

Bulletin et Mémoires de l'Académie royale de Médecine de Belgique

Séance publique du 23 octobre 2010

P. Meda

**Communications cellulaires et régulation
des cellules à insuline**

*
* *

Séance publique du 27 novembre 2010

D. Franchimont et E. Louis

Génétique des maladies inflammatoires intestinales

S. Saussez

**Cancers des voies aéro-digestives supérieures :
incidence élevée en Belgique, nouveau facteur
de risque et perspectives thérapeutiques**

*
* *

Séance publique du 18 décembre 2010

M. Georges

**Recent Advances in Deciphering the Genetic
Architecture of Inherited Predisposition
to Inflammatory Bowel Disease (IBD)
and Other Common Complex Pathologies**

J.-J. Cassiman

**Quality Genetic Services for the Population,
Now and in the Future**

*
* *

VOLUME 165/ANNÉE 2010

N^{os} 10-11-12

PÉRIODIQUE MENSUEL

NE PARAISSANT PAS EN AOÛT

PALAIS DES ACADEMIES
1000 BRUXELLES

Séance publique du 23 octobre 2010

SÉANCE PUBLIQUE DU 23 OCTOBRE 2010

Au Bureau : M. L. Hue, Président ; MM. J. Frühling, Secrétaire perpétuel, P.-P. Pastoret et W.J. Malaisse, premier et second vice-présidents.

Sont présents :

MM. A. Govaerts, A. André, Th. Godfraind, J. van der Stricht, J. Christophe, P. Vanderhoeft, M. Abramow, J.E. Dumont, Ch. van Ypersele de Strihou, G. Franck, J.-J. Vanderhaeghen, P. Lefèbvre, A. Dresse, M. Wéry, membres honoraires ;

MM. J. Brotchi, J.-B. Otte, L. Angenot, R. Lauwerys, G. Rousseau, U. Gaspard, Th. de Barsy, J. Fissette, G. Rorive, J. Boniver, J.-L. Vanherweghem, J.-M. Boeynaems, L. Delattre, J. Melin, M. Parmentier, B. Van den Eynde, P. Van Cangh, R. Kramp, J.D. Born, A. Ferrant, J. Nève, J.-C. Henquin, M^{me} F. Meunier, membres titulaires ;

MM. J. Content, E. Van Schaftingen, F. Houssiau, S. Louryan, E. Sokal, Y. Carlier, M^{me} J. Fontaine, MM. A. Albert, P. Maquet, J.-M. Maloteaux, B. Lengelé, Ch. Delloye, P. Scalliet, P. Coulie, D. Giet, M^{me} A. Noël, MM. R. Reding, J.-C. Renauld, membres ordinaires.

*
* *

MM. R. Görtz, E.H. Betz, J. Bonnal, L. Molle, P. Dumont, P.-J. Kestens, membres honoraires ; M. Lamy, G. Vassart, G. Fillet, R. Limet, M^{me} J.-A. Stiennon-Heuson, MM. M. Goldman, J.-C. Schoevaerds, M^{me} F. Portaels, MM. J.-F. Beckers, Y. Pirson, M^{me} D. Balériaux, M. A. Scheen, membres titulaires ; J. Crommen, R. Vanwijck, J.-C. Pector, J. Klastersky, M. Crommelinck, O. Devuyt, G. Casimir, E. Constant, M. Hamoir, membres ordinaires, ont exprimé leurs regrets de ne pouvoir assister à la séance.

*
* *

Lectures

I

COMMUNICATIONS CELLULAIRES ET RÉGULATION DES CELLULES À INSULINE

par

P. MEDA (Département de Physiologie cellulaire et Métabolisme – Genève) (*)

1. Introduction

L'apparition des organismes multicellulaires, il y a de cela quelques 800 millions d'années, a impliqué le développement de divers mécanismes de communication électrique et chimique par lesquels chaque cellule est informée de l'activité des autres cellules et module en conséquence son propre fonctionnement (1). Chez les vertébrés, l'un des mécanismes qui a été conservé tout au long de l'évolution, dépend des connexines (1-5). Plusieurs éléments suggèrent un rôle important de ces protéines : ainsi celles-ci sont exprimées dans tous les tissus de tissus animaux, plusieurs changements quantitatifs et qualitatifs dans l'expression de connexines individuelles induisent des phénotypes cellulaires spécifiques aussi bien *in vitro* que dans des modèles animaux et de nombreuses mutations des gènes des connexines sont associées à des pathologies humaines invalidantes (2, 4). Néanmoins, les fonctions physiologiques et patho-physiologiques des connexines n'ont pu être démontrées que dans de rares cas (2, 4, 5).

Pour aborder cette question, nous avons étudié l'expression et le fonctionnement des connexines dans les cellules à insuline qui produisent l'insuline au sein des îlots pancréatiques. Le choix de ce modèle a été dicté par plusieurs considérations, dont le rôle central des cellules β dans la maladie diabétique, les incertitudes quant aux mécanismes qui déterminent la caractéristique unique de ces cellules, à savoir leur capacité d'augmenter la sécrétion d'insuline en réponse à une augmentation de la concentration du glucose environnant, et le fait que cette sécrétion excède largement les capacités de production hormonale de cellules individuelles et est toujours modulée de façon oscillatoire (6, 7). Cet article résume nos observations.

(*) Invité par le Bureau en vertu de l'article 15 §3 du Règlement.

2. Les connexines

Le génome de mammifère comprend 21 gènes, distribués sans regroupement apparent sur de nombreux chromosomes (<http://www.genenames.org/genefamily/gj.php> et <http://www.informatics.jax.org>), mais présentant tous une structure similaire, avec la région codante le plus souvent ininterrompue dans un seul exon, et des sites d'épissage alternatif (2, 3). Le contrôle de ces gènes reste peu étudié. Chaque gène code pour une isoforme protéique différente, qui est synthétisée et transportée dans les cellules comme d'autres protéines intégrales de la membrane cellulaire. La topographie de toutes les connexines est similaire, avec quatre domaines traversant la membrane, une boucle et les deux extrémités cytosoliques et deux boucles extracellulaires. La séquence primaire a été fortement conservée dans tous ces domaines, sauf au niveau de la boucle cytosolique et de l'extrémité C terminale, qui différencient les diverses isoformes. Les connexines ne sont pas glycosylées. Certaines d'entre elles peuvent être phosphorylées (2, 3).

Au cours de leur transit dans le cytoplasme, six connexines oligomérisent pour former une structure tubulaire, le connexon, qui délimite un espace hydrophile. Les connexons sont insérés dans la membrane plasmique. La plupart se concentrent ensuite dans les jonctions intercellulaires de type gap, où l'espace extracellulaire est fortement réduit. Dans ces régions, les connexons d'une cellule s'alignent avec ceux de la cellule voisine pour établir des canaux qui relient les deux cytoplasmes, en pontant l'espace extracellulaire. Ces canaux ont deux propriétés uniques : ce sont des structures bicellulaires et ils sont perméables aussi bien à des ions porteurs de courant qu'à des molécules plus larges, qui incluent beaucoup de métabolites, les nucléotides, des cofacteurs vitaminiques, de petits fragments de peptides ou d'acides nucléiques (2-4). Le passage de ces molécules d'une cellule à l'autre se fait le long d'un gradient électrochimique et peut être bidirectionnel. La conductance des canaux gap aux ions porteurs de courant, ainsi que la perméabilité aux autres molécules varient selon le type de connexine. Comme les autres canaux membranaires, les canaux gap sont régulés entre un état d'ouverture (environ 10 % du temps) et de fermeture (2-4). Les mécanismes physiologiques qui assurent cette régulation sont encore peu connus. Les connexines peuvent aussi former des connexons non appariés, qui sont insérés dans des régions non jonctionnelles de la membrane cellulaire pour former des « hémicanaux », au travers desquels les cellules peuvent libérer dans le milieu extracellulaire des molécules signal (ATP, glutamate...) et/ou incorporer ces molécules (3). Les connexines peuvent aussi assurer un rôle de signalisation en modifiant l'expression de gènes spécifiques, ou en interagissant avec d'autres protéines cytosoliques ou membranaires, qui seront alors responsables des effets biologiques (2).

Les connexines ont de multiples rôles dans l'homéostasie cellulaire, au cours du développement et dans le fonctionnement des cellules adultes, notamment en modulant la différenciation cellulaire, la morphogenèse des tissus, la contraction musculaire, la transmission hormonale, la résistance à de multiples agressions, les sécrétions endocrines et exocrines et en compensant des différences du métabolisme (1, 2, 4). Ces fonctions

ont été validées par l'étude d'animaux déficients et/ou surexprimant des connexines spécifiques. L'importance de ces fonctions est confirmée par le nombre croissant de maladies humaines qui peuvent être attribuées à des mutations ou des polymorphismes de nucléotides individuels des gènes codant pour ces protéines (1, 2, 4).

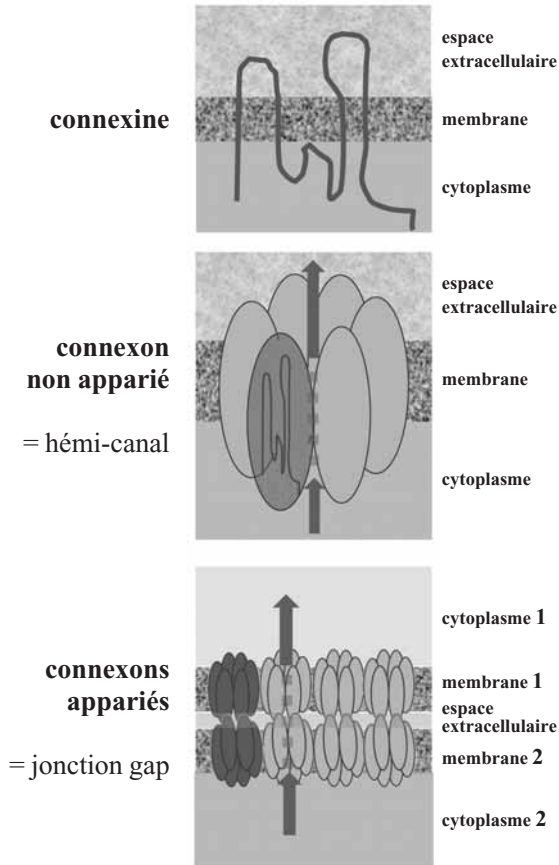


Fig.1

Les connexines forment des canaux membranaires. (*Panneau du haut*) Les connexines sont des protéines non glycosylées qui traversent à quatre reprises la membrane cellulaire, pour exposer leurs extrémités dans le cytosol et une boucle dans l'espace extracellulaire. (*Panneau du milieu*) Six connexines oligomérisent autour d'un espace hydrophile pour former un connexon. Ces structures sont insérées dans des régions non jonctionnelles de la membrane cellulaire pour former des « héli-canaux » qui permettent l'efflux contrôlé d'ATP, de glutamate et d'autres molécules cytosoliques. (*Panneau du bas*) L'appariement bout à bout des connexons formés par deux cellules adjacentes forme des canaux intercellulaires qui se concentrent dans les jonctions gap et permettent l'échange entre cellules voisines d'ions et de métabolites de faible poids moléculaire.

3. Les cellules à insuline

Les cellules β qui produisent l'insuline sont groupées au sein des îlots pancréatiques qui, collectivement, constituent le pancréas endocrine ($\sim 1\%$ du volume pancréatique ou 1 g de tissus frais) (1, 6, 7). *In vivo*, cet organe est stimulé par des nutriments, principalement le glucose, et modulé par les hormones gastro-intestinales (surtout gastric inhibitory peptide, glucagon-like peptide 1, cholécysto-kinine et somatostatine) et le système nerveux autonome. A tout moment, la sécrétion d'insuline est un processus multicellulaire assurant une libération hormonale cyclique et continuellement adaptée aux besoins de l'organisme, qui changent en fonction de l'état nutritionnel et de l'activité physique. Ces conditions impliquent une coordination d'abord entre les nombreux ($\sim 10^6$ dans le pancréas humain normal) îlots de Langerhans d'un même pancréas, ce qui est réalisé par le système nerveux autonome, puis entre les 50-3000 cellules β qui forment chaque îlot (1, 6, 7). Cette dernière communication fait intervenir des mécanismes multiples, dépendant de ligands-récepteurs de surface, de molécules d'adhésion cellulaire, des molécules d'adhésion à la matrice extra-cellulaire. Cependant, l'abolition *in vitro* de ces systèmes de régulation n'abolit pas la stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose, qui est la caractéristique unique des cellules β . A l'inverse, cette stimulation est rapidement perdue lorsque les cellules β sont isolées des cellules voisines et cet effet est réversible lorsque ce contact est rétabli (1, 7). Parmi les mécanismes qui pourraient expliquer ce phénotype, nous avons étudié la possibilité qu'une régulation cruciale soit due au connexines.

Les cellules β sont reliées par des jonctions gap formées de Cx36 (8). Cette connexine forme des canaux de petite conductance (10-15 pS) et sélectivement perméables à des molécules chargées positivement, qui sont néanmoins suffisants pour assurer un couplage électrique de la plupart des cellules au sein de chaque îlot de Langerhans et un couplage métabolique de celles-ci en multiples petits territoires (1, 2, 7). La perte de la Cx36 cause le découplage électrique des cellules β , la perte de la synchronisation intercellulaire des oscillations calciques induites au cours d'une stimulation par le glucose et l'interruption du transfert d'une cellule à l'autre de courants électrotoniques excitateurs et inhibiteurs (9-11). Les canaux de Cx36 permettent un échange diffusionnel et bidirectionnel de nombreuses molécules cytosoliques, un mécanisme qui résulte dans l'équilibration de gradients électro-chimiques d'ions et de métabolites entre les cellules β , qui sont fonctionnellement hétérogènes (4, 7). Ce mécanisme permet de promouvoir le recrutement de cellules actives, en cas de besoins augmentés en insuline (4, 5).

Après isolation, les cellules β montrent une augmentation de la sécrétion basale d'insuline et une perte de la capacité de répondre à une augmentation du glucose environnant par une augmentation de la libération d'insuline, de l'expression de cette hormone et des taux de calcium cytosolique. Le rétablissement des contacts intercellulaires rétablit un fonctionnement normal et assure un recrutement accru de cellules actives du point de vue sécrétoire et biosynthétique. Des observations analogues ont été faites avec des îlots ou des pancréas intacts, après exposition à des composés bloquant les canaux gap (1, 7) et dans des animaux déficients en Cx36, soit dans tous les tissus concernés

(îlots pancréatiques, système nerveux central et autonome, rétine et médullosurrénale), soit seulement au niveau des cellules β (5). Les anomalies de la sécrétion d'insuline observées dans ces animaux (augmentation de la sécrétion basale, perte des oscillations de l'insuline et de la stimulation par le glucose, mais pas par des sécrétagogues non métabolisés) rappellent les altérations observées en clinique humaine dans les cas de prédiabète ou de diabète de type 2 (1, 6). La perte de la Cx36 sensibilise aussi les cellules β aux effets de drogues cytotoxiques et des cytokines qui induisent l'apoptose des cellules β au début du diabète de type I. Au contraire, l'expression accrue de Cx36 protège les cellules β contre ces agressions (12). Le mécanisme impliqué est partiellement dû à l'augmentation du couplage des cellules β au sein des îlots de Langerhans.

L'expression de Cx36 et de couplage entre les cellules β d'îlots pancréatiques humains (13) et la position du gène (*Gjd2*) qui code pour cette connexine dans la région q14 du chromosome 15, qui est un site de susceptibilité pour le diabète de type 2, ouvrent la possibilité que la Cx36 soit impliquée dans le développement ou le maintien de la maladie diabétique (1). Des études de tout le génome indiquent qu'un polymorphisme dans l'exon 2 du gène *Gjd2* est associé à des sous-populations de diabétiques montrant une sécrétion résiduelle d'insuline particulièrement faible et présentant un risque accru de maladies cardio-vasculaires. Ces considérations ouvrent la perspective que des interventions visant à augmenter l'expression de la Cx36 et/ou le fonctionnement de cette protéine pourraient être bénéfiques dans le traitement de la maladie diabétique.

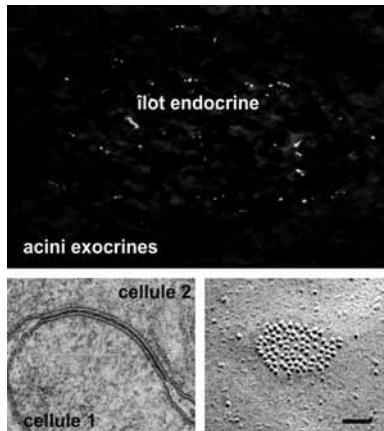


Fig. 2

La Cx36 forme les canaux gap des cellules à insuline. (Panneau du haut) Des anticorps dirigés contre l'extrémité C de la Cx36 révèlent la distribution punctiforme (blanc) de cette connexine entre les cellules à insuline d'un îlot pancréatique. (Panneau du bas gauche) L'analyse par microscopie électronique de l'une de ces régions, montre l'apposition régulière et étroite des membranes de deux cellules adjacentes, qui caractérise les jonctions gap. (Panneau du bas droite) La cryofracture d'une de ces jonctions démontre la concentration locale de connexons au sein d'un feuillet lipidique de la membrane cellulaire. Barre de grossissement = 12 μm dans le panneau du haut et 20 nm dans les deux autres panneaux.

Remerciements

Le travail de notre équipe est rendu possible par des subsides du Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique (310000-122423, 310000-109402, CR3213_129987), la Juvenile Diabetes Research Foundation (1-2007-158) et l'Union Européenne (BETAIMAGE 222980 ; IMIDIA, C2008-T7).

RÉSUMÉ

L'apparition d'organismes multicellulaires a impliqué le développement de plusieurs mécanismes de communication permettant aux cellules de fonctionner de façon coordonnée. L'un des mécanismes présents dans tous les tissus des vertébrés est assuré par les protéines de la famille des connexines. Ces protéines intégrales de la membrane forment des canaux qui permettent le passage de molécules cytosoliques, soit entre cellules adjacentes, soit entre le cytosol de ces cellules et le milieu extracellulaire. Nous avons identifié la connexine 36 (Cx36) comme étant la seule connexine qui relie fonctionnellement (« couple ») les cellules β qui produisent l'insuline dans les îlots pancréatiques. Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont montré que la Cx36 et/ou les communications intercellulaires qu'elle permet, joue(nt) un rôle dans le contrôle de la sécrétion d'insuline et dans la résistance des cellules β contre diverses agressions, notamment celles induites par les cytokines impliquées dans le diabète. Un polymorphisme du gène de la Cx36 est associé à certaines formes de diabète humain, ouvrant la possibilité qu'une thérapie ciblant cette protéine pourrait être utile dans le traitement de la maladie diabétique.

