

Maladie de Crohn iléale et récursive post-opératoire :

Cohorte prospective du groupe REMIND

Recherche biomédicale interventionnelle

Version N°12 du 01 octobre 2019

Promoteur : REMIND

(Groupe de recherche sur les maladies inflammatoires digestives)

Hôpital St Louis

Scé de Gastroenterologie

1 av Claude Vellefaux

75010 PARIS

Tel : 01 42 49 95 75

Fax : 01 42 49 91 68

Investigateur principal

Pr Matthieu Allez

Equipe AVENIR INSERM U1160

Service de Gastroentérologie

Hôpital Saint Louis, Paris

Email : matthieu.allez@aphp.fr

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION.....	2
1.1. Microflore intestinale et maladie de Crohn.....	3
1.2. Rôle de l'immunité adaptative au cours de la maladie de Crohn.....	4
2. OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	5
2.1. Objectifs principal.....	5
2.2. Critères de jugement principal.....	5
2.3. Objectifs secondaires.....	5
2.4 Critères de jugement secondaires.....	6
3. CRITERES D'ELIGIBILITE.....	6
3.1. Critères d'inclusion.....	6
3.2. Critères de non inclusion.....	6
4. TYPE DE L'ETUDE.....	6
5. CONSENTEMENT – INCLUSION.....	7
6. DEROULEMENT DE L'ETUDE.....	7
6.1. Visite d'inclusion.....	7
6.2. Prélèvements à l'occasion de l'intervention.....	7
6.3. Visite lors de la coloscopie réalisée à 6 mois de l'intervention (M6).....	7
7. GESTION DES PRELEVEMENTS.....	7
7.1. Prélèvements et stockage.....	8
7.1.1. Prélèvements le jour de l'intervention chirurgicale.....	8
7.1.2. Prélèvements lors de la coloscopie à 6 mois.....	9
7.1.3. Gestion des prélèvements au sein du CRB du CHU de Nice.....	9
7.2. Envoi et distribution.....	10
8. TECHNIQUES EXPERIMENTALES.....	11
8.1. Recherche de bactéries AIEC : Pathogénie Bactérienne Intestinale, Clermont-Ferrand.....	11
8.2. Analyse du transcriptome, INSERM U1160, Hôpital St Louis.....	11
8.3. Analyses moléculaires, INSERM U1157, UPMC Saint-Antoine.....	12
8.4. Analyses du répertoire des lymphocytes T, INSERM U1160, Hôpital St Louis.....	13
8.5. Recherche d'autres bactéries pathogènes, INSERM Robert Debré.....	13
8.6. Caractérisation génétique.....	13
8.7. Validation génétique du biomarqueur AIEC.....	13
8.8. Analyse métagénomique de l'ADN bactérien.....	15
8.9. Analyse immuno-histochimique.....	15
8.10. Evolution à long terme des patients.....	15
9. DUREE DES INCLUSIONS.....	16
10. NOMBRE DE CENTRES PARTICIPANTS.....	16
11. ASPECTS STATISTIQUES.....	16
12. SURVEILLANCE DE L'ETUDE.....	16
13. MONITORING DE L'ETUDE.....	16
13.1. Organisation générale.....	16
13.2. Visites de monitoring.....	17
14. ASPECTS ETHIQUES ET REGLEMENTAIRES.....	17
13.3. Soumission au CPP et à l'ANSM.....	17
13.4. Amendement au protocole de l'étude et extension de l'étude.....	17
13.5. Documentation de l'étude.....	17
13.6. Notice d'information du patient et consentement.....	17
13.7. Transcription des données.....	18
13.8. Responsabilité.....	18
13.9. Archivage.....	18
13.10. Rapport final.....	18
15. REFERENCES.....	18
16. FIGURES.....	21
17. ANNEXE- CENTRES PARTICIPANTS.....	22

1 INTRODUCTION

La maladie de Crohn (MC) est caractérisée par une réponse immunitaire inadaptée et non contrôlée vis-à-vis de la flore intestinale. Les mécanismes conduisant à cette activation excessive de la réponse immune mettent en jeu l'immunité innée et l'immunité adaptative. La cause exacte de ces pathologies n'est pas établie, mais il existe clairement une susceptibilité génétique et des facteurs environnementaux. A l'heure actuelle, plus de 30 gènes de susceptibilité associés à la MC ont été identifiés. Ces différents gènes montrent le rôle de l'immunité innée, de l'épithélium intestinal, de l'immunité adaptative et de l'autophagie (Xavier and Rioux).

Près de trois quarts des patients souffrant d'une MC doivent subir une résection intestinale au cours de l'évolution de leur maladie. Dans une étude de cohorte récente portant sur 314 patients (suivi médian de 13 ans), le risque cumulé de première chirurgie était de 49% à 10 ans et 64% à 30 ans (Dhillon S et al, 2008). La chirurgie permet souvent d'obtenir une rémission durable mais le risque de récurrence est important sur le long terme. Après résection iléocolique curative (exérèse de tous les segments macroscopiquement atteints) et en l'absence de traitement, le risque de récurrence clinique est évalué à 20-30% à 1 an, puis d'environ 10% par an. Cette récurrence clinique est toujours précédée d'une récurrence endoscopique. Celle-ci est beaucoup plus fréquente, estimée à 80%, et est le plus souvent localisée sur l'iléon néoterminal. La récurrence post-opératoire de la MC pose donc un problème thérapeutique fréquent au cours de la prise en charge des patients atteints de MC.

