour un sujet : le temps d'une consultation ( $\pm 3$  heures)
- durée de la recherche : 3 ans
- durée d'analyse des données : 2 ans

Le promoteur se réserve le droit d'interrompre l'essai en raison d'un défaut d'inclusion. L'étude pourra être arrêtée par décision conjointe de l'autorité compétente, du promoteur ou de l'investigateur coordonnateur.

#### 5.5 Critères d'arrêt de participation à l'étude

Les apparentés sains présentant des signes de MC lors du questionnaire ou de l'analyse de la calprotectine fécale ne pourront être inclus dans cette étude. Un suivi particulier par l'investigateur sera mis en place afin de prendre en charge ces personnes.

De la même façon, si une anomalie génétique potentiellement délétère est mise en évidence chez un apparenté sain, l'investigateur proposera un suivi adapté afin de prendre en charge cette personne.

Chaque sujet pourra sortir de l'étude par décision de l'autorité administrative compétente, du promoteur et de l'investigateur, ou par décision de l'intéressé lui-même conformément à la réglementation et comme il est mentionné dans le formulaire de recueil du consentement.

#### 5.6 Interdiction de participation simultanée – Période d'exclusion

Il n'y a pas d'interdiction de participation simultanée ni de période d'exclusion à l'issue de la recherche.

## 5.7 Bénéfices, risques et contraintes de l'étude

Le bénéfice attendu de l'étude est de permettre l'identification du ou des variant(s) génétique(s) majeur(s) impliqué dans la MC, spécifique des familles étudiées, ainsi qu'une meilleure connaissance fondamentale des gènes et des « *pathways* » impliqués dans la survenue de la maladie de Crohn.

Les risques attendus, dans cette étude, sont limités aux risques habituels liés à un prélèvement sanguin (douleur, hématome, malaise léger, infection au point de ponction).

## 5.8 Comité Scientifique

La constitution d'un comité de surveillance n'a pas été jugée nécessaire dans le cadre de ce protocole pour les raisons suivantes : absence d'intervention thérapeutique médicamenteuse et risques négligeables de complications liées à l'étude.

## **6 Traitements**

Aucun traitement médicamenteux des patients n'est prévu dans cette étude. Des traitements concomitants avant et/ou pendant le protocole sont autorisés mais pas nécessaires, et doivent être mentionnés dans la liste des traitements pris par le patient qui se trouve dans le cahier d'observation.

## **7 Biologie et/ou collection biologique**

### 7.1 Conditions de prélèvement et de traitement des liquides biologiques

#### 7.1.1 Prélèvements sanguins

Spécifiquement pour cette étude, un volume de sang de 30 ml sera prélevé chez les adultes. Chez les enfants, ce volume de sang prélevé sera fonction du poids et ne dépassera pas 1% de leur volume de sang total. Ces volumes de sang seront répartis de la manière suivante :

2 tubes EDTA de sang seront prélevés pour la préparation d'ADN. La préparation de l'ADN sera effectuée par l'unité UMR CNRS 8199.

2 tubes secs et 2 tubes EDTA de sang seront prélevés pour la constitution de la collection biologique d'ADN et de sérum.

Les 6 tubes de sang seront directement transmis au CRB. Ensuite celui-ci utilisera les 4 tubes prévus pour la constitution de la collection biologique de sérum et d'ADN. Tous les échantillons seront conservés à -80°C.

Le 2 autres tubes seront transmis à l'unité UMR CNRS 8199 pour l'extraction d'ADN, séquençage du gène *NOD2* et WES.

#### 7.1.2 Prélèvements de selles

4 pots de 1g de selles seront prélevés pour la constitution de la collection biologique et le dosage de calprotectine.

Ces prélèvements seront transmis au CRB.

3 pots seront utilisés pour constitution d'une collection biologique de selles et seront conservés à -80°C.

1 pot sera transmis par le CRB au CBP (laboratoire de parasitologie) pour effectuer le dosage de calprotectine.

A la fin de l'étude les collections biologiques seront conservées en vue de futures études génétiques sur la maladie de Crohn.

#### 7.2 Mode d'étiquetage, de transport et de stockage des prélèvements

Selon l'article L 1121-3 du Code de la Santé Publique, les prélèvements seront transmis, anonymisés par le personnel du CIC/CRB, grâce à des étiquettes générées par le CIC-CRB à l'inclusion du patient, mentionnant le numéro d'inclusion, les initiales du patient et la date de l'opération. Après transmission des prélèvements aux différents services chargés de leur analyse, les échantillons seront conservés au CRB du CHRU de Lille dans des boîtes prévues spécifiquement pour l'étude.

#### 7.3 Méthode utilisée pour assurer la traçabilité et la conservation des prélèvements

Le CIC/CRB assurera la gestion des échantillons biologiques en vue de leur analyse ultérieure, leur stockage et la gestion de ceux-ci dans ses aspects de référencements, de stockage, de traçabilité des entrées, sorties ou incidents.

Le stockage et la centralisation des produits biologiques sont coordonnés par le CIC/CRB grâce à un logiciel de gestion de prélèvements biologiques qui permet une traçabilité rigoureuse de chaque échantillon. Ce système utilise des étiquettes spécifiques à code barre. Ce logiciel appelé Databiotec® est localisé et géré par le CIC de Lille. Son accès est contrôlé par mot de passe. Chaque connexion est enregistrée, et l'accès à la base de données est limité selon un profil personnel d'utilisateur. Tous les mouvements et événements liés à

l'existence d'un échantillon (entrées, sorties, réintégration, incidents de la chaîne de froid) sont enregistrés et interrogeables dans le logiciel.

Ce logiciel de gestion et de traçabilité des échantillons permet de gérer :

- le numéro de code des sujets,
- l'étiquetage des échantillons,
- le contenu des tubes,
- l'appartenance des tubes à un protocole de recherche
- les dates d'entrée et de sortie de la banque,
- le type de pathologie,
- éventuellement les problèmes rencontrés.

Chaque échantillon sera identifié de manière unique : le prélèvement appartient à une étude et à un sujet. L'échantillon est identifié à l'aide d'un code barre. Un lecteur de code barre permet d'accéder automatiquement à toutes les informations de l'échantillon. La méthode et les conditions de prélèvement, les intervenants, les informations cliniques, les examens complémentaires, la contamination, la qualité, la dangerosité, l'emplacement de l'échantillon sont enregistrés.

DataBiotec® permet une description précise de tout type de matériel de conservation (conteneurs) en précisant :

- les éléments de stockage : étages, tiroirs, racks, boites, puits
- la gestion des emplacements : occupé, réservé, disponible

Il intègre la création de sélection d'échantillons paramétrables qui permettent d'obtenir des regroupements logiques :

- liste des prélèvements et échantillons d'une même journée
- d'une même étude
- de même nature
- pour un même technicien
- dans un même congélateur

La température de stockage des échantillons est contrôlée par des enregistrements continus et les différents conteneurs sont sous alarme centralisée. Un congélateur de secours est disponible afin de pallier rapidement à toute panne.

Les locaux de stockage sont sécurisés (code d'accès électronique, alarme d'intrusion, surveillance vidéo des locaux).

## 7.4 Classification « type assurance » au niveau des risques

Le risque du protocole est de classe I.

Par rapport à la prise en charge habituelle des patients : prise de sang supplémentaire.

Le CHRU de Lille en tant que promoteur aura souscrit un contrat d'assurance spécifique en matière de Recherche Biomédicale conformément à l'article L1121-10 du Code de la Santé Publique.

## 8 Événements indésirables

### 8.1 Définitions

\* **Événement indésirable** : toute manifestation nocive survenant chez une personne qui se prête à une recherche biomédicale que cette manifestation soit liée ou non à la recherche ou au produit sur lequel porte cette recherche.

\* **Effet indésirable** : tout événement indésirable dû à la recherche.

\* **Événement ou effet indésirable grave** : tout événement ou effet indésirable qui :

- entraîne la mort,
- met en jeu le pronostic vital de la personne qui se prête à la recherche,
- nécessite une hospitalisation ou la prolongation d'une l'hospitalisation,
- provoque une incapacité ou un handicap important ou durable,
- ou bien se traduit par une anomalie ou une malformation congénitale, et s'agissant du médicament, quelle que soit la dose administrée.
- est jugé comme grave sur le plan médical par l'investigateur.

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

### 8.2 Événements indésirables et risques liés au protocole

Les événements indésirables attendus sont les complications liées à une ponction veineuse :

- Douleur
- Hématome
- Infection du point de ponction (événements exceptionnels)

### 8.3 Procédures mises en place en vue de l'enregistrement et de la notification des événements indésirables

#### **Responsabilités de l'investigateur :**

L'investigateur doit notifier au promoteur, sans délai à compter du jour où il en a connaissance, tous les événements indésirables graves survenant pendant la période de l'essai.

Tous les événements indésirables graves devront faire l'objet d'un rapport sur un formulaire " Événement Indésirable Grave " figurant dans le cahier d'observation. Ce formulaire devra être transmis au promoteur (Cellule Vigilance de la Fédération de Recherche Clinique) par fax au 03 20 44 57 11.

Pour chaque événement indésirable, l'investigateur évalue la gravité et le lien de causalité entre l'événement indésirable et :

- l'(es)acte(s) pratiqué(s),
- ou le protocole.

Le suivi des événements indésirables sera assuré par l'investigateur.

#### **Responsabilités du promoteur :**

##### Déclaration des événements et effets indésirables graves

Pour chaque événement ou effet indésirable grave, le promoteur évalue la gravité et lien de causalité entre l'événement ou l'effet indésirable et :

- l'(es)acte(s) pratiqué(s),
- ou le protocole,

ainsi que le caractère inattendu.

Le promoteur a la responsabilité de déclarer à l'ANSM et au CPP les événements indésirables graves et inattendus imputables aux procédures utilisés dans un délai de 7 jours.

##### Déclaration aux investigateurs

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

##### Rapport annuel de sécurité

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

## **9 Droit d'accès aux données et documents sources**

L'investigateur s'engage à accepter les contrôles du promoteur (moniteur et/ou auditeur), ou de l'inspecteur de l'autorité administrative compétente. Il garantit l'accès aux données sources (dossiers médicaux, fichiers informatiques, documents de l'étude...).

## **10 Contrôle et assurance de la qualité**

La démarche Assurance Qualité qui sera mise en œuvre permet de prendre en charge les sujets se prêtant aux recherches dans les meilleures conditions de sécurité et de respect des règles médico-réglementaires.

### **10.1 Déroulement de l'essai**

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

### **10.2 Monitoring de l'étude**

Le monitoring de l'essai sera effectué selon le planning de monitoring validé avant le début de la recherche ou sur déclenchement spécifique par un ARC du promoteur. Il sera fonction des inclusions réalisées dans l'étude.

Une réunion de mise en place avec l'investigateur principal aura lieu avant le début de l'essai (rappel des BPC, organisation de la recherche, monitoring prévu).

L'investigateur informe le promoteur en temps réel des inclusions réalisées.