SUMMARY

The appearance of multicellular organisms implicated the development of several mechanisms of communication, which permit the cells to function in coordination. One of the mechanisms found in all tissues of vertebrates is ensured by the proteins of the connexin family. These integral membrane proteins form channels, which allow for the passage of cytosolic molecules either between adjacent cells or between the cytosol of these cells and the extracellular environment. We have identified connexin 36 (Cx36) as the sole connexin that functionally links ("couples") the β -cells which produce insulin within pancreatic islets. *In vitro* and *in vivo* experiments have shown that Cx36 and/or the intercellular communications to allow play a role in the control of insulin secretion as well as in the resistance of β -cells against various aggressions, including those induced by the cytokines that are implicated in diabetes. A polymorphism of Cx36 gene is associated to certain forms of human diabetes, opening the possibility that a therapy targeting this protein may be useful in the treatment of diabetic diseases.

BIBLIOGRAPHIE

1. BOSCO D., HAEFLIGER J.A. ET MEDA P., *Connexins : key mediators of endocrine function*, *Physiol. Rev.* in press (2011).
2. HARRIS A., LOCKE D., *Connexins : a Guide*, The Humana Press Inc., Totowa, NJ, (2008).
3. SCEMES E., SPRAY D.C., MEDA P., *Connexins, pannexins, innexins : novel roles of « hemi-channels »*. *Pflugers Arch.*, 457, 1207-1226 (2009).
4. MEDA P., *Spray DC. Gap junction function*, *Adv. Mol. Cell., Biol* 30, 263-322 (2000).
5. MICHON L., NLEND NLEND R., BAVAMIAN S., BISCHOFF L., BOUCARD N., CAILLE D., CANCELA J., CHAROLLAIS A., CHARPANTIER E., KLEE P., PEYROU M., POPULAIRE C., ZULIANELLO L., MEDA P., *Involvement of gap junctional communication in secretion.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1719, 82-101 (2005).
6. TENGHOLM A., GYLFE E., *Oscillatory control of insulin secretion*, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 297, 58-72 (2009).

7. BAVAMIAN S., KLEE P., BRITAN A., POPULAIRE C., CAILLE D., CANCELA J., CHAROLLAIS A., MEDA P., *Islet-cell-to-cell communication as basis for normal insulin secretion.*, Diabetes Obes Metab., 9 Suppl. 2, 118-132 (2007).
8. SERRE-BEINIER V., LE GURUN S., BELLUARDO N., TROVATO-SALINARO A., CHAROLLAIS A., HAEFLIGER J.A., CONDORELLI D.F., MEDA P., *Cx36 preferentially connects beta-cells within pancreatic islets*, Diabetes, 49, 727-734 (2000).
9. CALABRESE A., ZHANG M., SERRE-BEINIER V., CATON D., MAS C., SATIN L.S., MEDA P., *Connexin 36 controls synchronization of Ca²⁺ oscillations and insulin secretion of MIN6 cells*, Diabetes, 52, 417-424 (2003).
10. SPEIER S., GJINOVCI A., CHAROLLAIS A., MEDA P., RUPNIK M., *Cx36 – mediated coupling reduces beta-cell heterogeneity, confines the stimulating glucose concentration range and affects insulin release kinetics*, Diabetes 56,1078-1086 (2007).
11. RAVIER M.A., GULDENAGEL M., CHAROLLAIS A., GJINOVCI A., CAILLE D., SOHL G., WOLLHEIM C.B., WILLECKE K., HENQUIN J.C., MEDA P., *Loss of connexin36 channels alters beta-cell coupling, islet synchronization of glucose-induced Ca²⁺ and insulin oscillations, and basal insulin release*, Diabetes, 54, 1798-1807 (2005).
12. ALLAGNAT F., KLEE P., PEYROU M., MARTIN D., CHAROLLAIS A., CAILLE D., HAEFLIGER J.A., MEDA P., *The gap junctional protein Connexin36 (Cx36) protects pancreatic beta cells against cytotoxic attacks : a possible role in cytokine-mediated beta cell death*, Diabetologia, 50, S45-S45 (2007).
13. SERRE-BEINIER V., BOSCO D., ZULIANELLO L., CHAROLLAIS A., CAILLE D., CHARPANTIER E., GAUTHIER B.R., DIAFERIA G.R., GIEPMANS B.N., LUPI R., MARCHETTI P., DENG S., BUHLER L., BERNEY T., CIRULLI V., MEDA P., *Cx36 makes channels coupling human pancreatic beta-cells, and correlates with insulin expression.*, Hum. Mol. Genet., 18, 428-43 (2009).

[Département de Physiologie Cellulaire et Métabolisme, Université de Genève, Faculté de Médecine, Genève, Suisse (paolo.meda@unige.ch)].

*

* *

Discussion

M. P. Lefèbvre. – Toutes mes félicitations, cher Paolo, pour cette superbe lecture. J'ai suivi votre travail de ces dernières décennies avec admiration. C'est à juste titre que vous considérez la cellule β des îlots de Langerhans au cœur de la pathogénie du diabète. Cela était connu de longue date pour le diabète de type 1 mais il est maintenant bien admis que le déficit progressif de la sécrétion d'insuline joue un rôle déterminant dans le diabète de type 2. Vos observations sur le rôle d'un système de connexion des cellules β pour une libération d'insuline en temps opportun, de manière suffisante et de façon pulsatile, sont fascinants. Toutefois, vous n'ignorez pas que l'îlot de Langerhans est un microcosme où cohabitent non seulement les cellules β productrices d'insuline mais encore les cellules A qui produisent le glucagon, les cellules D la somatostatine et les cellules PP le polypeptide pancréatique. Dans le diabète, on observe non seulement un déficit de sécrétion insulinaire mais encore, de façon tout à fait constante, une sécrétion excessive de glucagon. Les travaux que nous avons menés avec l'équipe de Butler à Los Angeles suggèrent que l'hypersécrétion de glucagon est la conséquence de la dérégulation de la sécrétion pulsatile d'insuline au sein même des îlots de Langerhans (Meier J.J., Kjems L.L., Veldhuis J.D., Lefèbvre P.J. et Butler P.C., *Postprandial suppression of glucagon secretion depends upon intact pulsatile secretion : Further evidence for the intraislet insulin hypothesis*. Diabetes 2006,55, 1051-1056). Dans un travail très récent publié dans PNAS, Unger et Orci ont créé le néologisme de « paracrinologie » et considéré que le diabète est une « paracrinopathie » [Unger R.H. et Orci L., *Paracrinology of islets and the paracrinopathy of diabetes*. Proc.Natl.Acad. Sci.USA 2010 (pnas 1006639107)]. Dans ce contexte, je serais intéressé de savoir ce qu'il en est aujourd'hui de la nature et de l'importance des connexions au sein des îlots de Langerhans entre les cellules β , productrices d'insuline, et les cellules A, productrices de glucagon. Déjà un grand merci.

M. P. Meda. – Merci pour vos commentaires et votre pertinente question. À ce jour, nous avons pu montrer que la connexine 36 n'est pas exprimée par les cellules alpha, qui produisent le glucagon, dans un modèle de souris transgéniques où les îlots pancréatiques ne contiennent que ce type de cellule endocrine. Par ailleurs, nous n'avons pas pu obtenir une preuve convaincante qu'il existerait des communications dues à une autre connexine entre cellules bêta et alpha. Par contre, des communications paracrines sont plus que probables entre ces cellules. Celles-ci pourraient inclure la libération de seconds messagers traversant la membrane cellulaire au travers des « hémi-canaux » formés par les pannexines.

M. J.-C. Henquin. – Ma première question prolonge celle du Professeur Pierre Lefèbvre. Elle concerne les anomalies de fonctionnement des îlots de Langerhans chez les patients atteints d'un diabète de type 2. As-tu eu l'occasion de vérifier directement, soit sur coupes histologiques, soit sur des îlots isolés, si l'abondance en connexine 36 était diminuée ? Une difficulté supplémentaire peut être liée à une plus grande hétérogénéité dans la composition des îlots chez les patients comparativement à des sujets non diabétiques.

Ma deuxième question concerne les expériences de couplage de cellules bêta *in vitro*. Lorsque la paire est composée d'une cellule préalablement active et d'une cellule préalablement inactive, la sécrétion d'insuline est si fortement augmentée que la cellule inactive a dû être amenée à répondre. Est-ce le résultat d'un simple couplage électrique ou aussi d'un couplage métabolique ? En d'autres termes, y-a-t-il un transfert de métaboliques ou de cofacteurs comme par exemple des nucléotides ? Sait-on si l'état métabolique de la cellule inactive est modifié par le couplage ?

M. P. Meda. – Deux questions critiques, en effet. Nous avons pu étudier l'expression du gène de la connexine 36 dans des îlots pancréatiques isolés de donneurs d'organes et de diabétiques de type 2. Nous avons observé une très grande dispersion des niveaux d'expression, possiblement à cause de nombreuses différences dans les protocoles de préparations des îlots et/ou de l'ARN. De ce fait, nous n'avons pas pu démontrer une diminution de la connexine 36 dans les îlots diabétiques. Par contre, nous avons observé que l'expression de la connexine est corrélée à celle du gène de l'insuline.

Je ne peux malheureusement que répondre partiellement à l'importante deuxième question. Le transfert entre deux cellules de traceurs d'environ 300 Da, qui ne peuvent franchir la membrane cellulaire, suggère qu'il pourrait y avoir un couplage métabolique. Cependant, les molécules endogènes qui pourraient assurer ce couplage doivent encore être identifiées.

M. J.-L. Vanherweghem. – Je voudrais d'abord vous féliciter non seulement pour l'excellence scientifique de votre travail mais aussi pour votre talent pédagogique qui a permis à des personnes connues, comme moi, pour être à des années-lumière de la biologie moléculaire de la connexion intercellulaire, d'avoir l'impression de comprendre.

Je voudrais vous poser une question sans doute naïve : les connexines jouent-elles un rôle dans un phénomène plus général qui est celui de l'hyperplasie des glandes endocrines, je pense, par exemple, à l'hyperphasie chronique ? Ainsi, les connexines pourraient-elles contribuer au recrutement cellulaire ?

M. P. Meda. – Merci pour vos commentaires. La possibilité que vous envisagez est sûrement plausible car les connexines sont exprimées dans tous les types de glandes exocrines et endocrines et jouent un rôle régulateur dans la prolifération de plusieurs types de cellules non sécrétrices.

M. J.E. Dumont. – Félicitations pour un superbe travail. Une question naïve : la différence principale entre les connexines chez les animaux normaux est le remplacement d'une sécrétion d'insuline épisodique importante par une sécrétion modérée continue. Le système en aval se comporte-t-il comme celui des récepteurs GNRH de l'hypophyse qui sont activés par une sécrétion épisodique de GNRH mais complètement éteints par une stimulation continue ?

M. P. Meda. – Merci pour votre commentaire et votre intéressante analogie. En effet, sur base des données de la littérature, on doit s'attendre à ce qu'une élévation chronique

de la sécrétion basale d'insuline, comme celle observée chez les souris invalidées pour le gène de la Cx36, entraîne une diminution des récepteurs à l'hormone dans les tissus cibles.

M. L. Hue. – « Merci pour votre lecture particulièrement intéressante. Dans votre exposé, vous proposez qu'une diminution de l'activité de l'AMPK (AMP-activated protein kinase) pourrait être bénéfique en préservant la connexine 36. Or les données de la littérature indiquent que les animaux dépourvus d'AMPK ont une tendance à développer un diabète, ce qui est en contradiction avec votre hypothèse. Pourriez-vous commenter cette contradiction ? »

M. P. Meda. – Merci M. le Président pour votre intérêt. Votre question est évidemment à la fois nécessaire et provocante. Comme vous le savez, l'AMPK joue un rôle central dans la régulation du métabolisme par une multitude d'actions, non seulement au niveau des cellules productrices d'insuline, mais aussi de plusieurs autres tissus. L'influence relative de ces actions sur les altérations glycémiques qui sont observées après invalidation globale du gène codant pour l'une des sous-unités de l'enzyme n'est pas encore établie. Il reste donc à démontrer si ces altérations sont incompatibles avec l'hypothèse de travail que nous souhaitons tester. Sur base d'expériences montrant que l'activation de l'AMPK décroît l'expression de la Cx36, nous postulons en effet qu'une inhibition sélective des isoformes de l'AMPK exprimées dans les cellules bêta pancréatiques permettrait de faciliter l'effet positif de la Cx36, à la fois sur la sécrétion d'insuline et sur la résistance des cellules bêta à des conditions cytotoxiques.

M. B. Lengelé. – En me joignant aux commentaires élogieux déjà exprimés par les membres de la compagnie, je voudrais ajouter à mon admiration pour le caractère pédagogique de votre présentation de très haute teneur scientifique, le plus grand respect qu'inspire votre modestie et votre humilité dans l'analyse de vos résultats. Ma question porte sur la haute fréquence clinique que vous avez montrée des manifestations cutanées chez les patients déficients en connexines. Pouvez-vous nous éclairer dès lors sur le rôle que jouent les connexines dans la peau ?

M. P. Meda. – Merci encore une fois pour votre invitation à présenter notre recherche à votre Académie, que je considère comme un honneur et un privilège. La situation dans l'épiderme est compliquée par le fait que chaque kératinocyte exprime à la fois au moins neuf isoformes différentes de connexines, desquelles chacune forme des canaux intercellulaires qui diffèrent par leurs propriétés biophysiques et régulatrices de ceux formés par les autres isoformes. Dans ce contexte, l'inactivation spontanée (clinique) ou expérimentale de connexines individuelles, a montré que certaines connexines contrôlent la prolifération des kératinocytes alors que d'autres sont essentielles pour leur différenciation et/ou leur survie. Les mécanismes impliqués sont encore peu compris, entre autres parce que beaucoup de mutations invalidant diverses connexines résultent en des phénotypes cliniques assez similaires, combinant le plus souvent une hyperkératose à des dysplasies ectodermiques.

*

* *

Communications du Bureau et correspondance

Aux communications du Bureau, le Secrétaire perpétuel annonce que le Pr. M. Wéry, qui a passé le cap des 75 ans, a accédé à l'honorariat et souhaite garder son droit de vote.

Il annonce ensuite la parution du livre de prestige « AEDES Academiaram ». Il signale que ce livre sera remis en tant que récompense à chaque membre étranger qui occupera la tribune de notre Compagnie. Ce livre est accessible pour la somme de 20 euros pour les membres de la Compagnie.

Comité secret

L'Académie se forme en « Comité secret » et prend connaissance du premier tour de scrutin pour l'élection du Secrétaire perpétuel. Le Pr. A. Ferrant a obtenu 29 voix, les Professeurs J. Brotchi et G. Vassart ont obtenu sept voix. Les Professeurs L. Hue, J. Melin et Y. Pirson, cinq voix. À ce jour, le Pr. A. Ferrant a atteint *de facto* la majorité des voix pour être élu Secrétaire perpétuel à partir d'octobre 2011, cependant les Statuts prévoient qu'un deuxième tour obligatoire ait lieu.

*
* *

Elle prend ensuite connaissance du résultat des votes intervenus pour le renouvellement du Bureau pour l'exercice 2011.

Composition du Bureau d'Administration pour l'exercice 2011 :

Président :

M. PASTORET Paul-Pierre,
Professeur émérite à l'Université de Liège ;

Premier vice-président :

M. MALAISSE Willy,
Professeur émérite de l'Université libre de Bruxelles ;

Second vice-président :

M. OTTE Jean-Bernard,
Professeur honoraire à l'Université catholique de Louvain ;

Premier assesseur du Secrétaire perpétuel :

M. FERRANT Augustin,
Professeur ordinaire à l'Université catholique de Louvain ;

Second assesseur du Secrétaire perpétuel :

M. ANGENOT Luc,
Professeur ordinaire à l'Université de Liège ;

Délégué des Correspondants :

M. ALBERT Adelin,
Professeur ordinaire de l'Université de Liège ;

Suppléant du Délégué des Correspondants :

M. CASIMIR Georges,
Professeur ordinaire de l'Université libre de Bruxelles ;

Fait partie du Bureau comme Secrétaire perpétuel :

M. FRÜHLING János,
Professeur honoraire de l'Université libre de Bruxelles.

*
* *

Séance publique du 27 novembre 2010

SÉANCE PUBLIQUE DU 27 NOVEMBRE 2010

Au Bureau : M. L. Hue, Président ; MM. J. Frühling, Secrétaire perpétuel, P.-P. Pastoret et W.J. Malaisse, premier et second vice-présidents.

Sont présents :

MM. H. Beaufay, A. Govaerts, P.-J. Kestens, J. Christophe, P. Vanderhoeft, R. Bernard, M. Abramow, A. Vincent, G. Franck, J.-J. Vanderhaeghen, P. Lefèbvre, A. Dresse, M. Wéry, membres honoraires ;

MM. J. Brotchi, J.-B. Otte, G. Fillet, L. Angenot, R. Lauwerys, M. Hanocq, P.J. Van Houtte, G. Rousseau, Th. de Bary, M^{me} J.-A. Stiennon-Heuson, MM. M. Goldman, G. Rorive, J. Boniver, J.-C. Schoevaerds, G. Meulemans, E. Pays, J.-L. Vanherweghem, L. Delattre, J.-F. Beckers, J. Melin, M. Parmentier, B. Van den Eynde, Y. Pirson, P. Van Canghai, R. Kramp, M^{me} D. Balériaux, MM. A. Ferrant, A. Scheen, J.-L. Balligand, M^{me} Fr. Meunier, membres titulaires ;

MM. J. Content, N. Clumeck, E. Van Schaftingen, D. Lison, S. Louryan, Y. Carlier, J. Klastersky, M. Crommelinck, A. Albert, P. Gustin, O. Devuyt, B. Lengelé, Ch. Delloye, M^{me} D. Bron, MM. G. Casimir, P. Coulie, O. Feron, M. Hamoir, R. Reding, L. Willems, J.-C. Renauld, membres ordinaires.

*

* *

MM. E.H. Betz, J. Bonnal, L. Molle, C. Heusghem, P. Dumont, Th. Godfraind, M. Lechat, Ch. van Ypersele, membres honoraires ; M. Lamy, U. Gaspard, J. Fissette, J.-M. Foidart, J.-C. Henquin, membres titulaires ; J. Crommen, R. Vanwijck, F. Houssiau, E. Sokal, J.-C. Pector, M^{me} M. Piccart, MM. J. Donnez, D. Giet, E. Constant, membres ordinaires, et Ph. Evrard, membre étranger, ont exprimé leurs regrets de ne pouvoir assister à la séance.