L'iléocolonoscopie est considérée comme le gold standard du diagnostic de la récurrence post-opératoire, appréciant la sévérité endoscopique et prédisant l'évolution clinique de la maladie (Caprilli et al, 2006 ; 55 : 36-58 ; ECCO consensus revised in 2008, in press). Des études ont montré que la sévérité de la récurrence endoscopique permet de prédire le risque de récurrence clinique (Rutgeerts et al, 1990). Un score décrivant la récurrence iléale après résection iléocolique droite a été proposé par Rutgeerts et al en 1990. Ce score comporte 5 stades : i0- absence des lésions, i1- ulcérations iléales aphtoïdes peu nombreuses (<5), i2- ulcérations aphtoïdes multiples avec muqueuse intercalaire normale, i3 – iléite aphtoïde diffuse avec muqueuse intercalaire inflammatoire et stade i4 – iléite diffuse avec des ulcérations plus larges, nodules et/ou sténose.

Le consensus ECCO recommande la réalisation de l'iléocolonoscopie dans l'année suivant la résection chirurgicale. L'iléocolonoscopie est donc réalisée si son résultat peut influencer la décision thérapeutique (Caprilli et al, Gut 2006 ; 55 : 36-58 ; ECCO consensus revised in 2008, in press). Différents traitements ont été évalués pour prévenir la récurrence clinique. Les dérivés salicylés et les thiopurines ont montré une certaine efficacité. La stratégie actuelle, retenue dans nos centres, consiste à réaliser une coloscopie 6 mois après l'intervention chirurgicale et d'adapter le traitement suivant la sévérité des lésions.

1.1 Microflore intestinale et maladie de Crohn

La microflore intestinale humaine est composée de 10^{14} bactéries et est extrêmement biodiverse (plus d'un millier d'espèces bactériennes différentes) (Backhed *et al.* 2005). Cette masse biotique joue un rôle majeur dans les fonctions gastro-intestinales de l'hôte tout en utilisant à son avantage des produits de ce métabolisme définissant ainsi un mutualisme. Ces bactéries se répartissent tout le long du tube digestif selon des concentrations croissantes depuis des parties hautes jusqu'au côlon distal. L'utilisation d'outils moléculaires a montré l'existence de trois phyla bactériens majeurs, Firmicutes, Bacteroidetes et Actinobacteria (Eckburg *et al.* 2005), retrouvées chez tous les individus. Cette biomasse est soumise à un système constitué de récepteurs présents à la surface (TLRs) (Anderson 2000) et dans les cellules (NODs) épithéliales et dendritiques (Strober *et al.* 2006), reconnaissant spécifiquement des motifs moléculaires portés par les micro-organismes (lipopolysaccharide, muramyl dipeptide, peptidoglycane, flagelline, ADN CpG, etc...). Au cours de la MC, la microflore joue un rôle délétère pro-inflammatoire. De nombreux arguments cliniques et expérimentaux illustrent ce fait tels que la nécessité d'une microflore intestinale pour l'expression de la quasi-totalité des modèles animaux de colites (Kuhn *et al.* 1993; Ehrhardt *et al.* 1997), la topographie des lésions préférentiellement iléales et coliques lieux des concentrations bactériennes les plus élevées (10^{11} à 10^{12} bactéries/g de matière). Les arguments cliniques les plus convaincants sont observés dans le modèle de la récurrence postopératoire qui ne s'observe que si le flux fécal est maintenu sur l'anastomose ou si on instille le liquide iléal dans sa totalité mais pas si on instille un filtrat du liquide iléal (Rutgeerts *et al.* 1991; D'Haens *et al.* 1998). Enfin, des différences significatives existent entre la microflore intestinale de sujets sains et celle de sujets atteints de MC définissant ainsi le terme de dysbiose (Sokol *et al.* 2008). Des arguments convergents montrent que cette dysbiose est caractérisée par :

-1) la présence d'une proportion importante (20%) de bactéries non habituellement résidentes du tube digestif (Seksik *et al.* 2003; Sokol *et al.* 2006)

-2) d'une diminution des Firmicutes qui se trouvent diminués à la fois en nombre d'espèces appartenant à ce phylum (biodiversité) mais aussi en proportion (Manichanh *et al.* 2006; Sokol *et al.* 2006; Frank *et al.* 2007). *Faecalibacterium prausnitzii* est l'une des espèces les plus représentatives des Firmicutes dans le côlon humain. Nous avons récemment montré sur un petit nombre de malade atteints de MC qu'une faible proportion de *F. prausnitzii* au moment de la résection de la région iléo-caecale était associée à un taux plus élevé de récurrences endoscopique post-opératoires précoces chez les patients atteints de MC iléale (Sokol *et al.* 2008). De plus, sur des modèles cellulaires *in vitro* et dans un modèle de colite inflammatoire induite par l'acide Trinitrobenzène sulfonique, *F. prausnitzii* présente des propriétés anti-inflammatoires liées à un métabolite sécrété dans le surnageant de culture (Sokol *et al.* 2008).