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

- les cahiers de recueil de données des patients inclus
- les dossiers médicaux et infirmiers des patients ou dossiers sources
- le classeur investigateur
- la gestion et le monitoring de la traçabilité des échantillons au CRB

Le monitoring vérifiera au minimum les points suivants :

- l'existence des patients, l'information et la présence des consentements éclairés signés
- le respect des critères d'inclusion
- le critère principal de jugement
- la surveillance et la déclaration des EIG
- la survenue de faits nouveaux nécessitant le dépôt d'un amendement

### 10.3 Clôture de l'étude

A la fin de l'essai, des procédures de clôture seront appliquées, avec classement de tous les documents et des données sources. Une fois l'analyse finale effectuée et validée, l'ensemble du dossier et des données sont scellés et archivés selon des procédures spécifiques dans des locaux sécurisés.

## **11 Considérations éthiques et légales**

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

L'investigateur est responsable du déroulement de l'essai.

L'investigateur s'engage :

- à garder des données sources ainsi que les documents administratifs relatifs au protocole,
- à ne pas inclure de volontaire avant la réception des autorisations officielles du CPP et de l'autorité compétente
- à respecter le protocole
- à conduire l'étude suivant les principes moraux, réglementaires, éthiques et scientifiques qui régissent la recherche clinique,
- à recueillir le consentement éclairé et écrit de chaque volontaire,
- à rapporter tout événement indésirable grave.

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

Un consentement éclairé (en annexe du protocole) signé sera recueilli pour chaque sujet avant leur entrée dans l'étude. Aucun acte spécifique au protocole ne devra commencer sans l'accord signé du patient.

La lettre d'information et le formulaire de consentement seront établis en 3 exemplaires dont un exemplaire sera remis au sujet ; un exemplaire sera conservé par l'investigateur qui transmettra le dernier exemplaire au promoteur, dans une enveloppe sous pli scellée. (Cette enveloppe sera conçue de telle sorte qu'elle ne puisse être refermée et scellée à nouveau après ouverture.)

Le consentement sera signé par l'investigateur ou le médecin qui le représente, le sujet et/ou le cas échéant :

- Le patient, assisté par son curateur (en cas de majeur sous curatelle)
- Le représentant légal du patient (en cas de majeur ou mineur sous tutelle)
- Dans l'ordre : la personne de confiance définie par la loi du 4 Mars 2002, à défaut, un membre de la famille ou une personne entretenant avec le patient des liens étroits et stables (en cas de personne hors d'état de consentir et n'étant pas protégée par une mesure de curatelle ou tutelle).
- En cas d'urgence ne permettant pas de recueillir le consentement du patient (ex : compte tenu l'état clinique du patient), la personne de confiance ou un membre de la famille. Dès que possible, le consentement du patient devra être recueilli pour poursuivre la recherche.
- Le témoin, totalement indépendant de l'investigateur et du promoteur (en cas d'impossibilité de recueillir le consentement éclairé écrit, le recueil du consentement de la personne étant verbal)

#### Inscription au fichier national des personnes qui se prêtent à une recherche biomédicale :

Aucune inscription au fichier national des personnes qui se prêtent à une recherche biomédicale n'est prévue dans cette étude.

#### Autorisation de l'autorité compétente et avis du CPP

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

### Modifications au protocole

Le promoteur est seul autorisé à modifier le protocole, en concertation avec l'investigateur principal.

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

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

Une modification non substantielle du protocole est une modification mineure ou une clarification sans retentissement sur la conduite de l'essai. Ces modifications ne seront pas soumises aux autorités compétentes mais feront l'objet d'un accord entre le promoteur et l'investigateur et seront clairement documentées (dans le dossier de suivi de l'étude).

## **12 Traitement des données et conservation des documents et des données relatives à la recherche**

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

Les données concernant cette étude seront archivées pendant une durée minimum de quinze ans à compter de la fin de la recherche ou de son arrêt anticipé sans préjudice des dispositions législatives et réglementaires en vigueur.

## **13 Financement et assurance**

### 13.1 Financement

#### 13.1.1 Analyse détaillée des coûts

Les coûts induits par cette étude sont :

- extraction d'ADN : 24 €/échantillon,
- Séquençage gène NOD2 : 150€/échantillon

- capture exome : 563,5 €/échantillon
- Séquençage d'Exome : 1325 €/échantillon,
- Bioinformatique : 120 €
- Kit de prélèvement de selles : 20 €/kit
- Dosage de la calprotectine : 43,20 €/échantillon

### 13.1.2 Source de financement

L'étude est financée par l'Association de l'Etude des Anomalies Congénitales (AEAC) à hauteur de 20 k€, englobant le temps ARC et le matériel CIC pour les prélèvements, ainsi que l'analyse par WES de 10 patients.

Une source supplémentaire va être prévue.

### 13.2 Assurance

Le promoteur souscrit un contrat d'assurance garantissant sa responsabilité civile et celle de tout intervenant à l'étude, conformément à l'article L1121-10 du Code de la Santé Publique.

## **14 Publication- Valorisation**

Conformément à l'article R 5121-13 du Code de la Santé Publique, les essais ne peuvent faire l'objet d'aucun commentaire écrit ou oral sans l'accord conjoint de l'investigateur et du promoteur. Toute publication doit mentionner que le CHRU de Lille est promoteur (No d'identification " 2013-53 "). En tout état de cause, le CHRU de Lille, promoteur de l'étude, a la maîtrise de la première publication. L'investigateur adresse une copie de ses publications au promoteur.

Le promoteur est le propriétaire exclusif des résultats de l'étude. Ces résultats, ainsi que toutes les données relatives à la recherche, ne doivent en aucun cas être transmises à un tiers, sans contrepartie négociée préalablement par la Délégation à la Recherche. Toute sollicitation de ce type doit être transmise le plus tôt possible aux affaires juridiques de la Délégation à la Recherche.

## **15 Liste des annexes**

Annexe 1: Note d'information et consentement

Annexe 2 : Questionnaire

Annexe 3 : Références

## Annexe 1: Note d'information et consentement

Note d'information pour les Probandes majeurs, participant à la recherche biomédicale intitulée :

**« Recherche de nouvelles mutations génétiques à effet majeur dans la maladie de Crohn »  
MC-WES**

Promoteur : CHRU de Lille  
Investigateur Principal : Dr GOWER, Hôpital Huriez, CHRU de Lille

Madame, Monsieur,

**Le présent document décrit l'étude à laquelle il vous est proposé de participer. Il résume les informations actuellement disponibles en répondant aux différentes questions que vous pouvez vous poser dans le cadre de votre participation à cette recherche.**

### **1) Pourquoi me propose-t-on de participer à cette étude ?**

Nous vous proposons de participer à une étude sur la génétique de la maladie de Crohn. La maladie de Crohn (MC) est une Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin (MICI) qui touche environ 100 000 personnes en France et plus d'un million en Europe. Bien que nos connaissances aient récemment progressé, l'origine de cette maladie reste inconnue. L'hypothèse la plus communément admise est que la maladie de Crohn est liée, dans 80% des cas à des facteurs environnementaux et dans 20% des cas à des facteurs génétiques.

Dans cette étude, nous nous intéressons plus particulièrement aux facteurs génétiques de prédisposition à la maladie. A ce jour, nous ne connaissons qu'un facteur génétique majeur impliqué dans la maladie de Crohn : le gène *NOD2*.

Cette étude est proposée à des familles dont certains membres sont atteints de la maladie de Crohn, mais pour lesquelles la maladie n'est pas reliée au gène *NOD2*.

Dans cette étude nous souhaitons inclure des familles de ce type, comprenant au moins trois sujets atteints de maladie de Crohn.

Votre famille fait partie des familles sélectionnées à partir du Registre Inserm InVS EPIMAD, dans lequel vous êtes enregistré. C'est pourquoi nous sollicitons votre accord pour participer à cette étude.

### **2) Quel est l'objectif de la recherche ?**

L'objectif principal de cette étude est d'identifier de nouveaux facteurs génétiques impliqués dans la maladie de Crohn et de mieux comprendre les mécanismes de cette maladie.

### **3) Comment va se dérouler la recherche ?**

Au cours d'une consultation de suivi de votre maladie, le protocole de l'étude vous sera présenté et expliqué par un médecin investigateur.

Si vous souhaitez participer à cette étude, vous proposerez à l'ensemble de votre famille (apparentés du 1<sup>er</sup>, 2<sup>d</sup> et 3<sup>ème</sup> degré), atteints ou non atteints de maladie de Crohn, de participer à l'étude, et leur transmettez un document d'information expliquant le déroulement de l'étude et son objectif, un coupon réponse à l'attention du Dr Gower, ainsi que des kits de prélèvement de selles. En cas, d'accord de participation, il sera demandé à chaque participant de revenir avec ses prélèvements de selles.

Un rendez-vous sera planifié pour les membres de votre famille qui souhaitent participer à l'étude (information donnée via le coupon réponse), afin qu'un investigateur puisse leur expliquer l'étude et répondre à leurs questions.

Après avoir donné votre accord de participation par écrit, en signant le consentement éclairé ci-joint, un prélèvement de 30ml de sang sera effectué pour les analyses génétiques, et le prélèvement de selles récupéré.

Des collections biologiques seront constituées : d'ADN, de sérum et de selles, pour une utilisation ultérieure.

Suite à ces prélèvements, votre participation à l'étude sera terminée.

Dans le cas où nous n'arriverions pas à obtenir le consentement de 3 personnes atteintes de MC et d'une personne apparentée saine, de votre famille, ou si la vérification du gène *NOD2* est positive, les échantillons prélevés seront uniquement utilisés pour une collection biologique.

#### **4) Que se passera-t-il à la fin de ma participation à cette recherche ?**

Les collections d'échantillons biologiques constituées à partir de vos prélèvements seront conservées au CRB du CHRU de Lille sous la responsabilité du Dr Gower. Cette collection pourra être réutilisée pour d'autres études dans le domaine de la maladie de Crohn, sauf si vous exprimez votre opposition à l'utilisation ultérieure de vos prélèvements. A tout moment, vous pouvez vous opposer à la réutilisation de vos échantillons à des fins scientifiques ultérieures en adressant une copie de ce document, après avoir coché la case ci-dessous, Dr Gower à l'adresse suivante : Hôpital Huriez, CHRU, 59037 Lille Cedex, Tel : 03 20 44 45 13

#### **5) Quels sont les bénéfices attendus ?**

Le bénéfice attendu de l'étude est de permettre l'identification de nouveaux facteurs génétiques impliqués dans la maladie de Crohn, et qui seraient présents dans votre famille. Les résultats permettront d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la maladie de Crohn ainsi qu'une meilleure compréhension des mécanismes qui pourraient provoquer la maladie.

#### **6) La recherche comporte-t-elle des risques, des effets indésirables et/ou des contraintes particulières ?**

Les risques liés à cette étude sont ceux liés à la prise de sang de **30 40** ml, à savoir un hématome léger ou une douleur au point de ponction, très exceptionnellement une infection au point de ponction.