*

* *

Lectures

I

GÉNÉTIQUE DES MALADIES INFLAMMATOIRES INTESTINALES

par

D. FRANCHIMONT (U.L.B.) et E. LOUIS (U.Lg.) (*)

1. De la génétique à l'étiopathogénie (D. Franchimont)

Le tube digestif représente la plus large surface (400 m²) de notre organisme, exposée au monde extérieur et directement en contact avec la flore microbienne intestinale et séparée de celle-ci par une seule couche de cellules épithéliales intestinales. Dans un tel environnement, la survie de l'hôte, l'*homo sapiens*, nécessite que cette flore microbienne soit contenue sans trop d'immuno-réactivité vis-à-vis de celle-ci tout en gardant la capacité à développer une réponse immunitaire à l'encontre de bactéries pathogènes. Une telle *discrimination* du système immunitaire digestif demande une très grande interprétation de son microenvironnement.

Il existe au sein de la muqueuse intestinale un état d'homéostasie muqueuse, de tolérance, grâce à des prélèvements continus d'antigènes bactériens et alimentaires, par les cellules épithéliales intestinales, par les cellules épithéliales intestinales spécialisées M (M cells) et par des filopodes de cellules dendritiques de la lamina propria. Ces antigènes bactériens et alimentaires sont alors présentés aux lymphocytes T CD4+ de la lamina propria en l'absence de signaux de costimulation (cytokines ou molécules de surface), de telle manière que ces lymphocytes T restent ou deviennent anergiques vis-à-vis de ces antigènes de la lumière du tube digestif.

Une des observations épidémiologiques les plus marquantes, dans nos pays industrialisés occidentaux, est l'augmentation majeure au cours de ces cinquante dernières années de l'incidence des maladies inflammatoires [parmi lesquelles, la maladie de Crohn (dont l'incidence a triplé), l'asthme, la sclérose en plaques, le diabète de type 1 ou la polyarthrite rhumatoïde]. Cette augmentation d'incidence des maladies inflammatoires était concomitante et parallèle à une diminution de l'incidence des maladies infectieuses. Trente à cinquante ans étant une durée de temps trop courte pour expliquer un changement du pool des gènes de susceptibilité de ces maladies

(*) Invités par le Bureau en vertu de l'article 15 §3 du Règlement.

inflammatoires. Cette augmentation de l'incidence des maladies inflammatoires doit être liée à un facteur environnemental et, plus probablement, à notre mode de vie (et à une amélioration de celui-ci), c'est-à-dire à une meilleure hygiène en même temps qu'une utilisation abusive des antibiotiques et une politique de vaccination optimale.

L'expérimentation animale chez la souris a été d'un très grand apport dans la compréhension des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI). Les études ont montré que toute surexpression (souris transgéniques, TG) ou délétion (souris knock-out, KO) de gènes intervenant dans l'intégrité de l'épithélium intestinal ou le fonctionnement du système immunitaire s'accompagnait d'une inflammation muqueuse intestinale, d'une maladie de Crohn ou colite ulcéreuse expérimentale. Toutefois, ces souris TG ou KO ne développaient pas la maladie si elles étaient élevées dans un milieu stérile, mais développaient à nouveau la maladie une fois retournée dans leur milieu naturel. Ceci démontre, de manière définitive, le rôle majeur de la flore microbienne intestinale dans le développement des MICI.

Ainsi, l'état d'homéostasie muqueuse, de tolérance au sein de la muqueuse intestinale, repose sur l'intégrité de la barrière intestinale (l'épithélium intestinal), le fonctionnement optimal du système immunitaire du tube digestif et une flore microbienne intestinale équilibrée. L'hypothèse actuelle est que les MICI résultent d'une réponse immunitaire inappropriée du système immunitaire digestif vis-à-vis de la flore intestinale chez un individu génétiquement susceptible. Il semble d'ailleurs que cette rupture de tolérance soit à l'origine de nombreuses maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde ou la spondylarthrite ankylosante, la sclérose en plaques ou le diabète de type 1, dont nous verrons plus loin la parenté génétique (voir deuxième partie).

Tant le taux de concordance de la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse chez les jumeaux monozygotiques et dizygotiques, que l'existence de familles de maladie de Crohn ou colite ulcéreuse, que l'influence de l'ethnie/la race, ou enfin, l'association avec des maladies mendéliennes rares, suggèrent que la maladie de Crohn (50-60 %) a une forte héritabilité (ou contribution génétique) par rapport à la colite ulcéreuse (15-20 %).

Les maladies inflammatoires sont polygéniques et hétérogènes ; polygéniques car plusieurs gènes ou groupes de gènes à faible pénétrance sont impliqués dans l'expression de la maladie et, hétérogènes, car différents groupes de gènes peuvent engendrer une même expression clinique, ou qu'un même groupe de gènes peut générer différentes expressions de la maladie. Et ceci sans compter l'interaction avec l'environnement et des effets stochastiques (liés au hasard : un voyage à l'étranger, une intoxication alimentaire, la prise d'antibiotique...). Les maladies polygéniques sont donc très éloignées des maladies monogéniques mendéliennes où une ou quelques mutations au niveau d'un seul gène est responsable d'une maladie héréditaire caractéristique, phénotypiquement stable avec une pénétrance de 100 %.

L'étude de la génétique des maladies inflammatoires repose sur deux stratégies : l'approche du gène candidat est basée sur une hypothèse biologique (c'est un gène ou une famille de gènes qui jouent un rôle important dans la biologie de la maladie) dans le

cadre d'une étude cas-contrôle. L'autre stratégie est une approche systématique globale sans a priori : ce sont les études de liaison (linkage studies) ou les études genome wide array (ou GWAS). Les études de liaison menées au sein de multiples familles, qui étudient la transmission de marqueurs ou microsatellites de génération en génération et permettent d'identifier un ou des segments de chromosome liés à la maladie, furent réalisées dans la deuxième partie des années 90. Elles ont été abandonnées en raison d'un manque de puissance statistique (taille des échantillons) et une trop grande inférence statistique entraînant un manque de réplification des régions chromosomique/loci de susceptibilité, rapportés par différents groupes. Les études par micropuces génomique, genome wide array (ou GWAS), décryptent tout le génome grâce à l'étude de cent mille à un million de marqueurs ou SNPs (single nucleotide polymorphisms ou polymorphismes de paires de base) dans le cadre d'une étude cas-contrôle sur des milliers de patients et sujets sains.

C'est par une approche d'étude de liaison et de gène candidat, que le premier gène de susceptibilité de la maladie de Crohn, NOD2, fut mis en évidence en 2001. De manière surprenante, celui-ci s'est avéré être un récepteur de reconnaissance de produit bactérien, *pattern recognition receptor (PPR)*, où les trois mutations associées à la maladie de Crohn se situaient dans le domaine *leucine rich repeat (LRR)* de reconnaissance bactérienne. Des études biochimiques ont montré que la structure essentielle reconnue par NOD2 était le MDP, muramyl dipeptide, dérivé de peptidoglycan des bactéries à Gram positif et négatif. Il s'agissait de mutations de perte de fonction puisque les individus porteurs d'une de ces mutations s'associaient à une diminution de l'activation de NF- κ B. Le risque (Odd ratio) de développer une maladie de Crohn était de trois pour un individu porteur hétérozygote et de vingt à quarante pour un porteur homozygote ou hétérozygote composé. La filiation entre cette découverte génétique et l'expression de la maladie était complète. En effet, NOD2 apparaît majoritairement exprimé au niveau des cellules de Paneth, qui sont des cellules spécialisées de l'épithélium intestinal dans la défense anti-bactérienne par la production de lysozyme β et de défensines. Ces cellules de Paneth sont surtout présentes au niveau de l'iléon terminal. L'observation clinique d'une association de la forme (localisation) iléale de la maladie chez les patients porteurs de NOD2 (hétéro ou homozygotes) était d'autant plus remarquable que ces mêmes patients présentaient une diminution d'expression/sécrétion de défensines au niveau de la muqueuse iléale.

Ainsi, les individus porteurs de mutations de NOD2 auraient une riposte anti-bactérienne insuffisante lors de la rencontre d'un agent bactérien pathogène. C'est dans cet esprit que la maladie de Crohn est apparue comme un syndrome d'immunodéficience de l'immunité innée. Nous avons nous-mêmes identifié un autre gène appartenant à la même superfamille de NOD2 (la famille CATERPILLER), NLRP3, codant pour la protéine cryopyrine qui supervise une voie de signalisation majeure dans l'inflammation (et notamment dans la maturation de l'interleukine (IL) -1 et l'IL-18), l'*inflammasome*. Les variants associés à la maladie de Crohn sont situés en amont du gène NLRP3, et sont associés à une diminution de l'expression de cryopyrine, confirmant une fois

de plus, l'hypothèse d'un syndrome d'immunodéficience innée. En même temps, il était surprenant de constater que NOD2 et NLRP3 sont aussi les gènes causals de deux syndromes très rares de fièvre périodique ou maladies auto-inflammatoires, le syndrome de Blau (NOD2) et le complexe de maladies NOMID (NLRP3), suggérant qu'un même gène pouvait coder pour une *maladie très rare* par un de ses domaines, mais aussi coder pour des *maladies plus communes* sur un autre de ses domaines. Ainsi, des maladies inflammatoires communes complexes et maladies inflammatoires rares peuvent avoir une même origine génétique.

Dans le décours du séquençage du génome entier, le consortium des polymorphismes de paires de base (SNPs, single nucleotide polymorphism) (ou SNP consortium) et projet international HAPMAP ont permis l'archivage au sein des trois milliards de bases que comptent le génome humain, l'énumération de trois puis (jusqu'à présent) douze millions de SNPs. Le projet international HAPMAP a permis une meilleure compréhension du génome. Nos différences entre homines sapientes ne sont pas le résultat de la combinaison aléatoire infinie de ces millions de SNPs. Au contraire, une fois encore, la nature se montre plus conservatrice. Tout le long du génome se distribuent des régions en haut déséquilibre de liaison (ou BLOCs) où les SNPs sont fortement corrélés les uns aux autres (si SNPA est présent, SNPB est toujours présent, $R^2 = 0,8$ à 1) et des régions de faible déséquilibre de liaison (ZONES de RECOMBINAISON HOTSPOT) où les SNPs sont faiblement corrélés ou présents de manière aléatoire. C'est au niveau des ces zones de recombinaison (hotspot) qu'ont lieu les croisements chiasmatisques à la méiose (à l'embrassement des chromosomes), à l'origine du partage commun des gènes du père et de la mère à la descendance, et de la diversité intergénérationnelle. Au sein des blocs, la variation allélique d'un individu n'est pas le reflet d'une combinaison infinie des SNPs présents au sein d'un bloc. Il existe seulement quelques patterns de variations alléliques ou haplotypes (maximum 20-30 haplotypes pour un bloc). Comme les SNPs au sein d'un bloc sont fortement corrélés, il est possible en génotypant seulement quelques SNPs (tagging SNPs) d'un bloc de différencier les différents haplotypes de ce bloc. Quelques tagging SNPs suffisent à capturer la variation allélique d'un bloc. C'est sur cette découverte qu'à pu naître l'approche génétique par GWAS : 100.000 à 300.000 à 1 million de SNPs suffisent à capturer la variation allélique du génome. Plus le nombre de tagging SNPs étudiés est grand, plus la perception et la résolution de la variation allélique du génome est meilleure.

Près de dix GWAS ont été menés jusqu'à ce jour dans la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, et deux méta-analyses en 2008 et 2010 (non encore publiées) ont regroupé ces différentes études. Brièvement celles-ci ont montré qu'il existe à ce jour plus de 70 gènes de susceptibilité dans la maladie de Crohn dont presque 50 % sont partagés avec la colite ulcéreuse. Plusieurs de ces gènes ou régions de susceptibilité sont également partagés avec d'autres maladies inflammatoires telles que le psoriasis, la spondylarthrite ankylosante, la polyarthrite rhumatoïde, le diabète de type 1 et 2, le lupus, la sclérose en plaques mais dont la contribution relative au risque de développer la maladie varie d'une maladie à l'autre.

De ce listing de gènes ou régions de susceptibilité (contenant plusieurs gènes ou aucun gène), on ignore encore comment s'élaborent les mécanismes pathogéniques de la maladie. Il s'avère que beaucoup des SNPs ou variants ou mutations associées avec la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse sont davantage des régulateurs de l'expression ou de l'épissage des gènes que des SNPs entraînant une modification de la structure, de la conformation ou de la fonction de la protéine.

Grâce à l'avenue des GWAS, plusieurs voies majeures de signalisation émergent dans la pathogénie de la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, telles que les voies de signalisation de l'autophagie et du récepteur de l'IL-23. Ainsi, outre l'importance de la reconnaissance bactérienne, les gènes de l'autophagie, tels que ATG16L1 ou IRGM, impliqués dans la formation de phagolysosomes et dans la destruction cytosolique des bactéries jouent un rôle important dans la maladie de Crohn. Les patients porteurs de la mutation délétère d'ATG16L1 ont par ailleurs une malformation des granules cytoplasmiques de lysosyme β au sein des cellules de Paneth (voir plus haut), ce qui souligne une fois encore le rôle de ces cellules dans la pathogénie de la maladie. Des mutations protectrices au sein du récepteur de l'IL-23 présentes moins fréquemment dans la maladie de Crohn, démontrent le rôle pathogénique des lymphocytes Th17 dans la maladie de Crohn comme dans le psoriasis. De manière très surprenante, plusieurs des gènes de susceptibilité IL-12B, JAK2, STAT3 situés sur différents chromosomes s'assemblent et reconstruisent entièrement la voie de signalisation de l'IL-23 démontrant qu'il s'agit d'une voie biologique de signalisation centrale dans la maladie de Crohn, et dans une moindre mesure, dans la colite ulcéreuse. La découverte du gène PTGER4, intervenant dans le métabolisme des prostaglandines, par le groupe belge, sous la supervision de Michel Georges et d'Edouard Louis, démontre également l'importance de l'intégrité de l'épithélium intestinal.

L'ensemble des SNPs, ou variants des gènes ou loci de susceptibilité associés à la maladie de Crohn, sont aussi présents dans la population générale sporadique mais à une fréquence plus faible ou plus forte (en fonction du fait qu'elles sont délétères ou protectrices). Beaucoup de sujets sains sont porteurs des SNPs ou variants associés à la maladie de Crohn et ne développent pas la maladie de Crohn car c'est bien la combinaison de 10 -100 ou plusieurs centaines de SNPs ou variants de gènes de susceptibilité et l'interaction avec un ou des facteurs environnementaux qui mèneront au développement de la maladie de Crohn. C'est ainsi que la maladie de Crohn répond au concept génétique de variants communs/maladie commune (common variants/common disease par opposition à rares variants/maladies rares), selon lequel c'est l'accumulation de variants communs fréquents au sein du génome d'un individu qui le rendra susceptible au développement d'une maladie commune comme la maladie de Crohn. Aujourd'hui, malgré la découverte récente de plus de 70 gènes dans la maladie de Crohn, seuls 25 % de l'héritabilité est expliquée. Il est évident que l'étude des régions de susceptibilité rapportées jusqu'ici pourra permettre de découvrir et caractériser les variants (ou SNPs) causals au sein de ces régions (dont le risque de la région associée de développer la maladie est plus grossier que le risque d'un SNP

causal de développer la maladie au sein de cette même région associée). L'héritabilité manquante s'explique par la découverte future de plusieurs dizaines ou centaines de nouveaux variants communs, par la découverte de mutations rares (à plus forte pénétrance est associé à un risque plus élevé de développer la maladie mais seulement au sein de sous-populations plus limitées de patients), par l'interaction épistatique des ces variants communs et mutations rares, et par l'épigénétique (l'influence de l'environnement sur le fonctionnement du génome).

Comment réconcilier à présent les données épidémiologiques, les données expérimentales chez la souris, et les données génétiques chez l'homme. Il existe plus de cent trillions de bactéries au sein de la flore microbienne (dont nous ne connaissons qu'un nombre limité d'espèces) qui vivent dans un environnement symbiotique et mutuel avec notre organisme. Il est possible que des altérations dans le développement et la composition de ce microbiome, connu sous le nom de dysbiose, perturbent ce mutualisme ou symbiotisme entre la flore microbienne et le système immunitaire digestif. Des modèles chez la souris, il apparaît au sein des bactéries commensales, il existe des bactéries symbiotiques bénéfiques (régulatrices) et des bactéries délétères (ou pathobiotiques, sans être des bactéries pathogènes extérieures). Des études chez les patients souffrant de maladies inflammatoires ont démontré que certains clones bactériens étaient plus ou moins fréquents que chez des sujets sains (même si l'activité de la maladie et les traitements peuvent représenter un biais). Les premières études du génome de la flore microbienne révèlent que ce métagénome est au moins cent cinquante fois plus grand que le génome humain et infiniment plus complexe dans sa régulation. A une maladie polygénique et hétérogène, il faudra confronter un métagénome polygénique et hétérogène (Fig. 1). Malgré le rôle d'un background génétique de susceptibilité dans le développement des maladies inflammatoires de l'intestin, c'est tout autant la dysbiose (l'altération du développement et de la composition de la flore microbienne intestinale) probablement induite par notre mode de vie occidental qui doit entraîner des perturbations dans le développement et le fonctionnement du système immunitaire digestif, à l'origine des maladies inflammatoires intestinales (Fig. 2). C'est une meilleure compréhension de l'influence de l'environnement (et plus particulièrement de l'alimentation) et la caractérisation dans les années futures de ce métagénome qui permettront avec une dissection génétique complète des MICI, une compréhension de l'étiopathogénie de la maladie.