-3) par la présence d'un pathovar particulier d'*Escherichia coli* (Darfeuille-Michaud *et al.* 1998; Darfeuille-Michaud *et al.* 2004).

La muqueuse iléale des patients atteints de MC est anormalement colonisée par des souches de *Escherichia coli* ayant les propriétés d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales en culture (Darfeuille-Michaud *et al.* 1998). Ces souches sont également capables de survivre et de se multiplier fortement en macrophages sans induire de mort cellulaire et les macrophages infectés sécrètent des taux élevés de TNF-Alpha. Sur la base de ce phénotype et de l'absence de déterminants génétiques présents chez les autres souches de *E. coli* responsables d'infections intestinales, un nouveau pathovar de *E. coli*, associé à la MC, a été défini et dénommé AIEC pour « Adherent-Invasive *E. coli* » (Boudeau *et al.* 1999; Glasser *et al.* 2001). La prévalence des AIEC au niveau des lésions iléales s'élève à 36,4% chez les patients atteints de MC contre seulement 6,2% chez les contrôles (Darfeuille-Michaud *et al.* 2004). De plus, les bactéries

AIEC potentialisent une inflammation colique induite au DSS en modèle murin, et augmentent l'expression des récepteurs de l'immunité innée TLR5 et IPAF reconnaissant la flagelline (Carvalho *et al.* 2008).

Des résultats récents montrent que la souche AIEC de référence LF82 est capable d'adhérer à la bordure en brosse d'entérocytes iléaux isolés de patients atteints de MC suite à la reconnaissance du récepteur de l'hôte CEACAM6 par les pili de type 1 variants exprimés par les bactéries AIEC (Barnich *et al.* 2007). La protéine CEACAM6 est un antigène à pied d'ancrage glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) appartenant à la super famille des immunoglobulines. Cette protéine est normalement exprimée au niveau du côlon, des poumons et de la rate (Kuespert *et al.* 2006). Le récepteur CEACAM6 est surexprimé au niveau iléal chez environ 35% de patients atteints de MC, pouvant expliquer la forte prévalence de souches AIEC associées à la muqueuse iléale chez les patients (Darfeuille-Michaud *et al.* 2004; Barnich *et al.* 2007). De plus, un état inflammatoire et/ou une infection par la souche AIEC LF82 induisent une augmentation de l'expression du récepteur CEACAM6 dans des cellules épithéliales intestinales Caco-2 en culture.

Ces résultats suggèrent que chez des patients prédisposés exprimant anormalement le récepteur CEACAM6 au niveau iléal, les bactéries AIEC seraient capables de promouvoir et/ou de potentialiser leur propre colonisation de l'épithélium intestinal. Après avoir colonisé la muqueuse iléale, les bactéries AIEC pourraient franchir la barrière intestinale, être phagocytées puis se multiplier dans les macrophages résidents de la *lamina propria* en induisant une forte sécrétion de cytokine pro-inflammatoire TNF- α , pouvant conduire à l'augmentation de l'expression du récepteur CEACAM6 (Abraham et Cho, 2007). Chez les patients atteints de MC, il existerait donc une boucle de colonisation/inflammation car les bactéries AIEC, mais également les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IFN- γ , induisent une surexpression du récepteur CEACAM6 au niveau de la muqueuse iléale.

1.2 Rôle de l'immunité adaptative au cours de la maladie de Crohn

Les lymphocytes T ont un rôle bien démontré dans les modèles murins d'inflammation non contrôlée et dans les MICI. Au cours de la MC, il existe une activation excessive de cellules T effectrices et un probable défaut d'activation et/ou de fonction de cellules T aux propriétés régulatrices. Ainsi, il existe dans la muqueuse inflammatoire, une production exagérée de médiateurs pro-inflammatoires (cytokines, chemokines) associée à l'activation excessive de lymphocytes T impliqués dans la réponse immune non contrôlée. Un grand nombre de ces médiateurs sont produits par les lymphocytes T et/ou conduisent à leur activation. L'activation des lymphocytes T dépend de leur activation à travers leur récepteur spécifique des antigènes (TCR) et de signaux de co-stimulation. Nous avons montré que des lymphocytes T CD4+ effecteurs (Th1, cytotoxiques) sont activés au cours de la MC à travers la voie NKG2D. Des travaux en cours dans notre laboratoire démontrent que ces lymphocytes T CD4+ effecteurs reconnaissent un nombre limité d'antigènes. Notre hypothèse est que de manière globale les lymphocytes T effecteurs au cours de la MC reconnaissent un nombre limité d'antigènes et que cette reconnaissance à travers le TCR est importante pour leur développement et leur activation. Il a été démontré que les lymphocytes T isolés de la muqueuse intestinale des patients atteints de MC avaient un répertoire restreint par rapport à des sujets contrôles.

Compte tenu des données montrant le rôle clé de la flore intestinale dans la MC, nous faisons également l'hypothèse que les antigènes reconnus par les lymphocytes T effecteurs soient d'origine bactérienne. Des anticorps dirigés contre des produits d'origine bactérienne ou fongique sont souvent identifiés dans le sérum des patients atteints de MC. Ceci démontre le lien entre ces antigènes et le système immunitaire adaptatif.