#### **7) Quelles sont les conditions de participation à la recherche ?**

Afin de pouvoir participer à cette étude, vous devez être affilié(e) à un régime obligatoire d'Assurance Maladie ou ayant droit d'un assuré social.

Votre participation à cette étude nécessite que nous informions votre médecin traitant sauf si vous refusez.

#### **8) Quels sont mes droits en tant que participant à la recherche ?**

Vous êtes libre d'accepter ou de refuser de participer à cette recherche sans avoir à vous justifier et sans que cela ne modifie la relation de soin existant avec l'équipe médicale vous prenant en charge.

Vous n'êtes pas obligé de donner votre décision tout de suite : vous disposez du temps que vous estimez nécessaire pour prendre votre décision.

Votre participation à cette étude nécessite que nous informions votre médecin traitant, sauf si vous le refusez.

En cas d'acceptation, vous pourrez à tout moment revenir sur votre décision, sans nous en préciser la raison, et sans que cela n'altère la qualité des soins qui vous sont dispensés.

Par ailleurs, vous pourrez obtenir au cours ou à l'issue de la recherche, communication de vos données de santé détenues par votre médecin.

Dans le cadre de la recherche, un traitement de vos données personnelles sera mis en œuvre pour permettre d'analyser les résultats de l'étude au regard de l'objectif de cette dernière qui vous a été présenté. A cette fin, les données médicales vous concernant ou tout autre type de données existantes seront transmises au Promoteur de la recherche. Ces données seront identifiées par un numéro de code et vos initiales. Ces données pourront également, dans des conditions assurant leur confidentialité, être transmises aux autorités de santé françaises. Conformément aux dispositions de la loi relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, vous disposez d'un droit d'accès et de rectification. Vous disposez également d'un droit d'opposition à la transmission des données couvertes

par le secret professionnel susceptibles d'être utilisées dans le cadre de cette recherche et d'être traitées. Ces droits s'exercent auprès du médecin qui vous a proposé de participer à cette étude.

Si vous le souhaitez, les résultats globaux de l'étude pourront vous être communiqués par courrier sur demande auprès du Dr GOWER lorsqu'elle sera achevée.

Vous n'aurez à supporter aucune charge financière supplémentaire du fait de votre participation à cette étude.

**9) Le CHRU de Lille est-il autorisé à réaliser ce type de recherche?**

Oui, en application de la loi, cette étude a été autorisée par l'ANSM<sup>1</sup>, le ..... ; elle a également reçu, le ....., un avis favorable du Comité de Protection des Personnes Nord Ouest IV., organisme officiel et indépendant qui a vocation à protéger la sécurité des personnes qui se prêtent à la recherche. En outre, le CHRU de Lille, en sa qualité de promoteur, a souscrit une assurance pour la réalisation de cette étude auprès de la SHAM, contrat n°.....

**10) A qui dois-je m'adresser en cas de questions ou de problèmes ?**

Vous pouvez poser toutes les questions que vous souhaitez, avant, pendant et après l'étude en vous adressant au médecin investigateur de l'étude que vous rencontrerez :

Dr Corinne GOWER  
tél 03 20 44 45 13  
Hôpital Huriez,  
CHRU, 59037 Lille Cedex.

Nous sommes à votre disposition pour répondre à toute question

Si vous êtes d'accord pour participer à cette étude, nous vous remercions de bien vouloir donner votre consentement écrit en signant le formulaire ci-après.

Paraphe du participant :

Paraphe du médecin investigateur:

*Nous vous remercions de parapher chaque page de ce document (réalisé en trois exemplaires), afin d'attester que vous l'avez lu et compris. Si vous êtes d'accord pour participer à cette étude, nous vous remercions également de bien vouloir donner votre consentement écrit en signant le formulaire ci-après.*

---

<sup>1</sup> ANSM: Agence Nationale de sécurité des Médicaments. Autorité de santé ayant notamment pour mission d'autoriser, de suivre et de contrôler le déroulement de la recherche.

Formulaire de consentement de participation du Proband majeur à une recherche biomédicale

**« Recherche de nouvelles mutations génétiques à effet majeur dans la maladie de Crohn »  
MC-WES**

Promoteur : CHRU de Lille  
Investigateur Principal : Dr GOWER, Hôpital Huriez, CHRU de Lille

Je soussigné(e) Mme, Mlle, M. (rayer les mentions inutiles)

Nom : .....Prénom : .....  
Adresse : .....

accepte librement et volontairement de participer à la recherche biomédicale intitulée  
« Recherche de nouvelles mutations génétiques à effet majeur dans la maladie de Crohn. MC-WES»  
dont le CHRU de Lille est promoteur et qui m'a été proposée par le Docteur/Professeur (nom,  
coordonnées).....

Etant entendu que :

- Le médecin qui m'a informé et a répondu à toutes mes questions, m'a précisé que ma participation à cette étude est libre et que je peux arrêter d'y participer à tout moment en informant préalablement mon médecin. J'ai disposé d'un délai de réflexion suffisant avant de prendre ma décision.
- J'ai été clairement informé (e) des éléments suivants : But de la Recherche- Méthodologie- Durée de ma participation- Bénéfices attendus- Contraintes- Risques prévisibles.
- J'ai bien compris que pour pouvoir participer à cette recherche, je dois être affilié(e) à un régime de sécurité sociale ou être ayant-droit d'un assuré social. Je confirme que c'est bien le cas,
- Si je le souhaite, je serai informé(e) par le médecin des résultats globaux de cette recherche selon les modalités figurant dans la note d'information qui m'a été remise.
- Mon consentement ne décharge en rien le médecin et le promoteur de l'ensemble de leurs responsabilités et je conserve tous mes droits garantis par la loi.
- Dans le cadre de cette étude, un examen de mes caractéristiques génétiques va être effectué. Cet examen vise à mettre en évidence des mutations géniques associées à la maladie de Crohn.

J'accepte qu'il soit procédé à l'examen de mes caractéristiques génétiques dans le cadre de cette étude, conformément à ce qui m'a été expliqué.

Je refuse que cet examen de mes caractéristiques génétiques soit effectué.

en cochant cette case, j'exprime mon refus concernant la réutilisation à des fins scientifiques secondaires de mes prélèvements biologiques.

- J'accepte que les données enregistrées à l'occasion de cette recherche comportant des données génétiques puissent faire l'objet d'un traitement informatisé par le promoteur ou pour son compte. J'ai bien noté que le droit d'accès prévu par la CNIL (loi du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés (art. 39)) s'exerce à tout moment auprès du médecin qui me suit dans le cadre de la recherche et qui connaît mon identité. Je pourrai exercer mon droit de rectification et d'opposition auprès de ce même médecin, qui contactera le promoteur de la recherche.

Fait à ....., le.....

Fait à ....., le.....

Signature du participant :

Signature du médecin investigateur :

*Le présent formulaire est réalisé en trois exemplaires, dont un est remis à l'intéressé. Un exemplaire sera conservé par l'investigateur ; le dernier sera conservé par le promoteur en toute confidentialité, conformément à la loi.*

Note d'information pour les apparentés au probant, participant à la recherche biomédicale intitulée :

**« Recherche de nouvelles mutations génétiques à effet majeur dans la maladie de Crohn »  
MC-WES**

Promoteur : CHRU de Lille  
Investigateur Principal : Dr GOWER, Hôpital Huriez, CHRU de Lille

Madame, Monsieur,

**Le présent document décrit l'étude à laquelle il vous est proposé de participer. Il résume les informations actuellement disponibles en répondant aux différentes questions que vous pouvez vous poser dans le cadre de votre participation à cette recherche.**

### **1) Pourquoi me propose-t on de participer à cette étude?**

Nous vous proposons de participer à une étude sur la génétique de la maladie de Crohn. La maladie de Crohn (MC) est une Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin (MICI) qui touche environ 100 000 personnes en France et plus d'un million en Europe. Bien que nos connaissances aient récemment progressé, l'origine de cette maladie reste inconnue. L'hypothèse la plus communément admise est que la maladie de Crohn est liée, dans 80% des cas à des facteurs environnementaux et dans 20% des cas à des facteurs génétiques de susceptibilité. Dans ce dernier cas, la maladie présente une susceptibilité familiale.

Dans cette étude, nous nous intéressons plus particulièrement aux facteurs génétiques de prédisposition à la maladie. A ce jour, nous ne connaissons qu'un facteur génétique majeur impliqué dans la maladie de Crohn : le gène *NOD2*.

Cette étude est proposée à des familles dont certains membres sont atteints de la maladie de Crohn, mais pour lesquelles le facteur génétique *NOD2* n'est pas impliqué.

Dans cette étude nous souhaitons inclure les membres issus de ce type de famille, comprenant au moins trois sujets atteint de maladie de Crohn et un apparenté non atteint.

Votre famille fait partie des familles sélectionnées à partir du Registre EPIMAD, dans lequel votre parent est enregistré(e) car il/elle est atteint de la maladie de Crohn. C'est pourquoi nous sollicitons votre accord pour participer à cette étude.

### **2) Quel est l'objectif de la recherche ?**

L'objectif principal de cette étude est d'identifier de nouveaux facteurs impliqués dans la maladie de Crohn et de mieux comprendre les mécanismes de cette maladie.

### **3) Comment va se dérouler la recherche ?**

Au cours d'une consultation de suivi pour sa maladie, le protocole de l'étude a été présenté et expliqué à votre parent atteint de maladie de Crohn, par un médecin investigateur.

Souhaitant participer à cette étude, votre parent vous propose de participer à l'étude en vous transmettant ce document d'information expliquant le déroulement de l'étude et son objectif, ainsi qu'un coupon réponse à l'attention du Dr Gower.

En adressant par courrier le coupon réponse (via l'enveloppe pré-timbrée adressée au Dr Gower) vous nous informez de votre intérêt pour l'étude. Suite à votre réponse, un rendez-vous avec un investigateur sera planifié, afin de vous expliquer l'étude et de répondre à vos questions. En cas, d'accord de participation, il vous sera demandé de revenir avec vos prélèvements de selles.

Si vous souhaitez participer à l'étude, vous donnerez votre accord écrit en signant le consentement éclairé ci-joint.

Après avoir donné votre accord de participation par écrit, en signant le consentement éclairé ci-joint, vous serez inclus dans le protocole.

Cas des apparentés atteints de maladie de Crohn :

Un prélèvement de 30ml de sang sera effectué pour les analyses génétiques, et le prélèvement de selles récupéré.

Des collections biologiques seront constituées : d'ADN, de sérum et de selles, pour une utilisation ultérieure.

Suite à ces prélèvements, votre participation à l'étude sera terminée.

Cas des apparentés sains :

Des questions vous seront posées, et un dosage de calprotectine sera effectué, afin de vérifier que vous n'avez pas de maladie inflammatoire chronique de l'intestin comme la maladie de Crohn.

Ensuite, un prélèvement de 30ml de sang sera effectué pour les analyses génétiques, et le prélèvement de selles récupéré.

Des collections biologiques seront constituées : d'ADN, de sérum et de selles, pour une utilisation ultérieure.