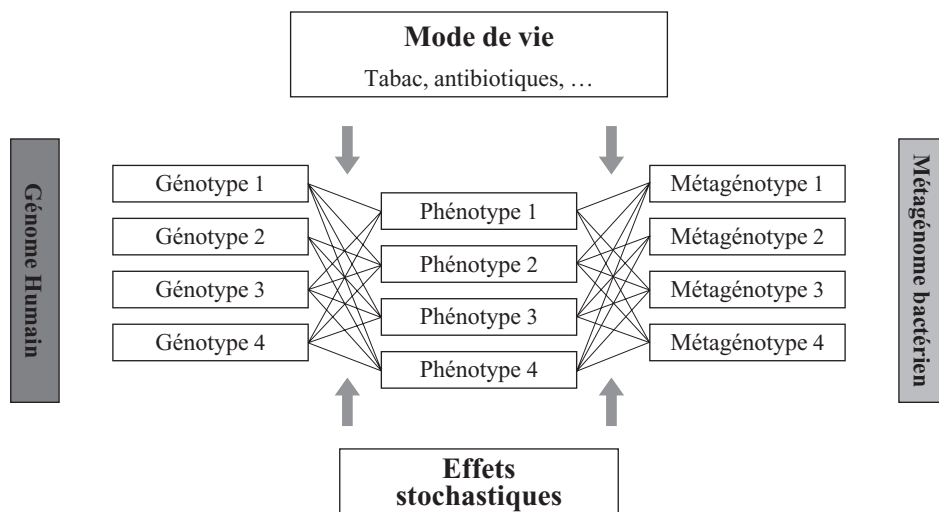


Fig. 1

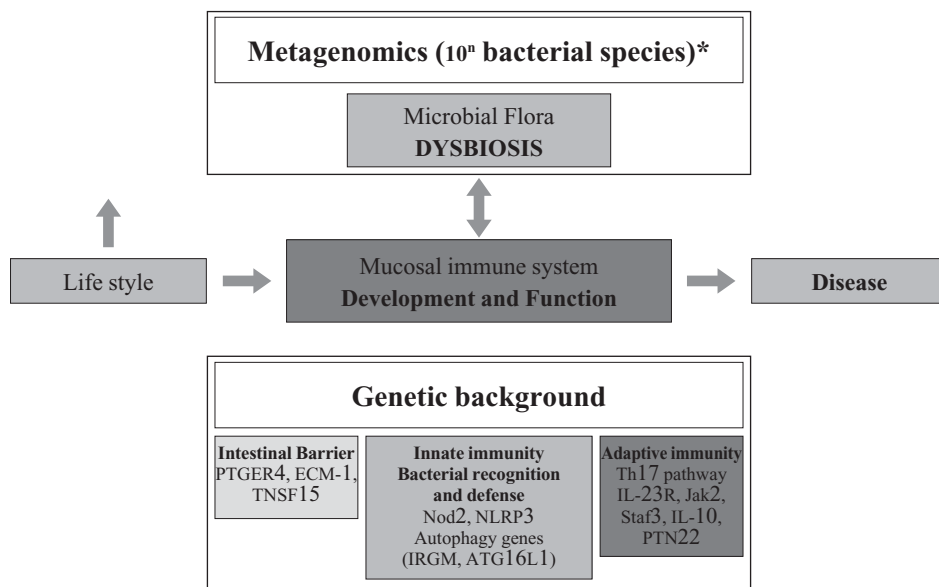


Fig. 2

RÉSUMÉ

Les maladies inflammatoires de l'intestin, la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, résultent d'une réponse immunitaire inappropriée vis-à-vis de la flore microbienne intestinale chez un individu génétiquement susceptible. Plusieurs preuves expérimentales et épidémiologiques ont démontré le rôle essentiel de la flore microbienne dans le développement et la perpétuation de l'inflammation intestinale. Les maladies inflammatoires de l'intestin sont des maladies multigéniques et hétérogènes, liées à la présence de multiples gènes ou groupe de gènes à faible pénétrance. L'approche génétique s'est d'abord basée sur la recherche de gènes candidats, dont le choix était motivé par une hypothèse biologique, puis s'est accélérée grâce à une recherche systématique informatisée et globale : d'abord par des études de liaison sur des familles de patients (dans la fin des années 1990) et enfin, grâce à l'utilisation de micropuces génomiques (les genome wide arrays, GWAS), à partir des années 2000. C'est en 2001 que fut identifié, par approche de gène candidat et études de liaison, le premier gène de susceptibilité de la maladie de Crohn, NOD2, qui est un récepteur de reconnaissance bactérienne, suggérant le rôle de la reconnaissance de la flore microbienne dans le développement de la maladie. Les GWAS ont permis l'identification de plusieurs dizaines de gènes et une meilleure compréhension des mécanismes fondamentaux de ces maladies. Les GWAS ont non seulement confirmé le rôle de la reconnaissance bactérienne mais aussi identifié des gènes impliqués dans la défense anti-bactérienne (comme les gènes de l'autophagie) ou dans l'immunité adaptative (comme le récepteur de l'IL-23/lymphocytes Th17). Malgré le rôle d'un background génétique de susceptibilité dans le développement des maladies inflammatoires de l'intestin, c'est tout autant la dysbiose (l'altération du développement et de la composition de la flore microbienne intestinale), probablement induite par notre mode de vie occidental, qui doit entraîner des perturbations dans le développement et le fonctionnement du système immunitaire digestif, à l'origine des maladies inflammatoires intestinales.

SUMMARY

Inflammatory bowel diseases (IBD), Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), result from an inappropriate immune response towards the microbial flora in a genetically susceptible host. Several epidemiological and animal studies have demonstrated the essential role of the microbial flora in the triggering and perpetuation of intestinal inflammation. IBD are multigenic and heterogeneous diseases, and result from multiple low penetrant genes or group of genes. The genetic strategy for gene hunting in multigenic studies relies on two separate approaches. A candidate gene approach which is based on a robust biological hypothesis. A more systematic/global approach is either based on linkage studies (in late 90s) on IBD families or, since 2000 on gene arrays, the genome wide arrays (GWAS) on patients and controls. In 2001, the first CD susceptible gene, NOD2, was discovered, and found to be a pattern recognition receptor for bacteria, shedding light on the role of bacterial recognition in the triggering of the disease. Since 2000, GWAS have greatly accelerated the discoveries of new genes or signalling pathways in Crohn's disease and ulcerative colitis, confirming the importance of bacterial recognition, but also of bacterial defence (i.e. autophagy genes) as well as the role of the adaptive immune response (i.e. IL-23R/ Th17 pathway). Despite the role of genetics in the development of IBD, changes in the development and composition of the microbial flora, known as dysbiosis, (possibly induced by our Western life style) must alter the development and function of the mucosal immune system, and leads to disease expression.

BIBLIOGRAPHIE

1. HUGOT J.P., CHAMAILLARD M., ZOUALI H., LESAGE S., CÉZARD J.P., BELAICHE J., ALMER S., TYSK C., O'MORAIN C.A., GASSULL M., BINDER V., FINKEL Y., Cortot A., MODIGLIANI R., LAURENT-PUIG P., GOWER-ROUSSEAU C., MACRY J., COLOMBEL J.F., SAHBATOU M., THOMAS G., *Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease*, Nature, (2001) May 31, 411(6837), 599-603.

2. LIBIOULLE C., LOUIS E., HANSOUL S., SANDOR C., FARNIR F., FRANCHIMONT D., VERMEIRE S., DEWIT O., DE VOS M., DIXON A., DEMARCHE B., GUT I., HEATH S., FOGGIO M., LIANG L., LAUKENS D., MNI M., ZELENKA D., VAN GOSSUM A., RUTGEERTS P., BELAICHE J., LATHROP M., GEORGES M., *Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4*, PLoS Genet. 2007 Apr. 20, 3(4), e58. Epub (2007) Mar. 5.
3. BARRETT J.C., HANSOUL S., NICOLAE D.L., CHO J.H., DUERR R.H., RIOUX J.D., BRANT S.R., SILVERBERG M.S., TAYLOR K.D., BARMADA M.M., BITTON A., DASSOPOULOS T., DATTA L.W., GREEN T., GRIFFITHS A.M., KISTNER E.O., MURTHA M.T., REGUEIRO M.D., ROTTER J.I., SCHUMM L.P., STEINHART A.H., TARGAN S.R., XAVIER R.J., NIDDK IBD GENETICS CONSORTIUM, LIBIOULLE C., SANDOR C., LATHROP M., BELAICHE J., DEWIT O., GUT I., HEATH S., LAUKENS D., MNI M., RUTGEERTS P., VAN GOSSUM A., ZELENKA D., FRANCHIMONT D., HUGOT J.P., DE VOS M., VERMEIRE S., LOUIS E.; BELGIAN-FRENCH IBD CONSORTIUM ; WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM, CARDON L.R., ANDERSON C.A., DRUMMOND H., NIMMO E., AHMAD T., PRESCOTT N.J., ONNIE C.M., FISHER S.A., MARCHINI J., GHORI J., BUMPSTEAD S., GWILLIAM R., TREMELLING M., DELOUKAS P., MANSFIELD J., JEWELL D., SATSANGI J., MATHEW C.G., PARKES M., GEORGES M., DALY M.J., *Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease*, Nat. Genet. (2008) Aug, 40 (8), 955-62, Epub (2008) Jun 29.
4. VILLANI A.C., LEMIRE M., FORTIN G., LOUIS E., SILVERBERG M.S., COLLETTE C., BABA N., LIBIOULLE C., BELAICHE J., BITTON A., GAUDET D., COHEN A., LANGELIER D., FORTIN P.R., WITHER J.E., SARFATI M., RUTGEERTS P., RIOUX J.D., VERMEIRE S., HUDSON T.J., FRANCHIMONT D., *Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility*, Nat. Genet., (2009) Jan., 41(1), 71-6.
5. FRANKE A., MCGOVERN D.P., BARRETT J.C., WANG K., RADFORD-SMITH G.L., AHMAD T., LEES C.W., BALSCHUN T., LEE J., ROBERTS R., ANDERSON C.A., BIS J.C., BUMPSTEAD S., ELLINGHAUS D., FESTEN E.M., GEORGES M., GREEN T., HARITUNIANS T., JOSTINS L., LATIANO A., MATHEW C.G., MONTGOMERY G.W., PRESCOTT N.J., RAYCHAUDHURI S., ROTTER J.I., SCHUMM P., SHARMA Y., SIMMS L.A., TAYLOR K.D., WHITEMAN D., WIJENGA C., BALDASSANO R.N., BARCLAY M., BAYLESS T.M., BRAND S., BÜNING C., COHEN A., COLOMBEL J.F., COTTONE M., STRONATI L., DENSON T., DE VOS M., D'INCA R., DUBINSKY M., EDWARDS C., FLORIN T., FRANCHIMONT D., GEARRY R., GLAS J., VAN GOSSUM A., GUTHERY S.L., HALFVARSON J., VERSPAGET H.W., HUGOT J.P., KARBAN A., LAUKENS D., LAWRENCE I., LEMANN M., LEVINE A., LIBIOULLE C., LOUIS E., MOWAT C., NEWMAN W., PANÉS J., PHILLIPS A., PROCTOR D.D., REGUEIRO M., RUSSELL R., RUTGEERTS P., SANDERSON J., SANS M., SEIBOLD F., STEINHART A.H., STOKKERS P.C., TORKVIST L., KULLAK-UBLICK G., WILSON D., WALTERS T., TARGAN S.R., BRANT S.R., RIOUX J.D., D'AMATO M., WEERSMA R.K., KUGATHASAN S., GRIFFITHS A.M., MANSFIELD J.C., VERMEIRE S., DUERR R.H., SILVERBERG M.S., SATSANGI J., SCHREIBER S., CHO J.H., ANNESE V., HAKONARSON H., DALY M.J., PARKES M., *Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci*, Nat. Genet., (2010) Nov. 21. [Epub ahead of print]

(Gastroentérologie, Erasme, ULB, Bruxelles.)

*
* *

2. Impact clinique des découvertes génétiques dans les maladies inflammatoires de l'intestin (E. Louis)

2.1. Introduction

Plus de cent marqueurs génétiques ont été récemment identifiés dans les MICI. Certains marqueurs sont spécifiques à la maladie de Crohn (MC), d'autres sont spécifiques à la rectocolite ulcéro-hémorragique (RCUH) et un troisième groupe est commun à ces deux affections. Ces marqueurs sont des variants génétiques, soit associés eux-mêmes à ces maladies, soit en déséquilibre de liaison avec des variants causaux non encore identifiés. En tout état de cause, ils constituent une possibilité importante de progresser dans le diagnostic et le traitement de ces affections. Les implications cliniques possibles de ces découvertes génétiques comprennent le screening pour le diagnostic précoce de ces maladies dans des populations ciblées, la stratification des malades sur le plan de la sévérité de la maladie, de son risque évolutif ou de sa réponse aux traitements, une meilleure compréhension de la physiopathologie de ces affections et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques, voire le développement de thérapies géniques ciblées.

2.2. Diagnostic génétique des MICI

Le diagnostic de la MC et de la RCUH reste parfois difficile et souvent tardif, certains patients étant diagnostiqués au stade des complications et ne pouvant plus être traités que par résection chirurgicale du segment intestinal malade. Bien que ces affections ne soient pas extrêmement fréquentes, elles touchent néanmoins près de 0.3 % de la population en Belgique et représentent, compte tenu de leur survenue chez des adultes jeunes et de leur caractère très invalidant, un problème de santé publique. Des études récentes ont souligné l'intérêt d'un traitement précoce optimal dans ces affections. Ce type de stratégie thérapeutique nécessite inévitablement un diagnostic précoce et de nouveaux marqueurs génétiques pourraient contribuer à ce diagnostic, particulièrement dans des populations à risque telles que les familles de patients déjà atteints de MICI (risque relatif dans les familles oscillant entre 20 et 40) ou les personnes présentant des symptômes digestifs évocateurs récurrents.

Toutefois, et bien que plus de cent marqueurs génétiques aient été clairement associés à ces pathologies, les répercussions en matière de diagnostic sont actuellement et resteront probablement très faibles. La raison en est que chacun de ces marqueurs pris individuellement est seulement associé à un risque absolu faible de développer une MICI (figure 1). A titre d'exemple, les variants génétiques les plus fortement associés au risque de développer une MICI sont les variants au niveau du gène *CARD15*, codant pour la protéine NOD2. Le risque relatif de développer une MC chez les porteurs d'un seul allèle à risque n'est que de 3 et le risque relatif chez les porteurs de deux allèles à risque (homozygotes ou hétérozygotes composites) se trouve entre 20 et 40. Ceci signifie également, que parmi ces sujets porteurs de deux allèles à risque, seulement 8-10 % seront atteints d'une MC. Il est possible que la combinaison de marqueurs génétiques

à faible risque individuel augmente ce risque relatif et ait donc une valeur prédictive et diagnostique plus élevée. Néanmoins, à l'heure actuelle, les combinaisons de ces marqueurs deux par deux ne montrent pas d'augmentation significative du risque. À terme, il est possible qu'une analyse mathématique puissante et spécifique permette d'isoler des combinaisons génétiques à haut risque, mais ces études restent à faire et en attendant, il n'y a pas d'utilité diagnostique de ces tests génétiques.

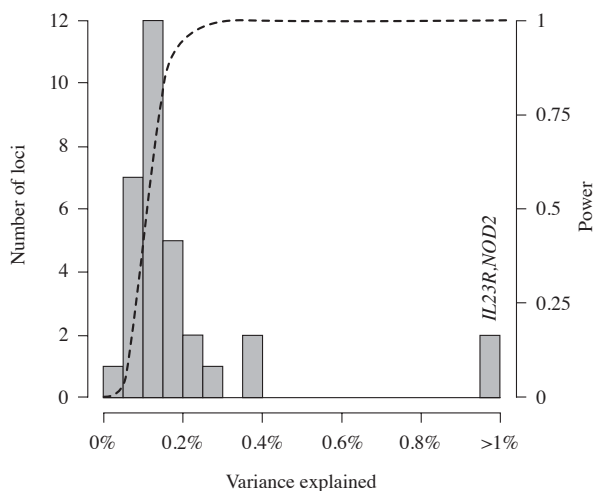


Fig. 1

Plus de 70 gènes et loci dans la maladie de Crohn n'expliquent que 20-30 % de l'héritabilité de cette maladie. Ce graphique représente le pourcentage d'héritabilité de la maladie expliqué par différents gènes ou loci. Seuls deux gènes (NOD2 et IL-23R) expliquent plus de 1 %. La plupart n'expliquent à eux seuls que moins de 0.2 % de l'héritabilité.

2.3. Stratification des patients dans les MICI

La stratification des patients atteints de MICI concernant le risque de développer des maladies sévères et compliquées est devenue une priorité importante. La raison en est que les MICI ont longtemps été traitées en adaptant la stratégie de traitement sur la base du développement des complications cliniques. De cette façon, il est possible d'atténuer les symptômes, voire de maintenir une rémission parfois prolongée, mais des études récentes de cohorte ou de population ont montré qu'on n'arrivait pas à changer l'histoire naturelle de la maladie, en particulier le développement des complications et la nécessité de chirurgies de résections intestinales. Ces travaux ont également montré que la proportion de patients développant une maladie handicapante ou invalidante restait élevée, de l'ordre de 80 % dans les centres de références tertiaires et 50 % dans les études de population. Des données préliminaires indiquent qu'un traitement puissant

(intégrant notamment des immunosuppresseurs et/ou des anti-TNF) plus précoce chez ces patients pourrait diminuer le risque de ces complications. A l'heure actuelle, les seuls facteurs de prédiction disponibles sont d'ordre clinique et leurs performances prédictives restent insuffisantes. Compte tenu de l'hétérogénéité génétique des MICI, il est probable que des profils génétiques particuliers correspondent à des formes de degrés différents de sévérité. Les recherches dans ce domaine restent toutefois à un stade préliminaire. Les variants génétiques les plus étudiés ont été ceux du gène CARD15. Ces variants ont notamment été associés à un risque accru de sténose intestinale et de chirurgie. Dans les analyses multivariées toutefois, cet effet semblait principalement lié à une association première avec les localisations iléales de la MC, se compliquant elles-mêmes plus fréquemment de sténose et de chirurgie. Des variants du gène OCTN localisés sur le locus IBD5 en 5q31 ont quant à eux été associés dans plusieurs études indépendantes à des formes périanales fistulisantes de la MC. Plus récemment, des études ont tenté d'intégrer l'impact de plusieurs marqueurs génétiques simultanés. En particulier, la présence simultanée d'un nombre croissant de variants à risque pour la MC au niveau des gènes CARD15, DLG5, ATG16L1, IL23R ainsi que du locus IBD5, était associée à un risque accru de forme compliquée de MC, en particulier des formes sténosantes et fistulisantes et au risque de chirurgie. L'étude la plus avancée dans ce domaine a tenté d'intégrer un grand nombre de marqueurs génétiques documentés à ce jour, des marqueurs sérologiques également associés aux MICI, des paramètres cliniques et des facteurs environnementaux tels que le tabagisme, également susceptibles d'influencer l'évolutions des MICI. Cette étude suggère notamment le rôle d'un variant génétique dans un gène proche de celui de l'IL12B dans le développement des formes sténosantes de la MC, et ce en conjonction avec la localisation iléale de la maladie. D'autres variants génétiques étaient, dans cette étude, associés aux formes fistulisantes intra-abdominales ou périanales de la maladie. Dans la RCUH, l'association la plus nette et la plus largement répliquée est celle entre la présence de l'allèle HLA-DRB1*0103 et le risque de pancolite et de colectomie. Un travail très ambitieux est actuellement en cours au sein du large consortium international pour l'étude de la génétique des MICI pour tenter d'étudier de façon systématique et sur de très larges cohortes de plusieurs milliers de patients ces interactions entre les génotypes et les phénotypes des MICI.