Notre objectif est d'étudier et de comparer le répertoire des lymphocytes T des patients opérés d'une MC, aussi bien au niveau de la muqueuse inflammatoire que du sang périphérique, au moment de l'intervention chirurgicale et six mois plus tard. Nous vérifierons ainsi : - si le répertoire des lymphocytes T du sang périphérique est modifié après exérèse des zones inflammatoires, - si la récurrence est corrélée au degré de restriction antigénique, et – si la restriction antigénique est comparable à celle observée au moment de l'intervention.

Cette étude multicentrique porte sur la récurrence post-opératoire, sa prédiction à partir d'éléments observés sur des prélèvements de la muqueuse intestinale lésée au cours de l'intervention, sa liaison avec les mêmes éléments observés lors de l'endoscopie réalisée 6 mois après le rétablissement de continuité. L'étude des souches bactériennes spécifiques citées, combinée à l'analyse du répertoire antigénique des lymphocytes T devrait nous permettre de confirmer et de mieux comprendre le rôle de chacun de ces composants de la flore et de l'hôte dans l'immunopathologie de la maladie de Crohn. Une proportion importante des patients atteints de MC ont plusieurs interventions chirurgicales au cours de leur vie. Les analyses effectuées dans cette étude pourraient permettre de mieux identifier les patients à risque et d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques.

2 OBJECTIFS DE L'ETUDE

2.1 Objectif principal

- Définir une classification de la maladie de Crohn iléale en prenant en compte les paramètres cliniques, immunologiques, génétiques, et les données relatives au microbiote, et au transcriptome.
- Etudier la récurrence post-opératoire en prenant en compte les paramètres cliniques, immunologiques, génétiques, et les données relatives au microbiote, et au transcriptome.

2.2 Critères de jugement principal

La récurrence endoscopique est évaluée à 6 mois de l'intervention chirurgicale par une iléocoloscopie avec évaluation du score de Rutgeerts et description des lésions élémentaires.

2.3 Objectifs secondaires

- Evaluer l'efficacité des traitements prescrits en post-opératoire sur la récurrence à 6 mois et à long-terme
- Identifier des biomarqueurs permettant de prédire la récurrence post-opératoire et la réponse aux différents traitements prescrits.
- Approfondir les connaissances sur la physiopathologie de la récurrence post-opératoire
- Définir le rôle du microbiote en incluant les AIEC (Adherent and invasive *E. Coli*) et *F. prausnitzii* dans la récurrence post-opératoire

2.4 Description des analyses

- Recueil des données associées aux éventuelles rechutes survenant entre 6 et 18 mois après la chirurgie. La survenue d'une rechute sera définie par une intensification thérapeutique secondaire à une rechute endoscopique ou une nouvelle chirurgie.

- Analyse histologique : analyse de la structure tissulaire en zone iléale inflammatoire et non inflammatoire à M0 (sur la pièce opératoire) et à M6 (sur biopsies iléales)

- Analyse moléculaire : Extraction de l'ADN (à partir du sang ou des biopsies iléales) pour établissement du génotype des patients et analyse sur microarray

- Analyses microbiologiques :

. Extraction des AIEC (Adherent and invasive *E. Coli*) à M0 et M6 (sur biopsies), et mise en culture pour analyse des propriétés d'adhésion, de migration dans les cellules Int-407, et de survie en présence de macrophages THP-1.

. Détermination de la composition bactérienne à M0 et M6 (sur biopsies) par séquençage (MiSeq, Illumina et Qiime pipeline)

- Analyse immunologique :

. Détermination du phénotype des cellules immunitaires à M0 sur prélèvement sanguin et fragment de muqueuse iléale fraîche par cytométrie de flux.

. Détermination du répertoire des cellules T : Analyse des récepteurs aux cellules T par séquençage de l'ADN extrait des biopsies à M0 et M6 avec des amorces spécifiques (Adaptative Biotechnology Inc., Seattle, Washington, USA)

- Intégration des données : classification moléculaire de la maladie de Crohn, détermination d'éventuels gènes de régulation, détermination d'une éventuelle relation entre le transcriptome et le microbiote, identification d'éventuelles voies de signalisation de l'inflammation dans le tube digestif

3 CRITERES D'ELIGIBILITE

3.1 Critères d'inclusion:

- Age \geq 18 ans
- Diagnostic certain de MC (score diagnostic de Lenard-Jones)
- MC iléale ou iléo-caecale nécessitant une résection chirurgicale
- Consentement écrit de participation à l'étude
- Patient affilié à un régime de sécurité sociale ou CMU

3.2 Critères de non inclusion

- Personnes dans l'incapacité de comprendre, de lire et/ou de signer un consentement éclairé.
- Mise en évidence de lésion dysplasique sur les prélèvements biopsiques
- Femmes enceintes

4 TYPE DE L'ETUDE

Etude clinico-biologique interventionnelle, à visée physiopathologique, sans bénéfice individuel direct.

Cette étude, prospective et multicentrique, est réalisée chez des patients ayant une maladie de Crohn iléale nécessitant une résection chirurgicale.