Suite à ces prélèvements, votre participation à l'étude sera terminée.

Dans le cas où nous n'arriverions pas à obtenir le consentement de 3 personnes atteintes de maladie de Crohn et d'une personne apparentée saine, de votre famille, ou si la vérification du gène *NOD2* est positive, les échantillons prélevés seront uniquement utilisés pour la collection biologique.

**4) Que se passera-t-il à la fin de ma participation à cette recherche ?**

Les collections d'échantillons biologiques constituées à partir de vos prélèvements seront conservées au CRB du CHRU de Lille sous la responsabilité du Dr Gower. Cette collection pourra être réutilisée pour d'autres études dans le domaine de la maladie de Crohn, sauf si vous exprimez votre opposition à l'utilisation ultérieure de vos prélèvements. A tout moment, vous pouvez vous opposer à la réutilisation de vos échantillons à des fins scientifiques ultérieures en adressant une copie de ce document, après avoir coché la case ci-dessous, Dr Gower à l'adresse suivante : Hôpital Huriez, CHRU, 59037 Lille Cedex, Tel : 03 20 44 45 13

**5) Quels sont les bénéfices attendus ?**

Le bénéfice attendu de l'étude est de permettre l'identification de nouveaux facteurs génétiques impliqués dans la maladie de Crohn, et qui seraient présents dans votre famille. Les résultats permettront d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la maladie de Crohn ainsi qu'une meilleure compréhension des mécanismes qui pourraient provoquer la maladie.

**6) La recherche comporte-t-elle des risques, des effets indésirables et/ou des contraintes particulières ?**

Les risques liés à l'étude sont ceux liés à la prise de sang de 30 ml, à savoir un hématome léger ou une douleur au point de ponction, très exceptionnellement une infection au point de ponction.

**7) Quelles sont les conditions de participation à la recherche ?**

Afin de pouvoir participer à cette étude, vous devez être affilié(e) à un régime obligatoire d'Assurance Maladie ou ayant droit d'un assuré social.

Votre participation à cette étude nécessite que nous informions votre médecin traitant sauf si vous refusez.

**8) Quels sont mes droits en tant que participant à la recherche ?**

Vous êtes libre d'accepter ou de refuser de participer à cette recherche sans avoir à vous justifier et sans que cela ne modifie la relation de soin existant avec l'équipe médicale vous prenant en charge.

Vous n'êtes pas obligé de donner votre décision tout de suite : vous disposez du temps que vous estimez nécessaire pour prendre votre décision.

Votre participation à cette étude nécessite que nous informions votre médecin traitant, sauf si vous le refusez.

En cas d'acceptation, vous pourrez à tout moment revenir sur votre décision, sans nous en préciser la raison, et sans que cela n'altère la qualité des soins qui vous sont dispensés.

Par ailleurs, vous pourrez obtenir au cours ou à l'issue de la recherche, communication de vos données de santé détenues par votre médecin.

Dans le cadre de la recherche, un traitement de vos données personnelles sera mis en œuvre pour permettre d'analyser les résultats de l'étude au regard de l'objectif de cette dernière qui vous a été présenté. A cette fin, les données médicales vous concernant ou tout autre type de données existantes seront transmises au Promoteur de la recherche. Ces données seront identifiées par un numéro de code et vos initiales. Ces données pourront également, dans des conditions assurant leur confidentialité, être transmises aux autorités de santé françaises. Conformément aux dispositions de la loi relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, vous disposez d'un droit d'accès et de rectification. Vous disposez également d'un droit d'opposition à la transmission des données couvertes par le secret professionnel susceptibles d'être utilisées dans le cadre de cette recherche et d'être traitées. Ces droits s'exercent auprès du médecin qui vous a proposé de participer à cette étude.

Si vous le souhaitez, les résultats globaux de l'étude pourront vous être communiqués par courrier sur demande auprès du Dr GOWER lorsqu'elle sera achevée.

Vous n'aurez à supporter aucune charge financière supplémentaire du fait de votre participation à cette étude.

### **9) Le CHRU de Lille est-il autorisé à réaliser ce type de recherche?**

Oui, en application de la loi, cette étude a été autorisée par l'ANSM<sup>2</sup>, le ..... ; elle a également reçu, le ....., un avis favorable du Comité de Protection des Personnes Nord Ouest IV., organisme officiel et indépendant qui a vocation à protéger la sécurité des personnes qui se prêtent à la recherche. En outre, le CHRU de Lille, en sa qualité de promoteur, a souscrit une assurance pour la réalisation de cette étude auprès de la SHAM, contrat n° .....

### **10) A qui dois-je m'adresser en cas de questions ou de problèmes ?**

Vous pouvez poser toutes les questions que vous souhaitez, avant, pendant et après l'étude en vous adressant au médecin investigateur de l'étude que vous rencontrerez :

Dr Corinne GOWER  
tél 03 20 44 45 13  
Hôpital Huriez,  
CHRU, 59037 Lille Cedex.

Nous sommes à votre disposition pour répondre à toute question

Si vous êtes d'accord pour participer à cette étude, nous vous remercions de bien vouloir donner votre consentement écrit en signant le formulaire ci-après.

Paraphe du participant :

Paraphe du médecin investigateur:

*Nous vous remercions de parapher chaque page de ce document (réalisé en trois exemplaires), afin d'attester que vous l'avez lu et compris. Si vous êtes d'accord pour participer à cette étude, nous vous remercions également de bien vouloir donner votre consentement écrit en signant le formulaire ci-après.*

<sup>2</sup> ANSM: Agence Nationale de sécurité des Médicaments. Autorité de santé ayant notamment pour mission d'autoriser, de suivre et de contrôler le déroulement de la recherche.



Formulaire de consentement de participation à une recherche biomédicale pour les apparentés au  
proband

**« Recherche de nouvelles mutations génétiques à effet majeur dans la maladie de Crohn »  
MC-WES**

Promoteur : CHRU de Lille  
Investigateur Principal : Dr GOWER, Hôpital Huriez, CHRU de Lille

Je soussigné(e) Mme, Mlle, M. (rayer les mentions inutiles)

Nom : .....Prénom : .....  
Adresse : .....

accepte librement et volontairement de participer à la recherche biomédicale intitulée  
« Recherche de nouvelles mutations génétiques à effet majeur dans la maladie de Crohn. MC-WES »  
dont le CHRU de Lille est promoteur et qui m'a été proposée par le Docteur/Professeur (nom,  
coordonnées).....

Etant entendu que :

- Le médecin qui m'a informé et a répondu à toutes mes questions, m'a précisé que ma participation à cette étude est libre et que je peux arrêter d'y participer à tout moment en informant préalablement mon médecin. J'ai disposé d'un délai de réflexion suffisant avant de prendre ma décision.
- J'ai été clairement informé (e) des éléments suivants : But de la Recherche- Méthodologie- Durée de ma participation- Bénéfices attendus- Contraintes- Risques prévisibles.
- J'ai bien compris que pour pouvoir participer à cette recherche, je dois être affilié(e) à un régime de sécurité sociale ou être ayant-droit d'un assuré social. Je confirme que c'est bien le cas,
- Si je le souhaite, je serai informé(e) par le médecin des résultats globaux de cette recherche selon les modalités figurant dans la note d'information qui m'a été remise.
- Mon consentement ne décharge en rien le médecin et le promoteur de l'ensemble de leurs responsabilités et je conserve tous mes droits garantis par la loi.
- Dans le cadre de cette étude, un examen de mes caractéristiques génétiques va être effectué. Cet examen vise à mettre en évidence des mutations génétiques associées à la maladie de Crohn.

- J'accepte qu'il soit procédé à l'examen de mes caractéristiques génétiques dans le cadre de cette étude, conformément à ce qui m'a été expliqué.
- Je refuse que cet examen de mes caractéristiques génétiques soit effectué.
- En cochant cette case, j'exprime mon refus concernant la réutilisation à des fins scientifiques secondaires de mes prélèvements biologiques.

- J'accepte que les données enregistrées à l'occasion de cette recherche comportant des données génétiques puissent faire l'objet d'un traitement informatisé par le promoteur ou pour son compte. J'ai bien noté que le droit d'accès prévu par la CNIL (loi du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés (art. 39)) s'exerce à tout moment auprès du médecin qui me suit dans le cadre de la recherche et qui connaît mon identité. Je pourrai exercer mon droit de rectification et d'opposition auprès de ce même médecin, qui contactera le promoteur de la recherche.

Fait à ....., le.....

Fait à ....., le.....

Signature du participant :

Signature du médecin investigateur :

*Le présent formulaire est réalisé en trois exemplaires, dont un est remis à l'intéressé. Un exemplaire sera conservé par l'investigateur ; le dernier sera conservé par le promoteur en toute confidentialité, conformément à la loi.*



Note d'information portant sur la participation d'un Proband mineur, à la recherche biomédicale intitulée

**« Recherche de nouvelles mutations génétiques à effet majeur dans la maladie de Crohn »  
MC-WES**

Promoteur : CHRU de Lille  
Investigateur Principal : Dr GOWER, Hôpital Huriez, CHRU de Lille

Madame, Monsieur,

Le présent document décrit l'étude pour laquelle le CHRU de Lille sollicite la participation de votre enfant. Il résume les informations actuellement disponibles en répondant aux différentes questions que vous pouvez vous poser dans le cadre de la participation à cette recherche.

### **1) Pourquoi participer à cette étude?**

Nous proposons à votre enfant de participer à une étude sur la génétique de la maladie de Crohn. La maladie de Crohn (MC) est une Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin (MICI) qui touche environ 100 000 personnes en France et plus d'un million en Europe. Bien que nos connaissances aient récemment progressé, l'origine de cette maladie reste inconnue. L'hypothèse la plus communément admise est que la maladie de Crohn est liée, dans 80% des cas à des facteurs environnementaux et dans 20% des cas à des facteurs génétiques de susceptibilité. Dans ce dernier cas, la maladie présente une susceptibilité familiale.

Dans cette étude, nous nous intéressons plus particulièrement aux facteurs génétiques de prédisposition à la maladie. A ce jour, nous ne connaissons qu'un facteur génétique majeur impliqué dans la maladie de Crohn : le gène *NOD2*.

Cette étude est proposée à des familles dont certains membres sont atteints de la maladie de Crohn, mais pour lesquelles le facteur génétique *NOD2* n'est pas impliqué.

Dans cette étude nous souhaitons inclure les membres issus de ce type de famille, comprenant au moins trois sujets atteints de maladie de Crohn et un apparenté non atteint.

Votre famille fait partie des familles sélectionnées à partir du Registre EPIMAD, dans lequel votre enfant est enregistré car il est atteint de la maladie de Crohn. C'est pourquoi nous sollicitons votre accord pour la participation de votre enfant à cette étude.

### **2) Quel est l'objectif de la recherche ?**

L'objectif principal de cette étude est d'identifier de nouveaux facteurs impliqués dans la maladie de Crohn et de mieux comprendre les mécanismes de cette maladie.