2.4. Identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans les MICI

Une troisième grande application clinique possible des découvertes génétiques dans les MICI est de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques. Ces découvertes génétiques ont en fait, jusqu'à présent, avant tout aidé à clarifier les mécanismes immunopathologiques et microbiologiques déterminants dans les MICI. Une liste de gènes importants, associés aux MICI est reprise dans la table 1. Ces gènes, principalement impliqués dans l'immunité innée et adaptative, ainsi que l'intégrité épithéliale, représentent autant de cibles thérapeutiques potentielles. Certaines sont déjà à l'étude, soit dans des modèles expérimentaux, soit chez l'homme. La piste principale actuellement en développement est probablement celle du récepteur de l'interleukine 23 (IL23R). L'IL23 est principalement produite par les cellules monocytaires et dendritiques ;

son récepteur est principalement exprimé par les lymphocytes T. L'interaction de l'IL23 avec son récepteur entraîne la transformation des lymphocytes T en lymphocytes TH17, capables de produire des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL6, l'IL17, l'IL21, l'IL22 et le TNF α . Les variants génétiques de l'IL23R associés aux MICI sont aussi associés à la spondylarthrite ankylosante et au psoriasis. Ces variants protègent de ces maladies. Des études de phase 3 sont actuellement en cours avec des anticorps monoclonaux dirigés contre une sous-unité de l'IL23, présente aussi dans l'IL12. Ces anticorps ont déjà reçu leur autorisation de mise sur le marché européen pour le psoriasis. Les résultats des études de phase 2 dans la MC montraient un bénéfice potentiel. Parmi les nombreuses autres pistes potentiellement exploitables, il y a également celle du récepteur de type 4 à la prostaglandine E2. Des variants génétiques susceptibles de réguler la transcription de ce récepteur ont été associés à la MC. Ce récepteur a de nombreuses fonctions, notamment dans l'homéostasie muqueuse mais aussi dans l'immuno-régulation. Exprimé par les lymphocytes T, il est capable de contribuer à la différenciation de ces cellules en lymphocytes TH1, mais également de favoriser l'expansion des cellules TH17 sous l'effet de l'IL23. Compte tenu de l'importance de ces cellules TH1 et TH17 dans de nombreuses maladies immuno-inflammatoires chroniques, des antagonistes de ce récepteur sont à l'étude dans différents modèles expérimentaux, notamment celui de l'encéphalomyélite auto-immune murine. Dans cette affection, un antagoniste de ce récepteur, entraînait non seulement une diminution de la différenciation des lymphocytes T en TH1 et TH17, mais aussi une diminution de la progression de la maladie. Un dernier exemple est celui des molécules capables de moduler le phénomène d'autophagie. De façon très intéressante, plusieurs variants génétiques associés à la MC et, dans une moindre mesure, à la RCUH, interfèrent avec le phénomène d'autophagie. L'autophagie est un mécanisme important de l'immunité innée par lequel la cellule est notamment capable d'éliminer de son cytoplasme des agrégats protéiques, des organelles aberrants ainsi que des microbes. Plusieurs molécules en développement ou déjà sur le marché sont capables de moduler l'autophagie. C'est le cas de la rapamycine utilisée dans les greffes d'organe et qui stimule l'autophagie. De façon très préliminaire, son utilisation chez quelques patients avec MC semblait apporter une amélioration clinique avec même une cicatrisation lésionnelle.

À terme, on peut imaginer, compte tenu de l'hétérogénéité génétique des MICI, que le choix du traitement pour un patient déterminé sera basé sur la connaissance de son terrain génétique et des voies moléculaires impliquées dans la physiopathologie de la maladie dans son cas précis. On pourrait alors quitter une médecine basée sur des entités cliniques hétérogènes et mal définies sur le plan moléculaire, pour entrer dans une médecine moléculaire où les traitements seraient choisis précisément en fonction des mécanismes physiopathologiques à l'œuvre chez chaque patient déterminé.

Variations génétiques majeures détectées par GWAs dans les MICI				
<i>Chr</i>	<i>Gène</i>	<i>Fonction</i>	<i>CD</i>	<i>UC</i>
<i>1p31</i>	<i>IL-23 receptor</i>	<i>Immune inflammatory response</i>	+	+
<i>5q33</i>	<i>IL-12b (p40)</i>	<i>Immune inflammatory response</i>	+	+
<i>9p24</i>	<i>JAK2</i>	<i>Signaling molecules</i>	+	+
<i>17q21</i>	<i>STAT3</i>	<i>Transcription factor</i>	+	+
<i>18p11</i>	<i>PTPN2</i>	<i>T cell tyrosine phosphatase</i>	+	-
<i>9q32</i>	<i>TNFS 15</i>	<i>Immune inflammatory response</i>	+	-
<i>6q27</i>	<i>CCR6</i>	<i>Chemokine receptor</i>	+	-
<i>3p21</i>	<i>MST1</i>	<i>Macrophage chemotaxis</i>	+	-
<i>2q37</i>	<i>ATG16L1</i>	<i>Autophagosome pathway</i>	+	-
<i>5q33</i>	<i>IRGM</i>	<i>Autophagosome pathway</i>	+	-
<i>16q12</i>	<i>NOD2/CARD15</i>	<i>Bacterial recognition</i>	+	-
<i>20q13</i>	<i>TNFRSF6B</i>	<i>Inflammatory response, apoptosis</i>	+	+
<i>21q22</i>	<i>PSMG1</i>	<i>Proteasome-related protein</i>	+	+
<i>5q13</i>	<i>PTGER4</i>	<i>Barrier function, immunoregulation</i>	+	-
<i>12q12</i>	<i>MUC19</i>	<i>Epithelial integrity</i>	-	+
<i>1q32</i>	<i>IL - 10</i>	<i>Immunoregulation</i>	-	+

Table 1

2.5. Conclusion

Les applications cliniques potentielles de ces découvertes génétiques sont multiples. Néanmoins, compte tenu de l'architecture génétique de ces maladies, de leur caractère polygénique multifactoriel et du risque relatif faible associé à chacun des variants génétiques impliqués, il n'y a pas encore actuellement d'implication nette dans le diagnostic ou même la stratification des patients. C'est dans le domaine du traitement que ces découvertes pourraient avoir les répercussions les plus rapides, notamment en permettant de privilégier ou de développer des agents thérapeutiques directement impliqués dans l'étiopathogénie de ces affections. Ces traitements pourraient même être ciblés en fonction du terrain génétique du patient à traiter et ouvrir les portes d'une médecine moléculaire individualisée.

RÉSUMÉ

Les applications cliniques potentielles des découvertes dans le domaine de la génétique des maladies inflammatoires chroniques intestinales comprennent le diagnostic génétique, la stratification des patients en sous-groupes présentant des risques évolutifs différents et éventuellement des réponses différentes aux traitements et enfin l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Compte tenu du caractère polygénique complexe de ces maladies, il est peu probable qu'un diagnostic génétique soit un jour d'application. Des études sont en cours pour tenter de stratifier les patients en accord avec leur risque évolutif, mais ces études nécessitent des outils mathématiques nouveaux et spécifiques. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques est certainement l'aspect qui aura le plus rapidement des répercussions cliniques importantes. En particulier, des anticorps dirigés contre l'interleukine-23 sont en cours d'évaluation dans des études de phase 3.

SUMMARY

Potential clinical applications of genetic discoveries in the field of inflammatory bowel diseases include genetic diagnosis, patients' stratification in subgroups with different risk of complications or response to treatment, and finally the identification of new therapeutic targets. Due to the complex polygenic heritability of these diseases, it is unlikely that a genetic diagnosis will once be available. Several studies are currently ongoing to try and stratify the patients according to their own risk of complication. However these studies remain difficult and require new and specific mathematical tools. The identification of new therapeutic targets is certainly the aspect which will most rapidly have an important clinical impact. Particularly, antibodies against interleukin-23 are currently developed in phase 3 studies.

BIBLIOGRAPHIE

1. HENCKAERTS L., VAN STEEN K., VERSTREKEN I., CLEYNEN I., FRANKE A., SCHREIBER S., *et al.*, *Genetic risk profiling and prediction of disease course in Crohn's disease patients*, Clin. Gastroenterol. Hepatol., 7, 972-980 (2009).
2. HUGOT J.P., CHAMAILLARD M., ZOUALI H., LESAGE S., CÉZARD J.P., BELAICHE J., *et al.*, *Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease*, Nature, 411, 599-603 (2001).
3. SANDBORN W.J., FEAGAN B.G., FEDORAK R.N., SCHERL E., FLEISHER M.R., KATZ S., *et al.*, *A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease*, Gastroenterology, 135, 1130-41 (2008).
4. WEERSMA R.K., STOKKERS P.C., VAN BODEGRAVEN A.A., VAN HOGEZAND R.A., VERSPAGET H.W., DE JONG D.J., *et al.*, *Molecular prediction of disease risk and severity in a large Dutch Crohn's disease cohort*, Gut, 58, 388-95 (2009).
5. YAO C., SAKATA D., ESAKI Y., LI Y., MATSUOKA T., KUROIWA K., *et al.*, *Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion*, Nat. Med., 15, 633-40 (2009).

(Gastroentérologie, CHU Sart Tilman, U.Lg., Liège.)

*

* *

Discussion

M. M. Goldman. – Grand bravo pour cette éblouissante démonstration. Je voudrais tout d’abord évoquer la « théorie de l’hygiène » pour expliquer l’augmentation de l’incidence des maladies respiratoires dans les pays développés. Les politiques de vaccination n’ont pas d’impact significatif sur l’exposition microbienne globale et les vaccins ne doivent donc pas être mis en cause dans la pathologie de la maladie de Crohn.

Ma première question porte sur le rôle éventuel des modifications épigénétiques dans le déclenchement de la maladie de Crohn.

Je voudrais ensuite vous interroger sur le traitement en développement ciblant la chaîne p19 de l’interleukine -23 ou de l’interleukine -17. Pensez-vous que les essais cliniques correspondants devraient s’adresser en priorité aux patients présentant les mutations correspondantes ?

M. D. Franchimont. – L’étude de la flore microbienne jusqu’à il y a 5 ans n’a pas été possible en raison des techniques de culture. Aujourd’hui, grâce à la biologie moléculaire, il est possible de collecter tout l’ADN bactérien (ribosomal 16S DNA sequence) fécal, et par reclassement, d’énumérer une grande partie des espèces bactériennes de la flore microbienne.

M. E. Louis. – Effectivement les traitements actuels ciblent la sous-unité p40 commune à l’IL23 et l’IL12. Le développement d’anticorps dirigés sélectivement contre la sous-unité p19 spécifique de l’IL23 serait intéressant. Il en va de même de médicaments ou anticorps ciblant l’IL-17 dont le rôle dans la physiopathologie du Crohn paraît important. Ces cibles pourraient avoir un effet moins large que celui obtenu avec les anti-TNF et il faudra probablement, dès le développement de ces produits prévoir des études pharmacogénétiques tentant de vérifier si la réponse est associée à certains génotypes particuliers, comme cela se fait déjà dans certains traitements oncologiques notamment.

M. E. Van Schaftingen. – Parmi les gènes liés à la maladie de Crohn se retrouve le gène GCKR (glucokinase regulatory protein), qui n’a rien à voir avec l’immunité, mais qui code une protéine intracellulaire exprimée principalement dans le foie et qui sert de récepteur au fructose-1-phosphate, régulant l’activité de la glucokinase. Le fructose-1-phosphate étant un métabolite spécifique du fructose, sait-on s’il y a un lien entre la consommation de fructose ou de saccharose et la maladie de Crohn ?

M. D. Franchimont. – Il n’existe aucune preuve biologique ou clinique pour affirmer que la vaccination peut entraîner une MICI.

Un des facteurs favorisant le développement des MICI est notre mode de vie occidental comme en témoigne l’augmentation de l’incidence des MICI au cours de ces 50 dernières années. Ce mode de vie est en partie caractérisé par une meilleure hygiène de vie, une utilisation peut-être abusive des antibiotiques et une politique optimale de vaccination. Si le mode de vie occidental peut être responsable d’une mauvaise

éducation du système immunitaire digestif par le manque d'exposition à la plupart des antigènes présents dans un environnement normal (qui serait dès lors différent de l'environnement du monde occidental industrialisé) qui entraînerait une réponse inappropriée du système immunitaire digestif vis-à-vis de la flore microbienne chez un individu génétiquement susceptible, il faudra étudier à l'avenir toute prévention ou intervention, notamment en matière de soins de santé, pouvant être responsable du développement des MICI et autres maladies inflammatoires. La vaccination aujourd'hui est la meilleure stratégie naturelle pour lutter contre les infections sévères et prévenir l'immense mortalité infantile et adulte rapportée avant l'ère de la vaccination.

M. E. Louis. – Sur le plan épidémiologique, une association entre la consommation de sucres raffinés et la maladie de Crohn a été décrite. Ceci reste toutefois controversé et je ne sais pas si cela peut avoir un lien avec ces variants du gène GCKR.

M. G. Casimir. – Quel est le rôle des parasites (helminthes) dans la genèse des maladies inflammatoires intestinales. Intérêt des parasites dans le traitement ?

Existe-t-il une différence sexuelle sur le plan génétique sachant l'importance du sexe sur la fréquence et la gravité des maladies inflammatoires chroniques ?

M. D. Franchimont. – Le sex ratio des MICI n'est que de 1.5 (F/H), contrairement à d'autres maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux disséminé ou la myasthénie grave où le sex ratio est beaucoup plus élevé. Dans ces conditions le dimorphisme sexuel génétique et les hormones stéroïdiennes ne doivent que peu influencer le développement de la maladie. Peut-être parce qu'il s'agit plus d'une maladie inflammatoire sensu stricto que auto-immune.

M. E. Louis. – Il existe une relation inverse, au niveau mondial, entre la fréquence de la maladie de Crohn et celle des maladies parasitaires. Une infestation parasitaire active les voies immunitaires TH2. La maladie de Crohn étant une maladie cataloguée (probablement de façon beaucoup trop schématique) TH1, certains chercheurs explorent la possibilité de traiter cette maladie par l'infestation par des parasites ou œufs de parasites normalement non pathogènes pour l'homme. Les résultats du premier essai contrôlé contre placebo chez l'homme dans la rectocolite ulcéro-hémorragique ne sont toutefois pas encourageants.

M. L. Hue. – Vous avez montré très clairement qu'une composante génétique intervenait dans 20 % à 40 % au mieux des maladies inflammatoires de l'intestin, le reste étant attribué à l'environnement et à la flore intestinale en particulier. Au vu de ces chiffres et en ce qui concerne notamment le ciblage thérapeutique, ne serait-il pas plus efficace d'approfondir l'étude de cette composante environnementale ?

M. D. Franchimont. – Le gène G6PT1 (11q23) codant pour la glycogénose 1B, glycogen storage disease type Ib (GSD), n'est pas actuellement identifié comme un gène de susceptibilité de la maladie de Crohn. L'explication de cette association n'est pas encore établie mais de nombreuses études montrent l'importance du métabolisme

des sucres et des lipides dans le fonctionnement des lymphocytes T ou des monocytes/macrophages/cellules dendritiques. Un dérèglement du métabolisme cellulaire de ces cellules immunitaires pourrait entraîner un déficit de la réponse immunitaire innée et/ou adaptative.

M. E. Louis. – Certainement, mais actuellement l'environnement est plus difficile à étudier que le génome. De plus ce qui sera vraiment utile, comme le suggère les modèles animaux, c'est d'étudier la relation entre un terrain génétique particulier, un environnement donné et le développement d'une maladie. Il est probable que des facteurs d'environnement ne soient délétères que dans un contexte génétique particulier et inversement.

*
* *

II

CANCERS DES VOIES AÉRO-DIGESTIVES SUPÉRIEURES : INCIDENCE ÉLEVÉE EN BELGIQUE, NOUVEAU FACTEUR DE RISQUE ET PERSPECTIVES THÉRAPEUTIQUES

par

S. SAUSSEZ (Université de Mons) (*)

1. Définition des cancers des voies aéro-digestives supérieures

Les cancers des voies aéro-digestives supérieures (VADS) constituent un groupe hétérogène de tumeurs caractérisées par une grande agressivité loco-régionale et un pronostic variable (mais en général péjoratif) selon la localisation anatomique. Cette région de la tête et du cou comprend des structures telles que les fosses nasales et les sinus, la cavité orale, le larynx, le pharynx et les glandes salivaires (Fig. 1). Cette distribution, restreinte sur le plan anatomique, est une caractéristique commune de ce groupe de tumeurs dont le comportement et l'histologie sont par ailleurs très variables. Une autre caractéristique propre à ce groupe hétérogène de cancers est l'origine épithéliale des tumeurs qui, en pratique, se traduit par des lésions appelées carcinomes épidermoïdes, lymphoépithéliomes ou carcinomes verruqueux et indifférenciés.

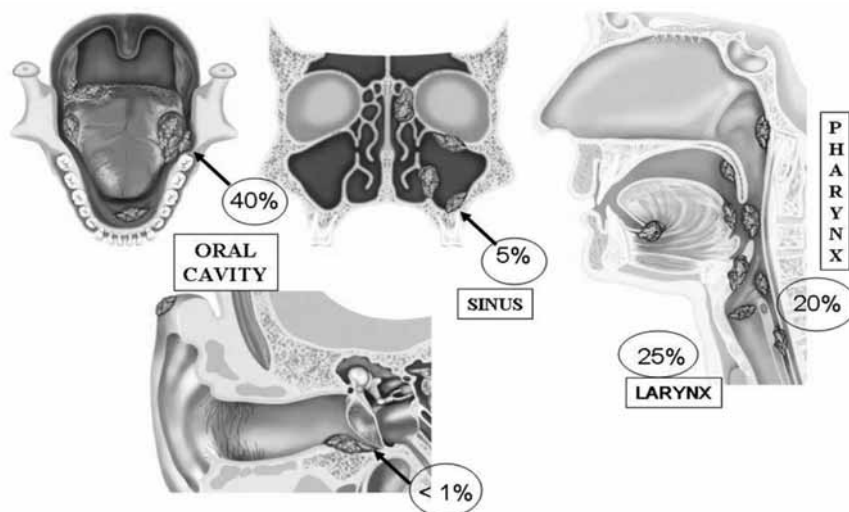


Fig. 1

Schéma illustrant les principales localisations des cancers des VADS et leur fréquence respective.

(*) Invités par le Bureau en vertu de l'article 15 §3 du Règlement.