5 CONSENTEMENT - INCLUSION

L'inclusion dans l'étude est réalisée lors d'une hospitalisation pour résection iléo-cæcale.

L'investigateur informe le patient sur les objectifs et la nature des contraintes de l'étude. Il remet au patient la notice d'information.

Lors de la visite d'inclusion, le médecin investigateur vérifie les critères d'éligibilité. Si le patient donne son accord de participation, le patient et l'investigateur inscrivent leur nom en clair, datent et signent le formulaire de consentement.

L'original du consentement signé est conservé par l'investigateur pendant la durée de l'étude et est ensuite archivé pour une durée de 15 ans après la fin de l'étude. Une copie du consentement est remise au patient. Une deuxième copie est gardée par l'investigateur principal, et la troisième copie est adressée sous scellée au promoteur de l'étude.

6 DEROULEMENT DE L'ETUDE

6.1 Visite d'inclusion :

Réalisée dans le mois précédent l'intervention, voire le jour de l'intervention

- Vérification des critères d'éligibilité
- Examen clinique
- Remise de la notice d'information de l'étude, ainsi que de l'information spécifique de la SFED concernant la coloscopie
- Obtention de la signature du consentement,
- Recueil des antécédents cliniques
- Recueil des données démographiques
- Transcription des traitements en cours ou antérieurs
- Envoi d'un fax d'inclusion

6.2 Prélèvements à l'occasion de l'intervention :

- Prélèvements biologiques : sang, et fragments de pièce opératoire (voir la description des prélèvements dans le paragraphe 7.1.1)
- Envoi d'un fax informant de la réalisation des prélèvements

La prescription ou non d'un traitement de fond post-opératoire, sera faite selon la pratique habituelle de chaque centre, avec l'aide d'un algorithme pré-défini. Dans le cas d'une prescription de traitement, les informations relatives à ce dernier seront recueillies dans l'e-CRF.

6.3 Visite lors de la coloscopie réalisée à 6 mois de l'intervention (M6)

- Consultation médicale avec recueil de la symptomatologie et des événements notables au cours des 6 derniers mois, des traitements éventuels en cours ou au cours des 6 derniers mois.
- La coloscopie sera réalisée sous anesthésie générale (voir fiche d'information remise au patient en annexe) lors d'une hospitalisation de jour après préparation colique selon la pratique habituelle.

- **Iléo coloscopie** : Des biopsies iléales, et coliques supplémentaires sont réalisées à l'occasion de l'iléocoloscopie - voir la description des prélèvements dans le paragraphe 7.1.2

7 GESTION DES PRELEVEMENTS

7.1 Prélèvements et stockage

7.1.1 Prélèvements le jour de l'intervention chirurgicale

- Prélèvements sanguins :
 - 1 tube sec (5ml) destiné à la constitution de la sérothèque (-80°C après centrifugation).
 - 1 tube EDTA de 7 ml sera conservé à -80° et sera utilisé pour les études génétiques.
 - 1 tube paxgene 2,5 ml conservés à -80°C pour analyse du transcriptome des cellules mononuclées du sang

- Prélèvements sur la pièce opératoire :

La pièce de résection est traitée aussi rapidement que possible. Les prélèvements sont effectués au niveau de l'iléon sur la partie lésée, sur des zones non ulcérées, au mieux sur les berges d'ulcération, et au niveau du colon.

- Deux fragments de muqueuse d'une surface d'environ 1 cm² sont découpés en zone malade, puis placés dans un milieu spécial (contenant du glycérol), et congelés à -80°C.
- Un fragment de muqueuse sur la limite proximale iléale sera placé dans un milieu contenant du glycérol et congelé à -80°C
- 1 fragment de paroi de 1 cm² (muqueuse + musculéuse + séreuse), découpé en zone malade, sera placé dans du formol, à température ambiante
- 1 fragment de paroi de 1 cm² (muqueuse + musculéuse + séreuse), découpé au niveau de la limite proximale iléale, sera placé dans du formol, à température ambiante
- 9 biopsies de la muqueuse iléale (prélèvement avec une pince à biopsie)
 - 4 en zone malade, en RNALater (4 tubes séparés), congelés à -80°C
 - 2 au niveau de la limite proximale iléale, en RNALater (2 tubes séparés), congelés à -80°C
 - 3 en tube sec (3 tubes séparés), congelés à -80°C
- 4 biopsies de la muqueuse colique (prélèvement avec une pince à biopsie)
 - 2 en RNALater (2 tubes séparés), congelés à -80°C
 - 2 en tubes secs (2 tubes séparés), congelés à -80°C
- Deux biopsies du mésentère :

- 1 en RNALater, congelé à -80°C
- 1 en tube sec, congelé à -80°C

Les prélèvements, à l'exception des échantillons en Formol, sont stockés sur site, et des envois groupés (carboglace) sont organisés une fois tous les 3 mois vers le CRB du CHU de Nice pour centralisation des prélèvements.

Les échantillons en Formol sont stockés à température ambiante, et envoyés le plus rapidement possible (48h maximum), au service d'Anapathologie de l'hôpital Beaujon.