### **3) Comment va se dérouler la recherche ?**

Au cours d'une consultation de suivi pour sa maladie, le protocole de l'étude vous sera présenté et expliqué, ainsi qu'à votre enfant, par un médecin investigateur.

Si vous souhaitez que votre enfant participe à cette étude, vous proposerez à l'ensemble de votre famille (apparentés du 1<sup>er</sup>, 2<sup>d</sup> et 3<sup>ème</sup> degré), atteints ou non atteints de maladie de Crohn, de participer à l'étude, et leur transmettez un document d'information expliquant le déroulement de l'étude et son objectif, un coupon réponse à l'attention du Dr Gower, ainsi que des kits de prélèvement de selles. En cas, d'accord de participation, il sera demandé à chaque participant de revenir avec ses prélèvements de selles.

Un rendez-vous sera planifié pour les membres de votre famille qui souhaitent participer à l'étude (information donnée via le coupon réponse), afin qu'un investigateur puisse leur expliquer l'étude et répondre à leurs questions.

Après que vous et votre enfant ayez donné votre accord de participation par écrit, en signant le consentement éclairé ci-joint, un prélèvement sanguin sera effectué sur votre enfant (le volume de sang

prélevé sera fonction du poids de votre enfant et ne dépassera pas 1% de son volume de sang total), pour les analyses génétiques, et le prélèvement de selles récupéré.

Des collections biologiques seront constituées : d'ADN, de sérum et de selles, pour une utilisation ultérieure.

Suite à ces prélèvements, la participation à l'étude de votre enfant sera terminée.

Dans le cas où nous n'arriverions pas à obtenir le consentement de 3 personnes atteintes de MC et d'une personne apparentée saine, de votre famille, ou si la vérification du gène *NOD2* est positive, les échantillons prélevés seront uniquement utilisés pour une collection biologique.

A la majorité du probant mineur, il lui sera demandé de confirmer le maintien de son accord de participation au protocole et/ou d'utilisation ultérieure de la collection biologique, en signant le consentement éclairé pour probant majeur.

#### **4) Que se passera-t-il à la fin de la participation à l'étude ?**

Les collections d'échantillons biologiques constituées à partir des prélèvements de votre enfant seront conservées au CRB du CHRU de Lille sous la responsabilité du Dr Gower. Cette collection pourra être réutilisée pour d'autres études dans le domaine de la maladie de Crohn, sauf si vous ou lui exprimez votre opposition à l'utilisation ultérieure de ses prélèvements. A tout moment, vous ou lui pouvez vous opposer à la réutilisation de ses échantillons à des fins scientifiques ultérieures en adressant une copie de ce document, après avoir coché la case ci-dessous, Dr Gower à l'adresse suivante : Hôpital Huriez, CHRU, 59037 Lille Cedex, Tel : 03 20 44 45 13

#### **5) Quels sont les bénéfices attendus ?**

Le bénéfice attendu de l'étude est de permettre l'identification de nouveaux facteurs génétiques impliqués dans la maladie de Crohn, et qui seraient dans votre famille. Les résultats permettront d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la maladie de Crohn ainsi qu'une meilleure compréhension des mécanismes qui pourraient provoquer la maladie.

#### **6) La recherche comporte-t-elle des risques, des effets indésirables et/ou des contraintes particulières ?**

Les risques liés à l'étude sont ceux liés à la prise de sang d'un volume qui sera fonction du poids de votre enfant, à savoir un hématome léger ou une douleur au point de ponction, très exceptionnellement une infection au point de ponction.

#### **8) Quelles sont les conditions de participation à la recherche ?**

Afin de pouvoir participer à cette étude, l'enfant doit être affilié(e) à un régime obligatoire d'Assurance Maladie ou ayant droit d'un assuré social.

Sa participation nécessite que nous informions votre médecin traitant, sauf si vous et l'enfant le refusez.

#### **9) Quels sont nos droits dans le cadre de cette étude ?**

Vous êtes libre de refuser que l'enfant participe à la recherche sans avoir à vous justifier et sans que la relation de soin existant avec l'équipe médicale ne soit altérée. Le fait pour l'un des titulaires de l'autorité parentale de refuser de donner son autorisation, revient à interdire la participation de l'enfant, quelque soit l'opinion de l'autre parent et de l'enfant.

L'enfant est également en droit de refuser de participer : son refus entraînera l'interdiction pour l'équipe médicale de l'inclure dans l'étude, même si vous avez donné votre autorisation.

Vous n'êtes pas obligé de nous donner votre décision tout de suite ; vous disposez du temps que vous estimez nécessaire pour prendre votre décision.

En cas d'acceptation, chacun d'entre vous, y compris l'enfant, pourra revenir sur sa décision et retirer son acceptation à tout moment, sans avoir à se justifier et sans que cela ne modifie la qualité des soins auxquels l'enfant a droit.

Dans le cadre de la recherche biomédicale à laquelle le CHRU de Lille vous propose de participer, un traitement des données personnelles de l'enfant va être mis en oeuvre pour permettre d'analyser les résultats de la recherche au regard de l'objectif de cette dernière qui vous a été présenté. A cette fin, les données médicales le concernant et les données relatives à ses habitudes de vie, ainsi que, dans la mesure où ces données sont nécessaires à la recherche, ses origines ethniques, seront transmises au Promoteur de la recherche ou aux personnes ou sociétés agissant pour son compte, en France ou à l'étranger. Ces données seront identifiées par un numéro de code et ses initiales. Ces données pourront également, dans des conditions assurant leur confidentialité, être transmises aux autorités de santé françaises ou étrangères, à d'autres entités du CHRU de Lille. Conformément aux dispositions de loi relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés, vous disposez d'un droit d'accès et de rectification. Vous disposez également d'un droit d'opposition à la transmission des données couvertes par le secret professionnel susceptibles d'être utilisées dans le cadre de cette recherche et d'être traitées. Vous pouvez également accéder directement ou par l'intermédiaire d'un médecin de votre choix à l'ensemble de ces données médicales en application des dispositions de l'article L 1111-7 du Code de la Santé Publique. Ces droits s'exercent auprès du médecin qui suit l'enfant dans le cadre de la recherche et qui connaît son identité.

Au terme de la recherche, si vous et l'enfant le souhaitez, vous obtiendrez communication des résultats globaux de l'étude auprès du Dr Gower.

Vous n'aurez à supporter aucune charge financière supplémentaire du fait de sa participation à cette étude.

#### **10) Le CHRU de Lille est-il autorisé à réaliser ce type de recherche?**

Oui, en application de la loi, cette étude a été autorisée par l'ANSM<sup>3</sup>, le ..... ; elle a également reçu le ..., un avis favorable du Comité de Protection des Personnes Nord Ouest ..., organisme officiel et indépendant qui a notamment vocation à protéger la sécurité des personnes qui se prêtent à la recherche.

En outre, le CHRU de Lille, en sa qualité de promoteur, a souscrit une assurance couvrant notamment la responsabilité civile de votre enfant dans le cadre de cette étude.

#### **11) A qui s'adresser en cas de questions ou de problèmes ?**

Vous et l'enfant pourrez poser toutes les questions que vous souhaitez, avant, pendant et après l'étude. Pour toute information complémentaire, vous pouvez vous adresser à :

Dr Corinne GOWER

tél 03 20 44 45 13

Hôpital Huriez,

CHRU, 59037 Lille Cedex.

Nous sommes à votre disposition pour répondre à toute question

Si vous êtes d'accord pour que votre enfant participe à cette étude, nous vous remercions de bien vouloir donner votre consentement écrit en signant le formulaire ci-après.

**Nous vous remercions de bien vouloir parapher chaque page de ce document (réalisé en quatre exemplaires), afin d'attester que vous l'avez bien lu et compris.**

**Si vous êtes d'accord pour que l'enfant participe à cette étude, nous vous remercions de bien vouloir donner votre autorisation écrite en signant le formulaire ci après.**

**Ensuite, avec votre appui, nous informerons l'enfant oralement et par écrit. Son approbation pourra se manifester par sa signature du formulaire de consentement que vous aurez préalablement signé.**

---

<sup>3</sup> ANSM: Agence Nationale de sécurité des Médicaments. Autorité de santé ayant notamment pour mission d'autoriser, de suivre et de contrôler le déroulement de la recherche.

Formulaire de consentement de participation d'un Proband mineur, à une recherche biomédicale

**« Recherche de nouvelles mutations génétiques à effet majeur dans la maladie de Crohn »  
MC-WES**

Promoteur : CHRU de Lille  
Investigateur Principal : Dr GOWER, Hôpital Huriez, CHRU de Lille

Je, soussigné (e)

M<sup>e</sup>, M<sup>lle</sup> (*nom, prénom*) ..... (*Mère titulaire de l'autorité parentale, ou autre représentant légal* [barre mention inutile])

et

Je soussigné

M. (*nom, prénom*) ..... (*Père titulaire de l'autorité parentale, ou autre représentant légal* [barre mention inutile])

**accepte librement et volontairement que l'enfant « ..... »  
participe à la recherche biomédicale intitulée « Recherche de nouvelles mutations  
génétiques à effet majeur dans la maladie de Crohn, MC-WES »**

dont le CHRU de Lille est promoteur et qui m'a été proposée par le Docteur/Professeur (*nom, coordonnées*).....

Etant entendu que :

- Le médecin qui m'a informé(e) et a répondu à toutes mes questions, m'a précisé que ma décision est libre et que l'enfant est libre de refuser cette participation sans que la relation de soins avec l'équipe médicale ne soit altérée.

- J'ai été clairement informé(e) des éléments suivants : But de la Recherche- Méthodologie- Durée de ma participation- Bénéfices attendus- Contraintes- Risques prévisibles et j'ai réexpliqué ces informations à l'enfant, en concertation avec le médecin.

- J'ai bien compris dans la note d'information qui m'a été remise que pour pouvoir participer à cette recherche l'enfant doit être affilié(e) à un régime de sécurité sociale ou ayant-droit d'un assuré social. Je confirme que c'est bien le cas,

- Il m'a été clairement précisé que je peux retirer à tout moment mon consentement sans me justifier et sans que cela ne porte atteinte à la qualité des soins qui sont dispensés à mon enfant, en informant préalablement le médecin.

- Si l'enfant et moi le souhaitons, nous serons informés par le médecin des résultats globaux de cette recherche selon les modalités figurant dans la note d'information qui m'a été remise,

- Mon consentement ne décharge en rien le médecin et le promoteur de l'ensemble de leurs responsabilités et je conserve tous mes droits garantis par la loi.

- Dans le cadre de cette étude, un examen des caractéristiques génétiques de l'enfant va être effectué. Cet examen vise à mettre en évidence des mutations génétiques associées à la maladie de Crohn.

J'accepte qu'il soit procédé à l'examen des caractéristiques génétiques de l'enfant dans le cadre de cette étude, conformément à ce qui m'a été expliqué.

Je refuse que cet examen des caractéristiques génétiques soit effectué.

En cochant cette case, j'exprime mon refus concernant la réutilisation à des fins scientifiques secondaires de mes prélèvements biologiques.