La genèse des carcinomes épidermoïdes des VADS est un processus long et complexe qui passe par des stades de lésions pré-invasives avant d'aboutir à une lésion invasive caractérisée par l'effraction de la membrane basale (THOMPSON, 2006). On décrit différents types de lésions pré-invasives (dysplasie légère, modérée, sévère, carcinome *in situ*) dont le diagnostic et la classification restent néanmoins sujet à controverses. Ces lésions pré-néoplasiques touchent surtout des hommes de plus de cinquante ans et les facteurs de risque sont identiques à ceux des lésions invasives, en particulier le tabac et l'alcool (THOMPSON, 2006). Les lésions invasives de type carcinome épidermoïde représentent plus de 95 % des cancers des VADS et sont caractérisées par l'effraction de la membrane basale. Elles peuvent présenter trois stades de différenciation :

- 1) des carcinomes épidermoïdes bien différenciés, caractérisés par la conservation d'une architecture proche d'un épithélium normal associée à la présence de zones de kératinisation importantes appelées perles cornées ;
- 2) des carcinomes moyennement différenciés définis par la persistance de liaisons intercellulaires (organisations en cordons) et la disparition progressive des processus de kératinisation ;
- 3) des carcinomes peu différenciés caractérisés par l'absence de liaisons intercellulaires et de kératinisation.

2. Incidence des cancers des VADS dans le monde entier

Le cancer représente la seconde cause de mortalité dans les pays industrialisés. Ainsi, aux USA au cours de l'année 2008, le cancer a touché 1.437.000 personnes parmi lesquelles 565.000 en sont mortes. Les cancers des VADS sont des cancers fréquents dans le monde entier puisque l'on a diagnostiqué 467.000 nouveaux cas chez l'homme et 168.000 chez la femme pour l'année 2008 ; ces chiffres les situent à la sixième place par ordre d'incidence décroissante chez l'homme et la huitième chez la femme. Concernant les VADS, l'analyse des données épidémiologiques mondiales au cours des vingt dernières années permet de constater une tendance à l'augmentation chez la femme, particulièrement en Europe, et à la diminution chez les hommes, surtout aux USA. De plus, il existe d'importantes variations de l'incidence des cancers des VADS selon les continents. En Europe, les cancers des VADS chez la femme sont caractérisés par une augmentation maximale pour les cancers de la cavité buccale et du pharynx (4,3 cas/100000 habitants/année en 1985 contre 5,8 en 2002, et 0,9 contre 1,2 pour les cancers du larynx, respectivement). Parallèlement à cette augmentation européenne, on constate une diminution des cancers des VADS sur le continent asiatique. Les cancers de la cavité buccale et du pharynx connaissent la diminution la plus marquée (6,5 cas/100.000 habitants/année en 1985 et 5 en 2002). Chez l'homme, l'évolution de l'incidence des cancers des VADS de 1985 à 2002 dans le monde entier révèle une légère diminution principalement due à la diminution de l'incidence des cancers du larynx (7,8 cas/100.000 habitants/année en 1985 et 6,8 en 2002). Cette réduction de la survenue des cancers des VADS est également influencée par une très légère

baisse de l'incidence des cancers de la cavité buccale et du pharynx depuis 1996 (22,9 cas/100.000 habitants/année en 1996 et 21,3 en 2002, respectivement). L'Europe connaît les incidences les plus élevées de cancers des VADS (avec un maximum de 29 cas/100000 habitants/année en 1992 et 1996, tous cancers des VADS confondus). On note une très légère tendance à l'augmentation des cancers de la cavité buccale et du pharynx (16,8 cas/100.000 habitants/année en 1985 et 17,9 en 2002), compensée par une tendance à la diminution des cancers du larynx (11 cas/100.000 habitants/année en 1985 et 9,8 en 2002).

3. Incidence des cancers des VADS en Belgique

En Belgique pour l'année 2005, les cancers des VADS se situent à la quatrième place des cancers les plus fréquents chez les hommes et à la huitième chez la femme. On observe une très nette tendance à l'augmentation de leur incidence au fil du temps, avec des différences importantes entre les différentes régions du pays. La comparaison des données de l'année 2005 à celles de l'année 1995 montre que ces cancers sont devenus proportionnellement plus fréquents, puisqu'ils occupaient à cette époque la cinquième et la dixième place, chez l'homme et chez la femme respectivement. La comparaison des incidences régionales des cancers des VADS permet d'observer des différences importantes. Si l'on considère les chiffres de 2004 à 2006, on observe une incidence plus élevée chez l'homme en région wallonne (chiffres 2004 : 43,4 cas pour 100000/habitants/année en région wallonne contre 32,7 et 31,2 pour les régions bruxelloise et flamande chez les hommes ; et 12, 10 et 8,2 chez les femmes, pour les mêmes régions respectivement). En région bruxelloise, l'incidence de ces cancers a tendance à augmenter chez les femmes uniquement. Ainsi, en 2006, la région bruxelloise dépasse nettement les deux autres régions du pays avec 12,9 cas/100.000/habitants/année contre 6,9 et 10,5 pour les régions flamande et wallonne. Concernant les localisations anatomiques de ces cancers, on constate une nette prépondérance des carcinomes de la cavité buccale chez les femmes, où ils représentent en 2005 47 % des cas (234 sur un total de 494 en 2005); ils sont suivis par les cancers du pharynx (25 %) et du larynx (17 %). Chez l'homme, les carcinomes de la cavité buccale et du larynx sont à égalité avec 32 % des cas, étant suivis par les carcinomes du pharynx (25 % des cas).

4. Facteurs de risque connus et modèle de progression tumorale

La consommation de tabac est liée à l'apparition de la plupart des cancers des VADS tandis que l'abus d'alcool est considéré comme un facteur favorisant. L'association des deux augmente significativement le potentiel carcinogène. L'étude d'une grande variété de lésions pré-invasives et invasives ainsi que la détermination des fréquences des altérations génétiques observées à chaque stade du processus de transformation néoplasique ont mené Califano *et coll.* (1996) à proposer un modèle de progression tumorale propre aux carcinomes épidermoïdes des VADS (Fig. 2). Dans les phases les plus précoces, la délétion des bras des chromosomes 9p, 3p, rapidement suivie par celle

du bras du chromosome 17p, semble jouer un rôle prédominant dans l'évolution vers la dysplasie. Dans l'évolution des lésions pré-invasives vers des lésions invasives, des mutations du gène p53 conduisent à une diminution de l'expression de la protéine p53 normale (CALIFANO *et al.*, 1996). Plus de 50 % des cancers des VADS présentent des mutations du gène p53 ce qui correspond généralement à un pronostic défavorable pour ces patients (GEISLER *et al.*, 2002). L'amplification de la cycline D1 et l'inactivation des chromosomes p16 et p17 semblent également impliquées dans l'évolution vers des lésions invasives (CALIFANO *et al.*, 1996).

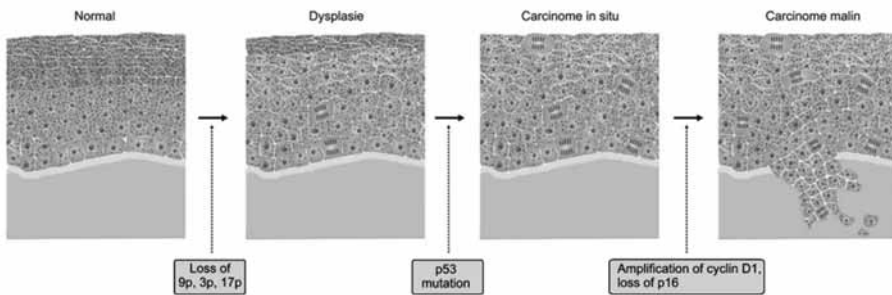


Fig. 2

Schéma illustrant le modèle de progression tumorale des cancers des VADS développé par Califano et collaborateurs.

5. À propos de nouveaux facteurs de risque : rôle(s) des infections à HPV(s) dans la cancérogenèse des cancers des VADS

En Europe et aux USA, l'incidence des cancers de l'oropharynx a augmenté de manière significative au cours des vingt dernières années. Cette augmentation des cancers de l'oropharynx est corrélée à une augmentation de certaines pratiques sexuelles démontrée par un accroissement de 30 % de la séroprévalence de l'herpès simplex de type 2 (FLEMING *et al.*, 1997). Des travaux semblent montrer une relation entre certaines pratiques sexuelles et le développement de cancer de l'oropharynx. Très récemment, une étude épidémiologique comparant 100 patients atteints d'un carcinome épidermoïde de l'oropharynx et 200 patients ne présentant pas de cancer, a clairement montré que le fait d'avoir des pratiques sexuelles avec de multiples partenaires par voie vaginale (> 26 partenaires) et par voie orale (> 6 partenaires) était associé de manière significative au développement d'un cancer de l'oropharynx (odds ratio de 3.1 et 3.4 respectivement) (D'SOUZA *et al.*, 2007). Les mêmes auteurs ont également observé une corrélation entre l'infection à HPV-16 et la survenue d'un cancer de l'oropharynx (odds ratio 14.6). Une étude suédoise a révélé qu'une infection à HPV-16 augmentait radicalement, c'est-à-dire d'environ 200 fois, le risque de cancer de l'oropharynx après correction statistique quant à la consommation

d'alcool et de tabac (HANSSON *et al.*, 2005). Les cancers de l'oropharynx sont les plus concernés par cette carcinogénèse HPV-induite et certains auteurs pensent que les cryptes amygdaliennes sont le lieu propice à la transformation induite par l'HPV (NEUFCEUR *et al.*, 2009). Nos récents travaux sur deux séries cliniques de carcinomes de l'hypopharynx (75 patients au stade IV) et du larynx (67 patients aux stades I, II et IV) ont également révélé une incidence élevée des HPVs oncogènes (82 % et 75 % respectivement) dans ces tumeurs, ce qui suggère l'implication de ces virus dans d'autres localisations que l'oropharynx (ERNOUX-NEUFCEUR *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'incidence des HPVs oncogènes dans une série clinique de 39 cas de lésions bénignes du larynx (nodules, papillomes et laryngites) atteignait également 77 %. La comparaison des charges virales moyennes dans les lésions bénignes larynx et les carcinomes du larynx a permis de montrer que les carcinomes présentaient une charge virale nettement plus élevée, suggérant une infection active chez ces derniers. Dans ces deux séries de cancers de l'hypopharynx et du larynx, les patients porteurs d'un carcinome positif pour un HPV oncogène semblent présenter un pronostic plus défavorable même si cette différence ne s'est pas confirmée sur le plan statistique. Sur une série de 159 cas de carcinomes épidermoïdes de la cavité buccale, l'incidence des HPVs oncogènes était de 43 %. Sur base du statut « HPV », nous observons que les carcinomes HPV+ présentent un pronostic plus défavorable (Fig. 3). En réalisant un modèle de Cox sur toutes les données cliniques étudiées (âge, sexe, stade TNM, différenciation tumorale, tabagisme et alcoolisme, statut HPV), seul le statut HPV présentait une valeur pronostique (Cox, $p=0,01$, statut HPV : $p=0,01$).

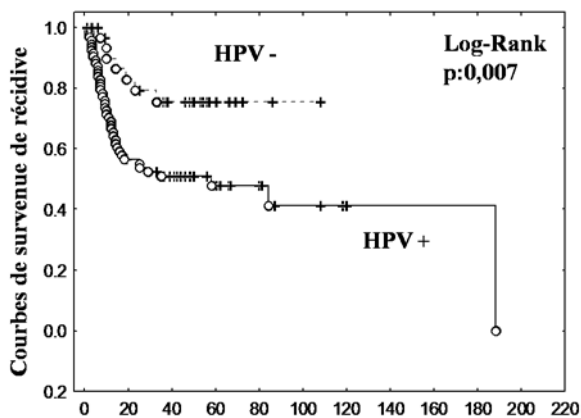


Fig. 3

Courbes de survie de récidence tumorales dans une série de 159 cas de carcinomes de la cavité buccale. Les carcinomes HPV+ présentent un pronostic plus défavorable.

Concernant l'impact de l'infection à HPV sur le pronostic des patients présentant un cancer des VADS, plusieurs études ont montré que le sous-groupe de patients positifs pour l'HPV présentait un meilleur pronostic attribué à une fréquence moins élevée de récurrences (KUMAR *et al.*, 2007). Rosenquist et collaborateurs (2007) ont cependant décrit des résultats contraires puisqu'ils ont montré sur une série de 128 patients souffrant d'un carcinome de l'oropharynx que le groupe HPV positif avait un risque accru de récurrence tumorale et de seconde localisation tumorale. Notre étude sur les carcinomes de la cavité buccale confirme cette valeur pronostique défavorable des infections à HPV.

6. Mode de transmission des HPVs dans les VADS

La question de la transmission des HPVs dans les VADS reste toujours actuellement très débattue. En effet, il est bien établi que les HPVs oncogènes sont impliqués dans la majorité des cas de cancers du col de l'utérus et qu'ils sont transmis par voie sexuelle. A ce propos, le développement récent de la vaccination systématique devrait à moyen et long terme réduire très significativement le nombre de cas de cancer du col. Concernant la transmission des HPVs dans les VADS, différents modes sont discutés. Comme nous l'avons décrit ci-dessus, le sexe par voie orale pourrait constituer un mode de transmission important (D'SOUZA *et al.*, 2007). Cependant la papillomatose laryngée de l'enfant, pathologie où l'infection à HPV joue un rôle primordial, constitue une preuve indirecte qu'il existe d'autres modes de transmission. À ce propos, plusieurs études basées sur un séquençage de l'ADN des HPVs maternels ont montré que la mère était la source de transmission de l'infection par HPV à l'enfant. Dans ce cas de figure, la transmission est dite verticale et se réalise au moment de l'accouchement, *in utero* ou encore en période post-natale. Cependant, d'autres auteurs ont rapporté des bébés infectés oralement par un HPV alors que les mères étaient HPV négatives. De ce cas de figure, le placenta pourrait être une source d'infection. Enfin, le taux de correspondance entre l'HPV maternel et celui de l'enfant varie seulement de 57 à 69 %. Cette observation suggère qu'il existe d'autres sources de contamination post-natales telles que le lait maternel, le contact d'objets ou de mains contaminés (SYRJANEN, 2010). Cette contamination horizontale doit probablement jouer un rôle important pour expliquer une incidence élevée d'HPVs oncogènes (12,5 %) dans une série de 80 patients amygdalotomisés (population allant de 2 à 55 ans). Cette contamination horizontale est évidemment impliquée dans la propagation des verrues cutanées chez l'enfant.

7. Perspectives thérapeutiques

Les cancers des VADS sont diagnostiqués tardivement puisque seulement 30 % des patients présentent une tumeur à un stade débutant (stades I et II) et 70 % des patients souffrent de tumeur à un stade avancé (stades III et IV). Les patients présentant une tumeur à un stade avancé ont un taux de survie à 5 ans faible de 15 à 45 % et bénéficient d'une combinaison de traitements très agressifs. Durant les vingt dernières années, la

prise en charge thérapeutique de ces cancers avancés a connu de nombreux changements. Actuellement, le traitement standard des carcinomes des VADS à un stade avancé (stades III et IV) consiste en une association concomitante d'une radiothérapie et d'une chimiothérapie (radiothérapie 70 grays + cisplatine aux jours 1, 21 et 42) qui peuvent être précédés ou non par une combinaison de trois chimiothérapies néo-adjuvantes (cisplatine, 5-Fluoro-Uracile, Taxol) (FORASTIERE *et al.*, 2003 ; VERMORKEN *et al.*, 2007). Les patients traités par radiochimiothérapie concomitante (RCC) présentent des séquelles importantes et définitives affectant la déglutition (5 à 10 % des patients garderont une sonde de gastrostomie définitive), la voix (dysphonie) et la respiration (allant de la dyspnée d'effort jusqu'à la nécessité de réaliser une trachéotomie) (FORASTIERE *et al.*, 2003 ; VERMORKEN *et al.*, 2007).

Bonner *et coll.* ont montré dans une étude de phase III incluant des cancers des VADS à un stade III ou IV que l'association de la radiothérapie et du cetuximab (une thérapie ciblée anti-EGFR) améliorerait de manière très significative la survie des patients (2006). L'avantage majeur de cette thérapie combinant radiothérapie et cetuximab est la réduction importante des effets secondaires. En effet, le cetuximab est très bien toléré puisqu'il n'engendre qu'une toxicité cutanée (rash acnéiforme) temporaire et proportionnelle à la réponse thérapeutique.

Les études récentes concernant le rôle des HPVs dans la carcinogenèse des VADS poussent à proposer une vaccination des jeunes garçons. Nos résultats montrant la présence de HPVs oncogènes chez de très jeunes enfants amènent à s'interroger sur le moment de cette vaccination. Le problème s'est posé de manière similaire avec le problème des hépatites B induisant des hépatocarcinomes. En effet, il semble qu'une exposition au virus de l'hépatite B à la naissance puisse expliquer un échec de la réponse immunitaire au cours de la vaccination. Chang et ses collaborateurs ont ainsi montré que la réalisation d'une vaccination contre le virus de l'hépatite B dès la naissance avait permis de prévenir l'infection et de réduire l'incidence des hépatocarcinomes à Taiwan (1997).

RÉSUMÉ

Les cancers des voies aéro-digestives supérieures représentent une classe fréquente de maladies malignes dans le monde, étant diagnostiqués d'après les derniers rapports chez 466831 hommes et 168368 femmes pour l'année 2008 ; ces chiffres les situent à la sixième place par ordre d'incidence décroissante chez l'homme et la huitième chez la femme au niveau mondial. On observe par ailleurs une tendance à l'augmentation chez la femme, particulièrement en Europe, et à la diminution chez les hommes, surtout aux USA, au cours des vingt dernières années. En Belgique, par contre, ils se situent à la quatrième place chez les hommes et à la huitième chez la femme, et on observe une très nette tendance à la hausse au fil du temps. Bien qu'un lien causal soit actuellement bien établi entre les HPVs oncogènes et les cancers du col de l'utérus, le rôle de ces virus dans la survenue des cancers des VADS reste discuté. 5 à 65 % de ces cancers seraient induits par les HPVs oncogènes et plus spécifiquement le type 16. C'est l'oropharynx et plus précisément l'amygdale palatine, qui est le site tumoral le plus fréquemment concerné par l'infection à HPV. Une augmentation évidente de la proportion des cancers de l'amygdale (oropharynx) a par ailleurs été observée. Les modalités de transmission ainsi que les voies de signalisations, p53 et pRb, impliquées dans les cancers des VADS semblent similaires à celles décrites dans le cancer du col de l'utérus.