7.1.2 Prélèvements lors de la coloscopie à 6 mois :

- Prélèvements sanguins :
 - 1 tube sec (5ml) destiné à la constitution de la sérothèque (-80°C après centrifugation).
 - 1 tube paxgene 2,5 ml conservés à -80°C pour analyse du transcriptome des cellules mononuclées du sang
- 8 biopsies iléales supplémentaires sont réalisées à l'occasion de l'iléo coloscopie à 6 mois et seront conditionnées comme suit :
 - 2 en Glycérol (2 tubes séparés), congelés à -80°C
 - 2 en RNALater (2 tubes séparés), congelés à -80°C
 - 2 en tubes secs (2 tubes séparés), congelés à -80°C
 - 2 en formol (2 tubes séparés), à température ambiante

Remarque : Les biopsies doivent être réalisées dans l'iléon néo-terminal, au plus près de l'anastomose (mais pas sur l'anastomose), quelque soit la sévérité des lésions éventuelles.

- 3 biopsies coliques supplémentaires :
 - 1 en RNALater, congelé à -80°C
 - 2 en tubes secs (2 tubes séparés), congelés à -80°C

Les prélèvements, à l'exception des échantillons en Formol, sont stockés sur site et des envois groupés (carboglace) sont organisés une fois tous les 3 mois vers le CRB du CHU de Nice pour centralisation des prélèvements.

Les échantillons en Formol sont stockés à température ambiante, et envoyés le plus rapidement possible (48h maximum), au service d'Anapathologie de l'hôpital Beaujon.

7.1.3 Gestion des prélèvements au sein du CRB du CHU de Nice

La biobanque du CHU de Nice (CHUN-CAL-UNSA) sous la responsabilité de Paul Hofmann a été créée en septembre 2004 (www.biobank06.com) et labellisée CRB par l'INSERM en 2007. La biobanque du CHUN est intégrée architecturalement dans les locaux du laboratoire de Pathologie Clinique et Expérimentale (LPCE) du CHU de Nice. Ces prélèvements seront stockés au sein de la biobanque CHU Nice et seront détruit au terme de 15 ans s'ils n'ont pas été utilisés.

La biobanque du CHUN s'est engagée depuis 2008 dans une démarche de certification selon la norme AFNOR (96S). Les différentes procédures répondant aux exigences du GBEA sont établies depuis l'ouverture de la tumorothèque. Un ingénieur spécialisé est responsable de l'assurance qualité.

Gestion du Projet POP-REMIND au sein de la Biobanque du CHU de Nice

Une convention de partenariat entre REMIND et le DRCVI du CHUN est établie. L'activité sera déclarée à la CNIL, à l'ARH et au Ministère de la Recherche, et sera aussi signalée au comité scientifique de la biobanque du CHUN, et au CPP du CHUN, en plus de la déclaration au CPP de l'AP-HP. En effet s'agissant d'une nouvelle collection venant d'établissements extérieurs, ces différentes démarches sont nécessaires pour l'accueil des échantillons.

La traçabilité, sécurisation et gestion des échantillons seront assurées au sein de la biobanque du pavillon J de l'hôpital Pasteur du CHU de Nice (www.biobank06.com). L'ensemble des échantillons sera enregistré dans la base de données Créalys (Alphélys, France) qui gère les différentes collections du CRB du CHU de Nice. Un congélateur – 80°C dédié au projet REMIND sera à disposition au sein de la salle de cryoconservation. Les prélèvements seront sous la responsabilité des personnes adressant les prélèvements jusqu'à l'arrivée dans le CRB. Puis ces prélèvements seront sous la responsabilité du CRB de Nice jusqu'au déstockage. Le transporteur sera sélectionné par le responsable du projet REMIND. Une fiche de traçabilité établie par le CRB du CHUN associé à un MTA accompagnera l'envoi des échantillons vers les expérimentateurs. Dès réception, les expérimentateurs devront tenir informé le CRB de l'arrivée des échantillons. Le déstockage des échantillons se fera dans un délai de 15 jours suivant la demande de l'expérimentateur.

7.2 Envoi et distribution

Les prélèvements stockés dans le service d'Anatomie pathologique de CHU de NICE seront dirigés vers les laboratoires spécialisés à leur demande sous la forme d'envois groupés avec l'accord du conseil scientifique :

Prélèvements à envoyer	Destination
Fragment de pièce opératoire et biopsie à 6 mois, congelés dans DMEM contenant du glycérol	USC-INRA 2018 – Clermont Ferrand
Un tube RNALater M0 et un tube RNALater M6	AVENIR - INSERM U 1160, Hôpital Saint Louis, Paris
Un tube sec M0 et un tube sec M6	INSERM U1157, UPMC, Hôpital Saint Antoine, Paris
Un tube EDTA congelé	INSERM U843, Hôpital Robert Debré, Paris

Les prélèvements non utilisés pourront être stockés pendant une période maximale de 15 ans. Après 15 ans, ces prélèvements seront détruits.