- J'accepte que les données enregistrées à l'occasion de cette recherche comportant des données génétiques puissent faire l'objet d'un traitement informatisé par le promoteur ou pour son compte. J'ai

bien noté que le droit d'accès prévu par la CNIL (loi du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés (art. 39)) s'exerce à tout moment auprès du médecin qui suit l'enfant dans le cadre de la recherche et qui connaît son identité. Je pourrai exercer mon droit de rectification et d'opposition auprès de ce même médecin, qui contactera le promoteur de la recherche.

Fait à ....., le.....

Signature du père, titulaire de l'autorité parentale :

(J'atteste être le seul titulaire de l'autorité parentale : barrer si inutile)

Fait à ....., le.....

Signature de la mère, titulaire de l'autorité parentale :

(J'atteste être le seul titulaire de l'autorité parentale : barrer si inutile)

Fait à ....., le.....

Signature : autre représentant légal : (uniquement si le mineur est placé sous tutelle : dans ce cas : barrer les mentions père/mère ci-dessus)

L'enfant refuse-t-il de signer ? :  oui  non (à remplir par le mineur, ou par les titulaires de l'autorité parentale/représentant légal)

Fait à ....., le.....

Signature éventuelle du mineur:

Fait à ....., le.....

Signature du médecin investigateur ou du médecin qui le représente (barrer la mention inutile) :

**Le présent formulaire ainsi que la note d'information sont réalisés en quatre exemplaires, dont deux sont remis aux parents. Les autres exemplaires seront conservés par l'investigateur et par le promoteur.**



Note d'information pour un Proband mineur adolescent, participant à la recherche biomédicale intitulée

**« Recherche de nouvelles mutations génétiques à effet majeur dans la maladie de Crohn »**  
MC-WES

Promoteur : CHRU de Lille  
Investigateur Principal : Dr GOWER, Hôpital Huriez, CHRU de Lille

## Qui sommes-nous ?

Mon nom est \_\_\_\_\_ et je suis \_\_\_\_\_ à \_\_\_\_\_  
(établissement). Je travaille dans le service de \_\_\_\_\_.

## Pourquoi voulons-nous parler avec toi ?

Nous envisageons de te faire participer à une étude clinique. Cette étude, appelée MC-WES, est organisée par le CHRU de Lille.

Nous proposons celle-ci à des familles dont certains membres sont atteints de la maladie de Crohn.

Dans ce type de famille, nous souhaitons inclure au moins trois sujets atteints de maladie de Crohn et un apparenté non atteint.

Ta famille fait partie des familles sélectionnées à partir du Registre EPIMAD, dans lequel tu es enregistré. C'est pourquoi nous te demandons ton accord pour participer à cette étude.

## Pourquoi faisons-nous cette étude ?

La maladie de Crohn (MC) est une Maladie Inflammatoire Chronique de l'intestin (MICI) qui touche environ 100 000 personnes en France et plus d'un million en Europe.

L'origine de cette maladie reste encore inconnue et nous aimerions mieux la connaître pour mieux la traiter. Nous savons cependant qu'elle peut être d'origine génétique ou environnementale.

Dans cette étude, nous nous intéressons aux familles pour lesquelles la maladie est d'origine génétique.

L'objectif, est d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la maladie de Crohn afin de mieux comprendre les mécanismes de cette maladie.

De ce fait, nous souhaitons comparer dans une même famille tous les gènes d'au moins 3 personnes, qui, comme toi, sont atteintes par la maladie, avec ceux de personnes non atteintes par la maladie (au moins une).

## Que se passera-t-il si tu participes à l'étude ?

Si tu penses vouloir participer, le médecin donnera à tes parents des documents expliquant l'étude pour les remettre aux membres de ta famille, ainsi que 4 pots dans lesquels tu devras déposer un peu de tes selles. Ne t'inquiète pas, un guide d'utilisation sera remis à tes parents ou à ton tuteur légal pour qu'ils t'aident.

D'autres pots seront remis à tes parents pour les membres de ta famille qui souhaitent participer à l'étude.

Ton médecin te reverra dans son bureau avec les autres membres de ta famille. Il t'expliquera comment se passera l'étude et fera signer, à toi, ainsi qu'aux autres membres de ta famille, un document appelé consentement éclairé. Si tu signes le document cela veut dire et que tu as bien compris l'étude et que tu es d'accord pour y participer.

Ensuite il te posera des questions et récupérera les pots de selles. Une infirmière te fera un prélèvement sanguin (pour ne pas avoir mal lors de celle-ci, tu pourras mettre un patch d'Emla, une heure avant). Elle remplira 6 tubes de sang.

Des collections biologiques d'ADN, de sérum et de selles seront constituées pour une utilisation ultérieure.

Suite à ces prélèvements, ta participation à l'étude sera terminée.

Dans le cas où nous n'arriverions pas à obtenir le consentement de 3 personnes atteintes de maladie de Crohn et d'une personne apparentée saine de ta famille, les échantillons prélevés seront uniquement utilisés pour une collection biologique.

A ta majorité, il te sera demandé de confirmer le maintien de ton accord de participation au protocole et/ou d'utilisation ultérieure de la collection biologique, en signant le consentement éclairé pour probant majeur.

## **Quels sont les bénéfices et les risques de cette étude ?**

Les bénéfices attendus par cette étude sont dans un premier temps de permettre l'identification de nouveaux gènes impliqués dans la maladie de Crohn, qui seraient dans ta famille. Nous espérons également obtenir une meilleure compréhension des mécanismes qui pourraient provoquer cette maladie.

Cette étude comporte néanmoins des risques liés à la prise de sang. En effet, il est possible que tu ressenties une douleur lors de la piqûre, que tu ais un hématome ou que tu t'évanouisses.

## **Es-tu obligé(e) de participer à cette étude ?**

C'est à toi de décider si tu veux ou non participer à cette étude ; ta participation est totalement volontaire. Si tu ne souhaites pas participer, tu n'as pas à donner de raison. Et n'oublie pas, si tu ne veux plus participer à l'étude, tu seras libre d'en sortir à tout moment sans avoir à te justifier.

De même, ton médecin et/ou le promoteur pourront décider d'arrêter l'étude à tout moment. Cela n'aura aucune conséquence sur ta prise en charge habituelle.

## **Ta participation sera-t-elle confidentielle ?**

Toutes les informations (données) personnelles seront traitées avec la plus grande confidentialité, conformément aux exigences françaises. Tes données personnelles ne seront identifiées que par un numéro de patient et tes initiales (1<sup>ère</sup> lettre de ton prénom et 1<sup>ère</sup> lettre de ton nom).

Les informations te concernant contenues dans l'étude, incluant des éléments de ton dossier médical, pourront être vérifiées par le CHRU de Lille ou par les autorités de santé. Les résultats de cette étude pourront être transmis aux autorités réglementaires, publiés ou présentés lors de congrès scientifiques et ils pourront être utilisés pour de futures recherches. Cependant, ces données seront anonymes et tu ne pourras pas être identifié(e). Si tu souhaites être informé(e) des résultats de l'étude, tu devras les demander à ton médecin.

En signant le formulaire de consentement éclairé, tu autorises les personnes mentionnées ci dessus à consulter ton dossier médical ainsi que la collecte et le traitement de tes données de santé au sein de l'étude.

Avec ton accord, ton médecin pourra informer ton médecin traitant de ta participation à l'étude.

## Si tu veux poser des questions

Tu pourras poser des questions à tout moment. Tu pourras m'appeler ou appeler une autre personne à tout moment pendant l'étude. Voici le numéro de téléphone pour nous joindre :

Nom de l'investigateur :

Service :

Numéro de téléphone :

Tu peux également poser des questions sur l'étude à tes parents ou à ton tuteur légal.

Nous te remercions de mettre tes initiales (1ère lettre de ton prénom et 1ère lettre de ton nom) sur chaque page de ce document (réalisé en trois exemplaires), afin d'attester que tu l'as lu et compris. Si tu es d'accord pour participer à cette étude, nous te remercions également de bien vouloir donner ton consentement écrit en signant le formulaire ci-après.

Si tu as envie d'être dans l'étude, indique ton nom et signe sur la ligne en dessous :

Nom de l'adolescent

Signature de l'adolescent

Date

-----

-----

-----



Note d'information pour un Proband mineur (de 6 à 10 ans), participant à la recherche biomédicale intitulée

**« Recherche de nouvelles mutations génétiques à effet majeur dans la maladie de Crohn »  
MC-WES**

Promoteur : CHRU de Lille  
Investigateur Principal : Dr GOWER, Hôpital Huriez, CHRU de Lille

### Qui sommes-nous ?

Mon nom est \_\_\_\_\_ et je suis \_\_\_\_\_ à \_\_\_\_\_ (établissement). Je travaille dans le service de \_\_\_\_\_.

### Pourquoi voulons-nous parler avec toi ?

Nous voulons te parler d'une étude qui concerne des enfants comme toi qui sont atteints de la maladie de Crohn. Nous aimerions savoir si tu aimerais être dans cette étude toi aussi.

### Pourquoi faisons-nous cette étude ?

On ne connaît pas la cause de la maladie de Crohn et on aimerait mieux la connaître pour mieux la traiter. Elle peut être d'origine génétique ou environnementale. Dans cette étude nous nous intéressons aux familles pour lesquelles la maladie est d'origine génétique. Donc, nous souhaitons comparer, dans la même famille, tous les gènes d'au moins 3 personnes atteintes par la maladie (comme toi), avec ceux de personnes non atteintes par la maladie (au moins une).

Faisant partie d'une de ces familles, on a besoin de ton aide pour cette étude.

### Que se passera-t-il si tu participes à l'étude ?

Si tu penses vouloir participer, le docteur donnera à tes parents des documents à donner aux membres de ta famille expliquant l'étude, ainsi que 4 pots dans lesquels tu mettras, avec eux, un petit peu de tes selles. Ne t'inquiète surtout pas un guide d'utilisation sera remis à tes parents ou à ton tuteur légal pour qu'ils t'aident. D'autres pots seront remis à tes parents pour les membres de ta famille qui souhaitent participer à l'étude.

Ton docteur te reverra dans son bureau avec les autres membres de ta famille. Il t'expliquera comment se passera l'étude et te fera signer ainsi qu'aux autres membres de ta famille, un document appelé consentement éclairé. Si tu signes le document cela veut dire que tu es d'accord pour participer à l'étude et que tu as bien tout compris.

Tu ne pourras être inclus dans l'étude que si 2 membres malades et 1 non malade, au moins, acceptent de participer à l'étude.

Ensuite ton docteur te posera des questions, récupérera les pots de selles et tu devras faire une prise de sang. Pour ne pas avoir mal lors de la prise de sang tu pourras mettre un patch d'Emla, une heure avant. L'infirmière remplira 6 tubes de sang. Ensuite, tu pourras rentrer chez toi et ta participation à l'étude sera terminée.