SUMMARY

The squamous cell carcinomas of the upper aero-digestive tracts are frequent cancers, with as much as 466831 and 168368 cases diagnosed in 2008 among men and women in the world, respectively. As such, they make up the sixth most frequent neoplasia among men and the eighth among women. Their frequency shows interesting variations covering the last twenty years, with an ascending tendency among women, which is maximal in Europe, and a descending tendency in men, maximal in the USA. The comparison with the Belgian official data reveals a striking elevation of incidence of these cancers among both sexes. Although the causal link between high-risk HPVs and cervical carcinoma is well-established, the implication of this viral infection in HNSCC remains debatable. 5 % to 65 % of head and neck cancers could be associated with oncogenic HPVs, in particular HPV type 16. The oropharynx – more precisely the tonsil – is the head and neck location presenting the highest incidence of HPV infection. Moreover, a clear increase of tonsillar carcinoma incidence has been described. As observed in cervical carcinomas, HPV positive HNSCCs are sexually transmitted and characterized by alterations of p53 and pRb signalling pathways. New studies regarding HPV status in HNSCCs are warranted to provide a rationale for large scale HPV vaccination in young male populations.

BIBLIOGRAPHIE

1. BONNER J.A., HARARI P.M., GIRALT J., AZARNIA N., SHIN D.M., COHEN R.B., *et al.*, *Radiotherapy plus cetuximab for squamous cell carcinoma of the head and neck*, N. Engl. J. Med., 354, 567-578 (2006).
2. CALIFANO J., VAN DER RIET P., WESTRA W., NAWROZ H., CLAYMAN G., PIANTADOSI S., *et al.*, *Genetic progression model for head and neck cancer : implications for field cancerization*, Cancer Res., 56, 2488-2492 (1996).
3. CHANG M-H., CHEN C-J., LAI M-S., HSU H.M., WU T.C., KONG M.S., *et al.*, *Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children*, N. Engl. J. Med., 336, 1855-1859 (1997).
4. D'SOUZA G., KREIMER A.R., VISCIDI R., PAWLITA M., FAKHRY C., KOCH W.M., *et al.*, *Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer*, N. Engl. J. Med., 356, 1944-1956 (2007).
5. ERNOUX P., ARAFA M., DELVENNE P., SAUSSEZ S., *Implications des papillomavirus humains dans les cancers des voies aéro-digestives supérieures*, Bulletin du Cancer, 96, 941-950 (2009).
6. ERNOUX P., ARAFA M., DECAESTECKER C., CHEVALIER D., LEROY X., DELVENNE P., SAUSSEZ S., *Combined analysis of HPV-DNA, p16, p21 and p53 to predict prognosis in patients with stage IV hypopharyngeal carcinomas*, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 137, 173-181 (Jan. 2011).
7. FLEMING D.T., MACQUILLAN G.M., JOHNSON R.E., NAHMIAS A.J., ARAL S.O., LEE F.K., *et al.*, *Herpes simplex virus type 2 in the United States, 1976 to 1994*, N. Engl. J. Med., 337, 1105-1111 (1997).
8. FORASTIERE A.A., GOEPFERT H., MAOR M., PAJAK T.F., WEBER R., MORISSON W., *et al.*, *Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer*, N. Engl. J. Med., 349, 2091-2098 (2003).
9. KUMAR B., CORDELL K.G., LEE J.S., PRINCE M.E., TRAN H.H., WOLF G.T., *et al.*, *Response to therapy and outcomes in oropharyngeal cancer are associated with biomarkers including human papillomavirus, epidermal growth factor receptor, gender, and smoking*, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 69, 109-111 (2007).
10. ROSENQUIST K., WENNERBERG J., ANNERTZ K., SCHILDT E.B., HANSSON B.G., BLADSTROM A., *et al.*, *Recurrence in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma : human papillomavirus and other risk factors*, Acta Otolaryngol., 127, 980-987 (2007).
11. SYRJANEN S., *Current concepts on human papillomavirus infections in children*, APMIS., 118, 494-509 (2010).
12. VERMORKEN J.B., REMENAR E., VAN HERPEN C., GORLIA T., MESIA R., DEGARDIN M., *et al.*, *Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer*, N. Engl. J. Med., 357, 695.

([1] : Laboratoire d'Anatomie et de Biologie Cellulaire, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Mons, Mons, Belgique.)

([2] : Service d'oto-rhino-laryngologie et chirurgie cervico-faciale, CHU St-Pierre, Rue Haute, Bruxelles, Belgique.)

*

* *

Discussion

M. J. Boniver. – Comment explique-t-on que dans la série étudiée, tous les cas HPV+ sont aussi alcoolo-tabagiques ?

M. S. Saussez. – En réalité, tous les patients de nos séries cliniques (cancers du larynx, de l'hypopharynx et de la cavité buccale) sont alcoolo-tabagiques ; cela signifie donc que les tumeurs HPV+ proviennent de patients alcoolo-tabagiques mais aussi les tumeurs HPV-.

M. M. Hamoir. – Vos données sur les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou liés à une infection HPV sont en contradiction avec les données de la plupart des publications qui relatent une prévalence globale d'environ 25 % de cancers de la tête et du cou liés à l'HPV avec une prévalence plus élevée (environ 40 %) au niveau de l'oropharynx. Les différences trouvées dans la littérature sont probablement liées à la méthode de détection d'HPV. La surexpression de la protéine p16 est considérée comme un marqueur très fiable d'infection à HPV au niveau d'un cancer de la tête et du cou. Cette surexpression est aussi associée à un meilleur pronostic. Il existe une catégorie de patients non fumeurs et non buveurs de boissons alcoolisées avec une surexpression de p16 qui ont clairement une survie nettement supérieure aux autres. Pour le futur, il semblerait donc utile de réaliser des essais cliniques en stratifiant les patients suivant leur status HPV ou de conduire des essais spécifiques pour cette catégorie de patients. Pouvez-vous réagir à ce dernier commentaire et pouvez-vous expliquer pourquoi vos données semblent différentes de la plupart des publications ?»

M. S. Saussez. – Votre question comporte plusieurs parties, je vais donc m'efforcer d'y répondre de manière systématique.

Concernant la corrélation entre l'infection par un ou plusieurs HPVs et le pronostic des patients souffrant d'un cancer des voies aéro-digestives supérieures, je pense qu'il faut rester très prudent avant d'être convaincu que la présence d'un HPV soit associée à un meilleur pronostic. En effet, il y a dans la littérature un certain nombre d'études qui montrent que les tumeurs HPV+ sont de meilleur pronostic (moins de récurrences et une meilleure survie). Il faut également souligner qu'il existe d'autres travaux démontrant une absence de corrélation avec le pronostic, voire tout à fait l'inverse, à savoir que les tumeurs HPV+ seraient de moins bon pronostic. Nos résultats vont dans ce sens et confirment les travaux de Rosenquist (2005 et 2007). De plus, ces études sont difficilement comparables puisque le plus souvent réalisées avec des techniques de détection différentes sur des séries cliniques différant tant sur le plan géographique que sur le plan des facteurs de risque (à savoir le pourcentage de patients alcoolo-tabagiques). Concernant p16, certains travaux ont en effet montré que le sous-groupe p16+ présentait un meilleur pronostic même si cela n'a pas été confirmé pour toutes les études.

En conclusion, je pense qu'il est prématuré d'affirmer que les patients présentant un cancer des VADS HPV+ ont un meilleur pronostic. Par ailleurs, un point essentiel

pour toute étude consacrée à la valeur pronostique des infections à HPV est de décider quel type de technique de détection des HPV sera utilisé.

M. J.-J. Vanderhaeghen. – Pourquoi, les complications tumorales passent-elles de 7 % chez les tabagiques (2 paquets) à cinq fois plus chez les tabagiques alcooliques ?

Cela me rappelle la mise en cause de la TV dans les complications cardiaques alors qu'il s'agissait d'effets indirects sans rapport avec la TV. L'alcoolisme aurait-il des effets directs ou ne s'agit-il que du genre de vie de certains alcooliques tabagiques ? Merci pour votre excellente communication sur les VADS.

M. S. Saussez. – L'alcoolisme a un effet direct sur l'incidence des cancers des VADS. L'alcool est un agent carcinogène reconnu dans la genèse de ces cancers. L'alcool associé au tabac va multiplier le risque de survenue des cancers des VADS.

*
* *

Communications du Bureau

Aux communications du Bureau, le Secrétaire perpétuel annonce le décès du Pr. Maurice Pesez, décédé le 31 décembre 2009, en France, à l'âge de 95 ans. Docteur en Pharmacie et Directeur des services analytiques de Roussel-Uclaf (France) ; il avait été élu correspondant étranger le 19 mai 1979 et promu membre honoraire étranger le 28 mai 1988.

Nous déplorons la disparition du Pr. Jean Blancou, décédé le 10 novembre 2010, à Paris, à l'âge de 74 ans. Directeur général honoraire de l'Organisation mondiale de la Santé animale, il avait été élu Correspondant étranger le 28 novembre 1998. Une minute de silence est observée en mémoire des deux disparus.

Le Secrétaire perpétuel lit une lettre émouvante reçue de la part du Prof. hon. Michel B. Vallotton, de la Faculté de Médecine de Genève - Suisse, qui fait part de ses condoléances à l'Académie, suite au décès du Pr. Alb. de Scoville, décès qu'il a appris tardivement. Il transmet l'expression de toute sa sympathie à la Compagnie pour la perte encourue de cet illustre Secrétaire perpétuel.

Il annonce ensuite des sujets choisis pour l'éventuelle obtention du 28^e Prix Japonais pour l'année 2012.

*
* *

Comité secret

L'Académie se forme ensuite en « Comité secret » et prend connaissance du second tour de scrutin pour l'élection du Secrétaire perpétuel. Le Pr. A. Ferrant a obtenu la quasi-unanimité des voix et il est élu Secrétaire perpétuel en date du 27 novembre 2010. Sa prise en fonction est prévue pour le 1^{er} octobre 2011.

Le Secrétaire perpétuel communique ensuite le résultat des élections de nouveaux membres ordinaires, s'étant déroulées en début de séance.

Elections du second semestre 2010 :

Ont été élus :

- Au titre de **membre ordinaire** :

M^{me} I. Salmon (Anatomo-pathologiste ; U.L.B.) ;

M. Y. Beguin (Hématologie ; U.Lg.) ;

M. J.-L. Vanoverschelde (Cardiologie ; U.C.L.) ;

M. P. Laterre (Anesthésie-Soins intensifs ; U.C.L.).

*

* *

Désignation par les six Sections de leurs président et secrétaire pour l'année 2011 :

- Première Section :	Président	: R. KRAMP
	Secrétaire	: J.-L. BALLIGAND
- Deuxième Section :	Président	: Y. PIRSON
	Secrétaire	: G. FILLET
- Troisième Section :	Président	: J.-C. SCHOEVAERDTS
	Secrétaire	: J. FISSETTE
- Quatrième Section :	Président	: B. VAN DEN EYNDE
	Secrétaire	: M ^{me} F. MEUNIER
- Cinquième Section :	Président	: L. DELATTRE
	Secrétaire	: J. NÈVE
- Sixième Section :	Président	: J.-F. BECKERS
	Secrétaire	: G. MEULEMANS

*

* *

Questions de Concours ordinaires pour la période 2011-2012 :

Question posée par la 1^{re} Section :

« On demande de nouvelles recherches en physiologie moléculaire, cellulaire ou tissulaire » ;

Question posée par la 5^e Section :

1) « On demande de nouvelles recherches dans les domaines de la métabolomique » ;

Clôture de ces concours : 7 janvier 2013.

*
* *

Séance publique du 18 décembre 2010



SÉANCE PUBLIQUE DU 18 DÉCEMBRE 2010

Au Bureau : M. L. Hue, Président ; MM. J. Frühling, Secrétaire perpétuel, P.-P. Pastoret et W.J. Malaisse, premier et second vice-présidents.

Sont présents :

MM. A. Govaerts, J. Christophe, P. Vanderhoeft, Ch. van Ypersele de Strihou, J.-J. Vanderhaeghen, A. Dresse, M. Wéry, membres honoraires ;

MM. M. Lamy, J.-B. Otte, G. Fillet, G. Rousseau, J. Boniver, J.-M. Boeynaems, B. Van den Eynde, A. Ferrant, J. Nève, J.-C. Henquin, A. Scheen, M^{me} Fr. Meunier, membres titulaires.

MM. J. Libert, J. Crommen, D. Lison, S. Louryan, P. Lekeux, J. Klastersky, O. Devuyt, Ch. Delloye, P. Coulie, D. Giet, O. Feron, F. Lemaigre, J.-C. Renauld, membres ordinaires.

*

* *

DISCOURS D'ACCUEIL

par

M. le Pr. L. HUE
Président de l'Académie royale de Médecine de Belgique

Monsieur le Secrétaire perpétuel,
Chers Collègues,
Mesdames et Messieurs,

Comme chaque année en décembre, la séance ordinaire de notre Académie revêt un caractère festif. C'est avec plaisir que je vous y accueille, mais c'est aussi avec admiration que je constate que vous êtes nombreux à vous être déplacés et avoir bravé les rigueurs de notre climat, pourtant réputé tempéré, pour assister à notre séance. Je vous en félicite et vous en suis sincèrement reconnaissant.

Comme le veut la coutume, c'est au Président que revient l'honneur de proposer le programme de cette séance. J'ai choisi de le consacrer à la Génétique et à ses aspects médicaux. Il n'est plus possible à l'heure actuelle d'ignorer la génétique. Elle fait partie intégrante de la matière médicale et des sciences biomédicales, pas seulement comme spécialité à part entière, mais comme élément constitutif de chaque discipline. Elle apporte en effet une nouvelle dimension à la compréhension des phénomènes de la vie puisqu'elle préside au contrôle de l'expression de nos gènes et de nos protéines. De plus, elle a permis d'expliquer les maladies héréditaires monogéniques, c'est-à-dire celles dans lesquelles un seul gène est déficient. Plus récemment elle s'est attaquée à la composante génétique de nombreuses maladies, partant du concept que des gènes de susceptibilité peuvent nous rendre sensibles aux variations de notre environnement et mener ainsi à une réponse pathologique. Je suis persuadé qu'aucun domaine médical n'échappe à la génétique.

Il se trouve que nous avons la chance d'avoir des Collègues particulièrement compétents dans ce domaine, tant au Nord qu'au Sud de notre petit pays qui, il faut le dire, réussit mieux la formation de ses scientifiques que la cohésion nationale. Cette séance de fin d'année était donc l'occasion d'offrir notre tribune à des Collègues qui se sont distingués en génétique. C'est ainsi que j'ai invité le Professeur Jean-Jacques Cassiman de la KULeuven et le Pr. Michel Georges de l'Université de Liège. En acceptant cette invitation, ils nous honorent et je les en remercie.

Le Prof. Jean-Jacques Cassiman est pédiatre et généticien. Il a dirigé le centre de génétique humaine de a KULeuven, créé par le Pr. H Van den Berghe dont il est l'élève. Il a enseigné la Génétique humaine et a dirigé le laboratoire de diagnostic moléculaire, de génétique légale et d'archéologie moléculaire où il s'est distingué par des études

retentissantes de filiation génétique. Il est actuellement Professeur émérite et, comme il l'écrit très à propos, son génome a déjà été transmis à deux générations.

Notre premier orateur est le Professeur Michel Georges. Il est Docteur en Médecine vétérinaire et agrégé de l'enseignement supérieur de l'Université de Liège, et est actuellement Professeur ordinaire de cette même université où il dirige un laboratoire de Génétique animale. Il s'est distingué par la découverte de gènes d'intérêt en médecine vétérinaire. Il a notamment démontré que la délétion du gène exprimant la myostatine expliquait la musculature hors du commun du blanc-bleu belge. Plus récemment il s'est intéressé avec succès aux gènes de susceptibilité des maladies inflammatoires de l'intestin. Le Pr. M Georges a reçu de nombreux prix et notamment le Prix Francqui 2008. Il est également Doctor Honoris Causa de la KULeuven et de l'Université de Guelph en Ontario.

Je leur cède volontiers la parole.

Lectures

I

Le texte de la conférence du Pr. M. Georges n'a pas encore été communiqué et sera joint à une prochaine publication.

RECENT ADVANCES IN DECIPHERING THE GENETIC ARCHITECTURE OF INHERITED PREDISPOSITION TO INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD) AND OTHER COMMON COMPLEX PATHOLOGIES

par

M. GEORGES (U.Lg.), membre ordinaire

Summary

Susceptibility to common disorders such as cancer, diabetes, Alzheimer's, myocardial infarction and inflammatory disorders including IBD, is complex, i.e. influenced by multiple environmental and genetic, possibly interacting, factors. The proportion of disease liability that is inherited can be estimated from the phenotypic concordance between relatives (including twins) and is often found to be high. The heritability of Crohn's disease, for instance, may be as high as 80 %. Until recently, however, the number and nature of genes and DNA variants underlying inherited predisposition has remained elusive. Identifying the corresponding genes is of major interest as it reveals novel potential drug targets, and paves the way towards personalized medicine. Recent advances in experimental (including high-throughput genotyping, sequencing and transcriptome analysis) and statistical genomics are now providing a comprehensive picture of the genetic architecture of common, complex diseases which I will describe specifically for IBD.

II

QUALITY GENETIC SERVICES FOR THE POPULATION, NOW AND IN THE FUTURE

par

J.-J. CASSIMAN (U.Z. - Leuven) (*)

1. Genetic testing

Genetic testing/screening makes use of a variety of technologies to identify inherited modifications of the genetic information of an individual. The technologies used can be cytogenetic, as well as biochemical or immunochemical to verify the composition of DNA, RNA, proteins, carbohydrates and lipids.

The result of this testing can yield different types of information such as : (1) confirmation or exclusion of the diagnosis of a specific disease ; (2) the magnitude of the risk, or its absence, to develop a disease or to adversely react to drugs and environmental factors ; (3) the magnitude of the risk for biological descendants to inherit a defect.

The tests can be performed on individuals, nuclear or extended families. The term screening is usually reserved for the systematic testing of the members of defined populations or high-risk population subgroups, for one or more of the above-mentioned inherited modifications of the genome. As the technology improves and its cost decreases, the genome of individuals can also be screened for a series of related or unrelated inherited variants. Since the composition of the chromosomes and the DNA of an individual are fixed at fertilization, most tests can be done at any stage of life, either before or after birth (pre-implantation diagnosis, all forms of prenatal diagnosis, neonatal and adult testing). In most genetic centres, testing of children will be strictly limited to those cases in which a diagnosis is important for management or therapy.