8 TECHNIQUES EXPERIMENTALES

8.1 Recherche de bactéries AIEC : Pathogénie Bactérienne Intestinale, Clermont-Ferrand

La recherche de bactéries AIEC parmi les bactéries de la flore adhérente sera effectuée par traitement de la biopsie au vortex en tampon PBS pour dissocier les bactéries associées à la surface de la muqueuse. Après dilutions de la suspension bactérienne résultante de raison 10 jusqu'à 10^{-8} , les bactéries seront dénombrées sur gélose sélective Drigalski.

La recherche de bactéries AIEC internalisées dans la biopsie sera effectuée par transfert de la biopsie précédemment utilisée pour analyse des bactéries adhérentes en milieu de culture cellulaire MEM additionné de gentamicine (100 µg/ml). Une incubation de 1 heure à 37°C permet de tuer les bactéries extracellulaires. Un traitement à l'Ultra-Turax et l'addition de Triton 1X pendant 15 minutes seront effectués pour permettre une lyse cellulaire et la libération des bactéries internalisées. Après dilutions de raison 10 jusqu'à 10^{-2} , les bactéries seront dénombrées sur gélose sélective Drigalski.

Un stockage à -80°C et à -20°C des bactéries adhérentes et internalisées sera réalisé par repiquage de 48 colonies bactériennes issues de la flore adhérente et de 48 colonies bactériennes correspondant aux bactéries internalisées en microplaques 96 puits en milieu Luria-Bertani additionné de 15% glycérol pour chaque biopsie.

L'analyse du pouvoir invasif sera étudiée sur cellules épithéliales intestinales en culture Intestine-407. Une première analyse sera réalisée par technique microméthode pour sélectionner les deux colonies les plus invasives parmi les 96 colonies bactériennes isolées.

Après identification bactérienne, les capacités de survie et multiplication en macrophages J774 des bactéries invasives seront déterminées comme décrit précédemment (Glasser et coll., Infect Immun 2001).

L'index d'invasion sera ensuite déterminé par test macrométhode comme décrit précédemment (Boudeau *et al.* 1999). Ensuite, les capacités de survie et multiplication en macrophages J774-A1 des bactéries invasives seront déterminées comme décrit précédemment (Glasser *et al.* 2001). Seront considérées comme bactéries AIEC les souches de *E. coli* ayant un index d'invasion supérieur ou égal à 0,1 par rapport à l'inoculum initial et ayant la capacité de survivre et multiplication en macrophages (% de survie en macrophages supérieur ou égal à 100).

8.2 Analyse du transcriptome, INSERM U1160, Hôpital Saint Louis:

L'objectif de cette analyse est de déterminer le profil d'expression des gènes au moment de la chirurgie et d'identifier d'éventuels gènes dont l'expression pourrait prédire une récurrence de la maladie 6 mois plus tard.

Des prélèvements sont réalisés sur la pièce opératoire et lors de l'endoscopie six mois après la chirurgie (biopsies iléales en zone inflammatoire et non inflammatoire, immédiatement conservées dans du RNALater). Après extraction de l'ARN des échantillons selon le protocole standard d'extraction d'ARN à partir de tissu, l'analyse globale du transcriptome est réalisée sur une puce 3' Affymetrix (Human Genome U133 PLUS 2.0 Array). Une classification hiérarchique non supervisée des patients est faite selon le profil d'expression des gènes.

8.3 Analyses moléculaires, INSERM U1157, UPMC Saint-Antoine

La composition du microbiote sera déterminée par une méthode moléculaire de PCR quantitative en temps réel ciblant les gènes des ARN ribosomiaux 16S bactériens

Extraction d'ADN bactérien

A partir d'une biopsie prélevée au niveau de la zone inflammatoire sur la pièce opératoire le jour de la chirurgie ou d'une biopsie iléale à M6, le protocole d'extraction d'ADN utilise le Kit G'NOME (BIO 101, Inc., 1070 Joshua Way, Vista, CA 92083 USA). Une fragmentation cellulaire mécanique est ensuite réalisée par deux passages successifs de 5 minutes au « mini Bead Beater 16 cell disruptor » (BioSpec products Inc POB 788, Bartlesville, OK 74005) après addition de 750µl de billes de verre 0.1mm (Fisher bioblock scientific). Une série de centrifugations à 20000G et de lavages utilisant successivement le PolyVinylPolyPirrolydone, l'isopropanol froid à -20°C et d'Ethanol 100% froid (-20°C) permet d'achever l'extraction d'ADN total. Le culot est repris dans du tampon TE (10mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA), et l'échantillon stocké à -20°C.

PCR quantitatives ciblant l'ADN 16S.

La PCR quantitative est réalisée (STRATAGENE MX 3000) sur plaque 96 puits pour qPCR (Applied Biosystem). Les échantillons d'ADN fécal sont décongelés à 4°C, dilués au 1/10000^{ème} puis déposés (10 µl) en duplicate. Les amorces utilisées (cf tableau ci-dessous) ciblent les groupes suivants : *Clostridium coccoïdes*, *Bacteroides*, *Clostridium leptum*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus*, *Escherichia coli*, et *Faecalibacterium prausnitzii*.