### **Quelles sont les bonnes choses et les mauvaises choses qui peuvent t'arriver si tu es dans l'étude ?**

Le fait d'être dans l'étude ne t'apportera aucune bonne chose, mais l'étude pourra aider à soigner d'autres enfants dans le futur. L'étude n'aura pas de mauvais effets pour toi car il n'y aura pas de changement ni de ton traitement ni de ton suivi médical mais tu pourrais ressentir une douleur lors de la prise de sang ou avoir un bleu.

### **Es-tu obligé(e) d'être dans l'étude ?**

Non, tu n'es pas obligé(e). Personne ne sera fâché ou en colère contre toi si tu ne veux pas.

Tu dois simplement nous dire que tu ne veux pas être dans l'étude. Et n'oublie pas, si tu dis que tu veux bien être dans l'étude, tu pourras changer d'avis plus tard si tu décides que tu ne veux plus y être.

Ton docteur pourra également décider d'arrêter l'étude à n'importe quel moment, mais cela ne changera rien pour toi ni pour ton suivi médical.

### **Si tu veux poser des questions**

Tu pourras poser des questions à tout moment. Tu peux en poser maintenant. Tu pourras en poser plus tard. Tu pourras parler avec moi ou avec une autre personne à tout moment pendant l'étude. Voici les numéros de téléphone pour nous joindre :

**(Nom de l'investigateur)**

**(Service)**

**(Numéro de téléphone)**

Tu peux aussi parler avec tes parents ou ton tuteur légal et leur poser des questions sur l'étude, puisque ton médecin leur a aussi expliqué l'étude en détail.

*Nous te remercions de mettre tes initiales (1ere lettre de ton prénom et 1ere lettre de ton nom) sur chaque page de ce document (réalisé en trois exemplaires), afin de montrer que tu l'as lu et compris. Si tu es d'accord pour participer à cette étude, nous te remercions également de bien vouloir donner ton consentement écrit en signant le formulaire ci-après.*

**Si tu as envie d'être dans l'étude, indique ton nom et signe sur la ligne en dessous :**

Nom de l'enfant

Signature de l'enfant

Date

-----

-----

-----

**Annexe 2 : Questionnaire clinique**

**Questions à poser permettant d'évoquer une possible MICI dans le cadre de l'étude MC-WES.**

**1) Présentez-vous des troubles du transit intestinal à type de diarrhée ?**

OUI                       NON

**1 bis) Si oui, cette diarrhée est-elle aussi nocturne ?**

OUI                       NON

**2) Avez-vous souvent la sensation de devoir aller à la selle avec émission que de glaires et de sang ?**

OUI                       NON

**3) Avez-vous souvent mal au ventre ?**

OUI                       NON

**3 bis) Si oui, cela vous empêche t'il de dormir ?**

OUI                       NON

**4) Avez-vous déjà présenté (ou présentez-vous actuellement) des lésions anales à type de fissures, fistules ou abcès ?**

OUI                       NON

Si, avec ce questionnaire, il existe une suspicion de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI), un avis spécialisé devra être pris avant d'inclure le patient.

### Annexe 3 : Références

#### Références :

1. Andre Franke et al. Meta-Analysis Increases to 71 the Tally of Confirmed Crohn's Disease Susceptibility Loci. *Nat Genet.* 2010 December, 42 (12) : 1118-1125
2. Ogura Y. et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* May 2001, 411, 603-606
3. Hugot JP et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* May 2001, 411, 599-603
4. Hugot JP et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* Feb 1996, 379, 821-823
5. McGovern DP et al. NOD2 (CARD15), the first susceptibility gene for Crohn's disease. *Gut.* December 2001, 49(6), 752-754
6. Lesage S. et al CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am.J.Hum.Genet* Apr 2002, 70, 845-857
7. Inohara et al. The NOD : a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene* Oct 2001, 20(44), 6473-6481
8. Economou M et al. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol.* Dec 2004, 99(12),2393-2404
9. Oostenbrug LE et al. CARD15 in inflammatory bowel disease and Crohn's disease phenotypes: an association study and pooled analysis. *Dig Liver Dis.* Nov 2006, 38(11), 834-845. Epub 2006 Aug 21
10. Andre Franke et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nature Genetics* janvier 2011, 43(3), 242-245
11. Wellcome Trust Case Control Consortium, Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls , *Nature*, 2007;447:661-678
12. Brest et al. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet.* Mar 2011, 43(3), 242-245
13. Jean-Frédéric Colombel et al. Clinical Characteristics of Crohn's Disease in 72 Families, *Gastroenterology*, 1996, 111, 604-607
14. B. Grandbastien et al. Anticipation in familial Crohn's disease, *Gut*, 1998, 42, 170-174
15. Mao H. et al. Exome sequencing identifies novel compound heterozygous mutations of IL-10 receptor 1 in neonatal-onset Crohn's disease. *Genes Immun* Jul 2012, 13(5), 437-442
16. Hedges DJ et al. Exome sequencing of a multigenerational human pedigree. *PLoS One* 2009, 4(12): e8232
17. Gilissen C, et al. Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet* 2012, 20:490–497
18. Leung et al. Splicing of NOD2 (CARD15) RNA transcripts. *Molecular Immunology*, 44 (2007) 284–294
19. Moum B, Jahnsen J, Bernklev T. Fecal calprotectin variability in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16:1091-2.

## **A.3 Autorisations réglementaires**

# Comité de Protection des Personnes Nord Ouest IV

**Président :** F. VASSEUR

**Vice-Président :** L. WILLIATTE

**Secrétaire :** S. DUHEM

**Trésorier :** Y. VENDEL

Lille, le 14 mars 2014,

**Membres titulaires :**

V. BARON  
R. BEUSCART  
S. COSTA  
A. De BOUVET  
X. LABBEE  
R. MATIS  
P. ODOU  
G. MARCHAL  
J.L. CHARDRON  
N. MESSAADI  
F. ASKEVIS - LEHERPEUX

Mr R. FIEVE  
MRRC  
2 rue du Professeur Laguesse  
CHRU LILLE

Madame le Docteur GOWER  
MRRC  
Pôle de Santé Publique  
2 rue du Professeur Laguesse  
CHRU LILLE

**Membres suppléants :**

M. DE MEDEIROS  
M. FOULARD  
P. HANNEQUART  
A. LECOCQ  
P. MACIAG  
N. PENEL  
C. THERY  
A-F. GERME  
F. DANICOURT-BARRIER  
S. BONTEMPS  
F. MARIE  
T. DANEL  
P. BARINCOU

Copie à

Fédération de la Recherche Clinique  
CHRU LILLE

## COMPTE RENDU DE DELIBERATION : AVIS

**Référence à rappeler dans toute correspondance : CPP 14/13**

**Intitulé du projet : "Recherche de nouvelles mutations génétiques à effets majeurs dans la maladie de Crohn MC-WES"**

**Promoteur : CHRU LILLE**

**Investigateur principal : Dr GOWER**

**Référence des documents étudiés :**

**Courrier du promoteur daté du 25/02/14**

**Tableau reprenant toutes les corrections apportées au protocole entre la version 1 du 7/01/14 et la version 1.1 du 24/02/14 accompagné de leurs justifications**

**Protocole version 1.1 du 24/02/14**

**Notes d'information version 1.1**

**N° IDRCB : 2014 A0023 44**

**Date de la réunion : mardi 11 mars 2014**

**Membres présents :**

Mme ASKEVIS-LEHERPEUX – Représentant des Psychologues  
Mr P. BARINCOU - Représentant en Matière juridique  
Mme BARON – Représentant des travailleurs sociaux  
Mr P. BEUSCART - Représentant des Personnes Qualifiées en Recherche Biomédicale  
Mme S. BONTEMPS - Représentant des travailleurs sociaux  
Mme COSTA – Représentant des Infirmiers  
Mme F. DANICOURT-BARRIER – Représentant des Pharmaciens Hospitaliers  
Mme DE BOUVET – Représentant en matière d’Ethique  
Mme DE MEDEIROS – Représentant des Infirmiers  
Mr S. DUHEM – Représentant des Psychologues  
Mr M. FOULARD – Représentant en matière d’Ethique  
Mme A-F. GERME - Représentant des Personnes Qualifiées en Recherche Biomédicale  
Mr LABBEE – Représentant en matière juridique  
Mr P. MACIAG – Représentant d’Associations  
Mr MARCHAL – Représentant des Associations  
Mr MATIS – Représentant des Personnes Qualifiées en Recherche biomédicale

**Secrétariat :**

Emilie Broux  
Bâtiment ex USNB  
rue du Professeur Laguesse  
CHRU LILLE  
S70001  
9037 LILLE Cedex

tel : 03 20 44 41 65

fax : 03 20 44 41 63

mail : ccppnordouestiv@univ-lille2.fr

Mr MESSAADI – Représentant des médecins généralistes  
Mr P. ODOU – Représentant des Pharmaciens hospitaliers  
Mr C. THERY – Représentant des personnes Qualifiées en Recherche Biomédicale  
Mr F. VASSEUR – Représentant des Personnes Qualifiées en Recherche Biomédicale-biostatistique  
Mr F. MARIE - Représentant des Associations  
Mr T. DANIEL - Représentant des Personnes Qualifiées en Recherche Biomédicale

Monsieur le Directeur, Cher Confrère,

Le Comité de Protection des Personnes Nord Ouest IV, lors de sa réunion du mardi 11 mars 2014, a pris connaissance des documents concernant l'étude citée en référence.

Le Comité avait suspendu le rendu définitif de son avis à l'obtention d'informations complémentaires lors de sa séance du mardi 11 février 2013.

La remarque essentielle concernait la note d'information destinée aux adolescents probants qui n'était pas fournie dans le dossier. Une incohérence dans la note d'information devait être corrigée concernant les volumes de prélèvement sanguin. Enfin, la case à cocher pour l'utilisation de la réutilisation à des fins scientifiques secondaires des prélèvements biologiques devait être déplacée dans le formulaire de consentement plutôt que dans la note d'information.

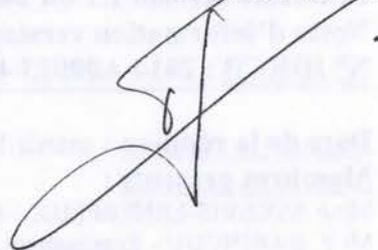
Les réponses ont été satisfaisantes et **le Comité de Protection des Personnes Nord Ouest IV émet un AVIS FAVORABLE à la réalisation de cette étude.**

Cette étude est conforme aux articles L1121-1 et L1123-7 du code de la santé publique définissant les conditions de validité de la recherche.

*Cet avis a été rendu sans que les membres éventuellement concernés par l'étude aient pris part au vote.*

Je vous prie de croire, Monsieur le Directeur, Cher Confrère, à l'expression de mes meilleures salutations.