As a result, the possibilities for testing and screening for genes involved in inherited diseases or susceptibility to diseases have increased spectacularly. In addition, modulators of gene expression – other genes, non-coding DNA sequences, proteins involved in the three dimensional organization of DNA and acquired modifications of DNA – are being identified. This has led to the surprising realization that even environmental factors, such as food components, might modify the DNA function quite dramatically. As a result, most simple tests, as done today, will have to be complemented with tests allowing more precise predictions of the risks, of the progression and of the clinical characteristics of diseases.

(*) Invité par le Bureau en vertu de l'article 15 §3 du Règlement.

High throughput DNA sequencing has also opened a series of new approaches for the identification of individual characteristics, which may be relevant for determining risks to develop diseases or to show variation in the rate at which we metabolize drugs. Indeed, our DNA contains some quite distinct individual variation in its composition. Testing for predispositions to develop particular diseases and pharmacogenetic testing have potential futures, although much research will still be needed before these approaches can be routinely implemented in practice. For example, despite the recent rush of offers from commercial companies, the comprehensive 1000 € genome sequence is not an immediate prospect.

2. Epigenetics : a major cause of variations on the same theme

The fairly simplistic view we had on the composition and function of genomes has also been drastically changed. A whole series of additional mechanisms that regulate the expression of genes have come to light. In recent years it has indeed been shown that the non-coding sequences of the DNA are not the 'junk DNA' they were supposed to be. To give just one example, thousands of miRNAs encoded in introns or in other parts of our DNA, are transcribed and can have dramatic effects on the expression of our genes. Based on this knowledge a new approach for experimental and therapeutic gene silencing (siRNA) has flourished.

In the meantime, we are in the middle of the next revolution in our understanding of how our genes are regulated. For years we have known that during maturation of the male and female gametes, a number of regions in the genome receive a sex specific imprint (mainly by methylation). In the meantime, epigenetic regulation of gene expression has come out of the dark and the epigenetic genome is no longer a study object for 'originals'. While not all authors use the same definition of epigenetics, one can identify different modifications that affect the expression of genes in an epigenetic fashion : methylation of DNA ; methylation, acetylation, phosphorylation or ubiquitination of histone tails ; the use of histone variants ; modified local or higher order chromatin structure. All these epigenetic factors have an impact on DNA replication, recombination, repair and gene expression. During development of the embryo and the foetus, tissue and organ specific epigenetic pattern are established, which play a role in the tissue-specific gene expression patterns.

As people grow older, these epigenetic patterns may change. A nice example is given by studies on identical twins. The epigenetic patterns in somatic tissues in these individuals differ significantly later in life, and these differences are greater in those who were reared apart and lead to differences in the expression of many genes and differences in disease susceptibility. The epigenome is much more susceptible to the effect of external factors than the DNA sequence. This is nicely illustrated by the Wolbachia parasite in drosophila. This parasite can completely revert the sexual development of the flies and even mask lethal mutations. In rats and mice, good evidence exists that epigenetic modifications induced during or after pregnancy can result in changes in the behaviour

of the animals. In humans, many diseases with a genetic predisposition, such as Crohn's disease, cardiac hypertrophy and diabetes, require an exogenous trigger (infection, physical stress etc) before the full blown disease is established. Whether and how these exogenous triggers affect the epigenome remains to be determined. Nutrigenomics, the study of the interaction between genes and nutrition, will undoubtedly play a major role in our understanding of diseases and their prevention in the future.

Epigenetic changes also play a major role in malignancy. A profound loss of global 5-methylcytosine genomic content and discrete areas of dense hypermethylation in promoter sequences of tumour suppressor genes are well known. In addition, modifications of histones have been identified and abnormal chromatin remodelling characterizes many malignancies. The search for the genes responsible for these epigenetic changes is ongoing. The European Epigenome Project Consortium is systematically analyzing the epigenome of the different chromosomes and produces regularly new data.

3. Is genetic testing by internet meaningful ?

In recent years, more than 200 companies have started offering genetic tests directly to the consumer (DTC) over the internet. Nevertheless, most of the tests provided for common diseases are not yet considered to be clinically useful ; moreover, the information provided by most of these DTC companies is to say the least rather poor, incomplete or unintelligible for the patients. The geneticist is particularly well trained to counsel the patient on the appropriateness of a test and the potential impact of the diagnostic results on him/herself and on his/her family members, including the availability of prenatal diagnosis if applicable ; by training he/she is made aware of the heritability of genes and gene defects and the possibilities of prenatal or pre-implantation diagnosis where possible or indicated.

In addition, the geneticist is experienced in confronting ethical issues related to diagnosis, as well as privacy issues which may result from gene testing.

Finally, as therapeutic options become available for rare heritable diseases, it is clear that geneticists will be increasingly involved in the therapy of these diseases.

The question to be debated is therefore : whether internet provided tests can in part or in full replace or complement the services provided by the geneticists through the existing genetic services or whether these Direct To Consumer (DTC) services pose a real threat to the correct and quality of the provision of services to the consumers.

4. Genetic counselling and information for the patients

In view of the gradually increasing possibilities of providing relevant health information through genetic testing, national policy makers have become aware of the fact that this

information should be provided by qualified professionals (Rantanen *et al.* 2008). In addition, since patients and samples are crossing borders more readily than in the past, the need to harmonize the counselling procedures and define minimal quality standards for counselling became necessary. Such minimal criteria for quality counselling have been defined by the participants in the EU-funded Network of Excellence 'EuroGentest', based on surveys of clinical geneticists and on expert advice. In addition to the orally provided information during the counselling, written information which complements the counselling session is required. For this reason, the quality of written patient information was assessed on 14 key issues in 7 different European countries. The results show that in the majority of the leaflets or letters written to the patients, information was missing on what happens after the test, on patient rights, shared decision making and, in particular, on the possible psychological and social effects of genetic testing.

5. The EuroGentest NoE

It is not surprising, in view of the heterogeneous health systems in Europe, that genetic services lack harmonized structures and procedures in the different Member States. Moreover, while based on high quality scientific know-how, they suffer to some extent from technical errors and poor reporting (Ibarretta *et al.* 2004). Similar problems were identified in a more recent study of the preimplantation diagnostic services (Corveleyn *et al.*, 2008). This has been mainly due to a lack of structuring and complementarity at the European level and the absence of a common European objective to provide quality services to all its consumers now and in the future. Diverse and heterogeneous quality schemes, lack of reference systems, have added to the overall disorganization and fragmentation of services.

Nevertheless, genetic services face an ever-increasing number of requests for testing, while widespread susceptibility testing and pharmacogenetic tests are lurking on the horizon.

This combination of a perceived opportunity to become involved in shaping healthcare policy in Europe, as well as the recognition of a need to structure existing services on a more uniform basis, led leading stakeholders within the European genetics community to propose the EuroGentest initiative to the EU in 2004.

The EuroGentest NoE, a Network of Excellence funded for five years under the EU 6th Framework programme by DG research started officially on January 1, 2005 (Cassiman, 2005). Its aims were to develop the necessary infrastructure, tools, resources, guidelines and procedures leading to the establishment of harmonized, quality genetic testing services in Europe, which can interact with, stand as a model for, or help to achieve similar services on other continents.

To achieve these aims, it brought together, in a real long-term partnership, experts and expert genetic centres available in Europe, engaged on different aspects of testing, including researchers and clinical geneticists, small and medium enterprises (SMEs),

testing laboratories, quality management and public health experts, ethicists, lawyers, sociologists, educational authorities and consumers / patient and family organizations (www.EuroGentest.org).

To achieve its aims and efficiently monitor its progress, six themes under which the different units developed their activities were : quality assurance issue ; databases ; clinical genetics and public health ; new technologies ; ethical, legal and social issues ; education and information.

Since the start the EuroGentest NoE has succeeded in becoming a ‘trade mark’ for quality genetic services. International awareness of the existing problems has improved.

The will to remedy and to move to harmonization is present within and outside the NoE. Many tools necessary to allow for these improvements have been developed (Dequeker *et al.* 2009) and have already had a substantial impact on the quality of the services. Moreover, a whole set of 15 new leaflets with information for patients have been developed and translated in 28 languages and are freely available on the website.

It is clearly the intent of the participants to continue this effort in the future, in collaboration with the ESHG (Kristoffersson *et al* 2010).

6. Rare Diseases

At present about 7.000 rare diseases, also called orphan diseases, are known. These are life threatening or chronically invalidating diseases that, according to European legislation, affect less than 5 out of 10.000 Europeans. For Belgium this means that about 65.000 patients and families are confronted with all the implications of a rare disease.

Examples of these are rare metabolic diseases and neuro-muscular diseases, but also rare forms of cancers and cardiovascular diseases. The overall majority of these diseases are genetic. For this reason they are an important proportion of the customers of the genetic centres.

At the request of the EU Commission, all Member States (MS) should develop a National plan for rare Diseases by 2013. In Belgium, the King Baudouin Foundation has set up a ‘Fund Rare Diseases and Orphan drugs’ in which all stakeholders are represented. The Fund aims at creating a coherent policy to improve the medical management and the quality of life of patients affected by a rare disease.

A first series of proposals of ‘The Belgian National Plan for Rare diseases’, such as the creation of a National registry, the identification of expert centres for particular diseases or disease groups, has already been approved by the Minister of Health and will be implemented in 2011. Additional proposals are in preparation.

The European EG 141/2000, states that drugs for the treatment of rare diseases can benefit from a statute as ‘orphan drugs’, which provides the developers with a series

of financial and other incentives to develop and test these treatments. Based on the recommendation of the European agency (EMA), 62 orphan drugs have already been marketed and more than 800 others have received the orphan drug statute.

To monitor the services available in Europe for these diseases and to provide quality controlled information about any aspect of the rare diseases, the Orphanet website has become a quite unique instrument. It will be supported in the near future for its maintenance by different MS.

7. The future role of the geneticist

The completion of the human genome project has definitely increased the understanding of the role of genes in rare and common diseases. Although the primary driving factor in the development of genetic knowledge is undoubtedly research, the main challenge is to ensure that scientific results are adequately translated into validated diagnostic procedures and quality health care. Recent research reports and editorials of leading scientific journals have indicated that many geneticists – researchers and clinical geneticists – are disappointed by the limited results of genome wide association studies (GWAS) considered for a while as 'the' approach to identify disease related genes (Hayden, 2009 ; Scheuner, 2008). While the achievements of the human genome project have been widely acclaimed and its impact on new insights in the function of our genome is unquestionable, confusion has been growing about the role of the new genetics or genomics in medical practice. Uncertainty is also emerging about who will deliver the necessary services in the future 'genomic medicine' and what the precise role of the geneticist might be in this.

The geneticists have always collaborated closely with many medical specialties to establish correct diagnoses. The advent of molecular methods and of genome-based knowledge and the increasing use by other medical disciplines of these methods for establishing individual susceptibilities to the more common diseases, required a rethinking of the role of the geneticists in the management of these diseases. More and more multidisciplinary clinics were set up to allow the patients to benefit optimally from the combined expertise of medical and paramedical personnel from different disciplines. The geneticist can contribute his specific expertise to the best management of the patients.

It is clear that the unique expertise of the geneticists will not only continue but will even increase to be essential in the management of rare and common diseases. As the ongoing genomic research increases our understanding of how diseases are caused and progress, one will be able to more clearly distinguish the *transgenerational (inherited)* aspects of diseases, which fall under the expertise of the geneticist, from the *developmental aspects* of diseases, requiring a multidisciplinary approach (Kosztolanyi and Cassiman, 2010). The role of clinical geneticists in the future should be shaped accordingly while close collaboration with other health professionals with expertise in the *developmental*

aspects will become essential to provide patients with optimal and quality guaranteed management options.

8. In conclusion

While our understanding of how genes contribute to diseases has increased in recent years, at the same time, it has become clear that the complexity of the interactions between different genes and between genes and environmental factors is much more sophisticated than previously suspected.

To provide efficient and high quality services to the European population, it will be necessary to increase the investment in research, while at the same time, with the active participation of all stakeholders, it will be necessary to structure, harmonize and improve the overall quality of these services, while paying substantial attention to issues resulting from testing including legal, health policies and health economic impact, IPR (Intellectual Property Rights), ethical and social questions : confidentiality, informed consent, employment and insurance.

SUMMARY

The possibilities for testing and screening for genes involved in inherited diseases or susceptibility to diseases have increased spectacularly. Combined with a revolution in the availability of sophisticated new technologies for testing, the question arises how will we be able to continue to provide quality services to our customers ? Who will provide these ? Will it be the centres, as we know them today, or will DTC take gradually over this service ? Will the quality criteria, as established today before tests are made available, still be applicable and how will these new services be able to contribute to an increasing and coordinated collection of global information on genetic diversity and on the pathogenic changes in the human genome ? As stated in the Bioethics Convention of the European Council and explicated in the recent recommendations from the House of Lords of the UK on Genomic Medicine, we will need a major effort of the European Commission/of our governments, to implement a series of measures which will allow the correct and quality assured introduction into practice of the genetic knowledge that is being generated. Only then will all individuals and the scientific community be able to benefit from our services.

RÉSUMÉ

Les possibilités d'identifier les gènes responsables de maladies héréditaires ou impliqués dans la susceptibilité aux maladies ont augmenté de façon spectaculaire. Ces connaissances, combinées à une révolution technologique permettant une analyse sophistiquée et performante du génome, nous obligent à nous poser la question de savoir comment nous pouvons continuer à proposer des services de qualité à notre population ? Qui pourra offrir ces services ? Les centres de génétique comme nous les connaissons aujourd'hui ? Ou les services proposés par internet, les 'Direct to Consumer' (DTC) tests prendront-ils la relève ? Les critères de qualité, une condition pour pouvoir offrir des tests aujourd'hui, seront-ils encore d'application ? Comment ces nouveaux services pourront-ils contribuer à la collecte coordonnée d'informations globales sur la diversité génétique et les modifications pathogéniques du génome ? Comme il est déclaré dans la Convention sur la Bioéthique du Conseil de l'Europe et concrétisé dans les recommandations de la 'House of Lords' du Royaume-Uni pour la médecine génomique, nous aurons besoin d'un effort considérable de la Commission européenne et de nos gouvernements afin de mettre en

œuvre une série de mesures permettant l'introduction correcte et de qualité des connaissances croissantes en génétique. Ce n'est qu'à cette condition que la population et la communauté scientifique pourront bénéficier de nos services.

BIBLIOGRAPHIE

1. CASSIMAN J.J., *Eurogentest, a European Network of Excellence aimed at harmonizing genetic testing services*, Eur. J. Hum. Genet., 113, 1103-1105 (2005).
2. CORVELEYN A., MORRIS M.A., DEQUEKER E., SERMON K., LAWFORDDAVIES J., ANTIÑOLO G., SCHMUTZLER A., VANECEK J., NAGELS N., ZIKA E., PALAU F., IBARRETA D., *Provision and Quality Assurance of Preimplantation Genetic Diagnosis in Europe*, Eur. J. Hum. Genet., 16, 290-299 (2008).
3. COVIELLO D., SKIRTON H., WIS N., KENT A., *Genetic testing and counselling in Europe : health professionals current educational provision, needs assessment and potential strategies for the future*, Eur. J. Hum. Genet., 15, 1203-1204 (2007).
4. DEQUEKER E., STUHRMANN M., MORRIS M.A., CASALS T., CASTELLANI C., CLAUSTRES M., CUPPENS H., DES GEORGES M., FEREC C., MACEK M., PIGNATTI P.F., SCHEFFER H., SCHWARTZ M., WITT M., SCHWARZ M., GIRODON E., *Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders - updated European recommendations*, Eur. J. Hum. Genet., 17, 51-65 (2009).
5. HAYDEN E.C., *Genomics shifts focus to rare diseases*, Nature, 461, 458-459 (2009).
6. IBARETTA D., ELLES R., CASSIMAN J.J., RODRIGUEZ-CEREZO E. DEQUEKER E., *Towards quality assurance and harmonization of genetic testing services in the European Union*, Nat. Biotechnol., 22, 1230-1235 (2004).
7. KOSZTOLÁNYI G., CASSIMAN J.J., *The medical geneticist as expert in the transgenerational and developmental aspects of diseases*, Eur. J. Hum. Genet., 18, 1075-1076 (2010).
8. KRISTOFFERSSON U., SCHMIDTKE J., CASSIMAN J.J., Eds, *Quality issues in clinical genetic services*, Springer XXII, (2010), 400 p.
9. RANTANEN E., HIETALA M., KRISTOFFERSSON U., NIPPERT I., SCHMIDTKE J., SEQUEIRO S. J. KÄÄRIÄINEN H., *What is ideal genetic counselling ? A survey of current international guidelines*, Eur. J. Hum. Genet., 16, 445-52 (2008).
10. SCHEUNER M.T., *Delivery of genomic medicine for common chronic adult diseases.*, JAMA, 299, 1320-1334 (2008).

(Centrum Menselijke Erfelijkheid, KULeuven, Belgium.)

*

* *

La séance fut clôturée par une réception qui se déroula ensuite à partir de 12h30.

TABLE DES MATIÈRES

Séance publique du 23 octobre 2010

Lectures

Communications cellulaires et régulation des cellules à insuline, par P. Meda (Département de Physiologie cellulaire et Métabolisme – Genève), invité,	419
Discussion	426

*
* *

Communications du Bureau et correspondance	429
--	-----

*
* *

Comité secret :

– Résultat du premier scrutin pour l'élections du Secrétaire perpétuel	429
– Renouvellement du Bureau pour l'exercice 2011	429

*
* *

Séance publique du 27 novembre 2010

Lectures

Génétique et maladies inflammatoires de l'intestin, par D. Franchimont (U.L.B.) et E. Louis (U.Lg.), invités	435
Discussion	450

Cancers des voies aéro-digestives supérieures: incidence élevée en Belgique, nouveau facteur de risque et perspectives thérapeutiques, par S. Saussez (Université de Mons), invité	453
Discussion	462

*
* *

Communications du Bureau et correspondance	463
--	-----

*
* *

Comité secret :

- Résultat du deuxième tour de vote en vue de l'élection
du nouveau Secrétaire perpétuel 464
- Résultats des élections, second semestre 2010..... 464
- Election des Présidents et Secrétaires des Sections pour l'année 2011 464
- Questions de concours ordinaires (période 2011 – 2012) 465

*
* *

Séance publique du 18 décembre 2010

Lectures

- Discours d'accueil, par M. le Pr. L. Hue,
Président de l'Académie royale de Médecine de Belgique 471
- Recent Advances In Deciphering The Genetic Architecture
Of Inherited Predisposition To Inflammatory Bowel Disease (Ibd)
And Other Common Complex Pathologies,
par M. Georges (U.Lg.), membre ordinaire..... 473
- Quality genetic services for the population, now and in the future
par J.-J. Cassiman (U.Z. - Leuven), invité..... 475

*
* *