Docteur Francis VASSEUR  
Président du CPP Nord Ouest IV



**ansm**Agence nationale de sécurité du médicament  
et des produits de santé**AUTORISATION D'ESSAI CLINIQUE NE PORTANT  
PAS SUR UN PRODUIT DE SANTE (ESSAI-HPS)**Nombre de pages : **1**

(Incluant la page de garde)

Envoi par Télécopie

Date : **25 MARS 2014**

Identifiants de l'essai clinique			
Titre	« Recherche de nouvelles mutations génétiques à effet majeur dans la maladie de Crohn		
Promoteur	Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille		Réf. CPP
Réf. Promoteur	2013_53	N° ID RCB	2014-A00023-44
		Réf. ANSM	<b>140080B-42</b>
Expéditeur		Destinataire (demandeur : nom / société / tél.)	
ANSM / Direction Produit INFHEP / Equipe Dermatologie, hépato-gastroentérologie et maladies métaboliques rares		M. Y. MORICE Fédération de Recherche Clinique : 03 20 44 41 45	
Dossier suivi par : Kareen Benmaor Tél : 33 (0) 1 55 87 40 84 / Fax : 33 (0) 1 55 87 36 26		Fax	<b>03 20 44 57 11</b>
CPP destinataire en copie	Nord-Ouest IV (Lille)	Fax	<b>03.20.44.41.63</b>
		Code 4	

Vu le code de la santé publique et notamment ses articles L. 1123-8, R. 1123-32 et vu le dossier de demande d'autorisation d'essai clinique adressé à l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) ;

Vu les compléments versés par le promoteur en date du 18 mars 2014 et notamment le protocole de l'essai cité en objet modifié (version 1.1 datée du 24/02/2014), suite à la demande de l'ANSM ;

**L'autorisation mentionnée à l'article L. 1123-8 du code de la santé publique est accordée pour l'essai clinique cité en objet.** Cette autorisation est valable pour toute la durée de l'essai à compter de la date de la présente décision.

Toutefois, conformément à l'article R. 1123-33 du code de la santé publique, la présente autorisation devient caduque si la recherche n'a pas débuté dans un délai d'un an.

En outre, je vous rappelle notamment que pendant le déroulement de la recherche et pour ce qui concerne l'ANSM :

- toute modification substantielle du dossier initialement soumis doit faire l'objet d'une demande d'autorisation en vertu des articles L. 1123-9 et R. 1123-35 du code de la santé publique ;
- les effets indésirables graves inattendus ainsi que les faits nouveaux susceptibles de porter atteinte à la sécurité des personnes doivent être déclarés en vertu des articles L. 1123-10 et R. 1123-46 du code de la santé publique.

La chef produits dermatologie, hépato-gastro-entérologie  
et maladies métaboliques rares  
Direction des médicaments anti-infectieux en hépato-gastro-  
entérologie, en dermatologie et maladies métaboliques rares

**Nathalie DUMARCET**

Je vous demande de transmettre toute demande d'informations complémentaires concernant ce dossier par courriel adressé à la boîte : [hps-essaiscliniques@ansm.sante.fr](mailto:hps-essaiscliniques@ansm.sante.fr). Je vous précise qu'il vous est possible d'utiliser à cet effet le système de messagerie électronique sécurisée Eudralink. Lors de l'envoi de ces dossiers, je vous demande de veiller à reporter dans l'objet du message les mentions suivantes :

- pour les MS transmises à l'Atssaps pour information : **MSI/ Réf ANSM du dossier**
- pour les MS soumises pour autorisation ou pour les dossiers mixtes (comportant des modifications soumises pour autorisation et d'autres pour information) : **MSA/ Réf ANSM du dossier**

**Si vous ne recevez pas toutes les pages de cette télécopie, veuillez contacter le secrétariat de la Direction Produit INFHEP/ Equipe Dermatologie, hépato-gastroentérologie et maladies métaboliques rares au : 33 (0) 1 55 87 34 05.**

**Confidentialité**

Cette transmission est à l'attention exclusive du(des) destinataire(s) ci-dessus mentionné(s) et peut contenir des informations privilégiées et/ou confidentielles. Si vous n'êtes pas le destinataire voulu ou une personne mandatée pour lui remettre cette transmission, vous avez reçu ce document par erreur et toute utilisation, révélation, copie ou communication de son contenu est interdite. Si vous avez reçu cette transmission par erreur, veuillez nous en informer par téléphone immédiatement et nous retourner le message original par courrier.

Merci.

143/147, bd Anatole France - F-93285 Saint-Denis cedex - tél. +33 (0)1 55 87 30 00 - [www.ansm.sante.fr](http://www.ansm.sante.fr)**Confidentiality**

This transmission is intended to the addressee(s) listed above only and may contain preferential or/and confidential information. If you are not the intended recipient, you are hereby notified that you have received the document by mistake and any use, disclosure, copying or communication of the content of this transmission is prohibited. If you have received this transmission by mistake, please call us immediately and return the original message by mail. Thank you.

# Annexe B

## Liste des acronymes

- AIEC** Escherichia coli invasive-adhérent. 10
- ASCA** Anticorps anti-Saccharomyces Cerevisiae. 20
- CLR** C-type lectin-like receptors. 14
- GWAS** Genome-Wide-Association. 9, 20, 30, 79
- IgA** Immunoglobuline A. 14, 16, 20
- IgG** Immunoglobuline G. 20
- LPS** lipopolysaccharide. 14, 20
- MAdCAM** mucosal addressin cell adhesion molecule. 16
- MC** maladie de Crohn. ix, xi, 3, 6–12, 18–20, 22, 27–31, 52, 53, 55, 62, 65, 67, 68, 74–80
- MICI** Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin. 3, 6, 7, 11, 19, 27, 52
- NLR** NOD-like receptors. 14, 21, 69, 74, 78
- OR** Odd Ratio. 9, 21, 30
- PAMP** pathogen associated molecular pattern. 14
- PCR** Polymerase Chain Reaction. 55
- PRR** pattern recognition receptor. 14
- RCH** rectocolite hémorragique. 3
- RLR** RIG-I-like receptors. 14
- RMSD** Root-Mean-Squared Deviation. 57, 58, 62, 65, 75
- SNP** Single Nucleotide Polymorphism. 75
- Th1** cellule T helper-1. 10, 17, 20

**Th17** cellule T helper-17. [17](#), [20](#)

**Th2** cellules T helper-2. [17](#), [20](#)

**TLR** Toll-like receptors. [14](#)

**Treg** cellules régulatrices T. [17](#), [20](#)

**WES** Whole Exome Sequencing. [xi](#), [55](#), [62](#), [67](#), [68](#)

# Annexe C

## Glossaire

**Syndrome d'Angelman** Le syndrome d'Angelman est un trouble grave du développement neurologique dont l'origine est génétique. [68](#)





Le gène *NOD2*, impliqué dans les réponses immunitaires innées contre le peptidoglycane bactérien, est étroitement associé à la maladie de Crohn (MC) avec des Odds Ratio (OR) allant de 3 à 36 selon le génotype et a été initialement identifié par des analyses de liaisons génétiques. Les données des familles multiplexes (familles définies par la présence de trois ou plus de trois apparentés au premier degré atteints de MC) issues du registre EPIMAD ont été analysées. Il a été précédemment rapporté que dans les 22 familles multiplexes EPIMAD génotypées pour les 3 mutations majeures du gène *NOD2* : R702W, G908R et L1007fs, pouvait expliquer la fréquence élevée de MC dans ces familles. Cependant, quelques familles multiplexes EPIMAD ne présentaient aucune de ces mutations R702W, G908R et L1007fs. Afin d'identifier de nouvelles variations génétiques ayant un effet majeur dans la MC, un protocole de Whole Exome Séquencing (WES) a été effectué sur l'une de ces familles multiplexes EPIMAD (F49M) présentant quatre sujets atteints de MC sur deux générations. Une variation rare du gène *NOD2*, N1010K, s'est avérée présente chez tous les patients atteints et absente chez tous les sujets contrôles intrafamiliaux. L'évaluation *in silico* et la modélisation 3D ont mis en évidence un effet délétère hautement probable de la mutation de N1010K suggérant donc fortement qu'elle pourrait être un nouveau facteur de risque majeur impliqué dans la susceptibilité génétique à la maladie de Crohn. Elle pourrait expliquer l'agrégation familiale de la MC dans la famille analysée. La présence d'une maladie plus sévère chez les patients hétérozygotes composites N1010K/L1007fs plaide en faveur de l'effet délétère de la mutation N1010K. En plus de la caractérisation d'une nouvelle mutation rare du gène *NOD2*, 2 autres variants potentiels ont été identifiés : les mutations D359H et G33V respectivement des gènes *BPIFB2* et *DEFB132*. Les protéines codées par ces gènes sont impliquées dans les mêmes voies de signalisation : la voie de signalisation des défensines ainsi que dans celle du système immunitaire inné. L'évaluation *in silico* des effets de ces mutations a mis en évidence un effet délétère hautement probable pour D359H et G33V des gènes *BPIFB2* et *DEFB132*. Ainsi, on peut supposer que bien que les deux mutations D359H du gène *BPIFB2* et G33V du gène *DEFB132*, soient localisés sur deux gènes différents impliquées dans les mêmes voies de signalisation, elles pourraient agir ensemble et conduire à un effet dysfonctionnel cumulatif impliqué également dans l'agrégation familiale de la MC dans la famille F49M. Ainsi, Pour la famille F49M, l'agrégation familiale pourrait reposer sur l'accumulation de plusieurs mutations à effet délétère (N1010K, D359H et G33V).

The *NOD2* gene, involved in innate immune responses, has been found to be highly associated with Crohn's Disease (CD). EPIMAD multiplex families with three or more CD-affected members were previously reported to be related to a high frequency of *NOD2* gene mutations: R702W, G908R, and L1007fs. However, some rare EPIMAD CD multiplex families were described without any of the common *NOD2* linked-to-disease mutations. In order to identify new genetic variation(s) with a major effect in CD, whole exome sequencing was performed on available subjects in a multiplex family (F49M), without known common *NOD2* mutations and comprising four patients affected with Crohn's disease and three unaffected related subjects on two generations. A rare and, not yet, reported missense mutation of the *NOD2* gene, N1010K, was detected and co-segregated across affected patients (present in all members affected with CD and absent in all unaffected familial control subjects). *In silico* evaluation of the deleterious effect of the mutation and 3D modelling highlighted evidences for an adverse effect of the N1010K mutation with regard to the function of the *NOD2* protein and the genetic risk of CD. Moreover, N1010K and L1007fs as a compound heterozygous state in two, more severe CD family members strongly suggests that N1010K could be a new risk factor involved in Crohn's disease genetic susceptibility. In addition to the characterization of a new rare mutation of the *NOD2* gene, 2 other potential variants have been identified: the D359H and G33V mutations, respectively, in the *BPIFB2* and *DEFB132* genes. The proteins encoded by these genes are involved in the same pathways: the pathway of defensins and the pathway of the innate immune system. *In silico* evaluation of the deleterious effect of mutations revealed a potential deleterious effect of D359H and G33V mutations. Thus, we could hypothesize that although the two mutations D359H and G33V are located on two different genes but involved in the same signaling pathways, they could act together and determine a cumulative dysfunctional effect also involved as determinants of the familial aggregation of Crohn's disease in family F49M. Thus, for the F49M family, familial aggregation could be based on the accumulation of several deleterious mutations (N1010K, D359H and G33V).