Cible		amorces	Sequence 5'- 3'
<i>Bacteria</i> (*)		F_Bact 1369	CGG TGA ATA CGT TCC CGG
		R_Prok1492	TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T
		P_TM1389F	6FAM-CTT GTA CAC ACC GCC CGT C
<i>C. leptum</i> group	<i>C. leptum</i>	Clept 09	CCT TCC GTG CCG SAG TTA
	<i>R. albus</i> , <i>R. flavefaciens</i>	Clept 08	GAA TTA AAC CAC ATA CTC CAC TGC TT
	<i>F. prausnitzii</i>	P-Clep 01	6FAM-CAC AAT AAG TAA TCC ACC
<i>Bifidobacterium</i> species	<i>Bifidobacterium</i>	F_Bifid 09c	CGG GTG AGT AAT GCG TGA CC
		R_Bifid 06	TGA TAG GAC GCG ACC CCA
		P_Bifid	6FAM-CTC CTG GAA ACG GGT G
<i>C. coccoïdes</i> group	<i>C. coccoïdes</i>	Ccoc 07	GAC GCC GCG TGA AGG A
	<i>Eubacterium</i>	Ccoc14	AGC CCC AGC CTT TCA CAT C
	<i>Butyrivibrio</i>	P_Erec482	VIC-CGG TAC CTG ACT AAG AAG
<i>Bacteroides</i> group	<i>Bacteroides</i>	Bacter 11	CCT WCG ATG GAT AGG GGT T
		Bacter 08	CAC GCT ACT TGG CTG GTT CAG
		P_Bac303	VIC-AAG GTC CCC CAC ATT G
<i>E. coli</i>		E.coli F	CAT GCC GCG TGT ATG AAG AA
Species		E.coli R	CGG GTA ACG TCA ATG AGC AAA

<i>F. prausnitzii</i>	<i>F. prausnitzii</i>	Fprau 07	CCA TGA ATT GCC TTC AAA ACT GTT
Species		Fprau 02	GAG CCT CAG CGT CAG TTG GT
<i>Lactobacillus/</i>		Lacto 05	AGC AGT AGG GAA TCT TCC A
<i>Leuconostoc</i> group		Lacto 04	CGC CAC TGG TGT TCY TCC ATA TA

Les résultats en Ct sont rendus par le logiciel Mx Pro. Le seuil de fluorescence est déterminé par la fluorescence du ROX, fixé à 0.02. Un programme de calcul sous Excel permet de calculer la quantité de bactérie par gramme d'échantillon. Le calcul intègre les Ct, la masse de l'échantillon ayant servi à l'extraction et le nombre de gène d'ADN 16s présent dans la bactérie.

8.4 Analyses du répertoire des lymphocytes T, INSERM U1160, Hôpital Saint-Louis

L'extraction d'ARN sera réalisée à partir des biopsies. Le répertoire des lymphocytes T sera réalisé par une analyse de l'immunoscope. Cette analyse permet une étude de la diversité des populations lymphocytaires T par l'analyse de la taille de la région CDR3 de la chaîne beta qui, à la jonction des fragments Vb - Db - Jb prend contact plus spécifiquement avec le peptide antigénique. En pratique, cette approche est réalisée par une première amplification quantitative (qPCR) des régions CDR3 à l'aide d'amorces spécifiques de chacune des 24 familles Vb et d'une amorce correspondante à la région constante Cb puis une seconde amplification à l'aide d'une amorce Cb interne fluorescente. Le polymorphisme de taille des produits d'amplification fluorescents est analysé par électrophorèse capillaire (séquenceur DNA Applied Biosystems 3100 Avant).

8.5 Recherche d'autres bactéries pathogènes, INSERM Robert Debré, Paris

Il a été rapporté à plusieurs reprises que des bactéries pathogènes peuvent être responsables de MC. Si ce sujet reste débattu, il apparaît cependant souhaitable de monitorer la présence de ces bactéries pathogènes chez les malades lors de ce travail. Les bactéries pathogènes incriminées ont rarement été identifiées par culture directe et la méthode la plus souvent utilisée est la recherche d'ADN bactérien par PCR. Les bactéries du genre *Yersinia*, *Helicobacter* et *Mycobacterium avium* paratuberculosis seront recherchées. En bref, après extraction d'ADN à partir des biopsies iléales, mésentériques, des séquences spécifiques de chaque espèce seront recherchées par PCR. Les contrôles positifs seront des cultures de souches caractérisées et disponibles. Les contrôles négatifs seront constitués de fragments biopsiques issus de pièces d'appendicectomies.

8.6 Caractérisation génétique

Afin de mieux caractériser la maladie, et afin d'envisager la présence ou non de gènes permettant de prédire la survenue d'une récurrence, des analyses génétiques et la recherche de bactéries pathogènes précédemment décrites comme associées à la MC seront réalisées. L'ADN circulant sera extrait à partir du sang prélevé en tube EDTA. Le séquençage de l'exome total et des études d'association de large échelle (GWAS) seront réalisés.

Les résultats obtenus seront corrélés aux autres analyses biologiques réalisées au moment de la chirurgie et lors de l'endoscopie de contrôle à 6 mois.

8.7 Validation génétique du biomarqueur AIEC.

L'ensemble des données cliniques et histologiques des sujets inclus sont traitées et analysées, afin de donner une description statistique de la population retenue et de comparer les caractéristiques des différents groupes histologiques et phénotypiques. Les recherches porteront

aussi sur des biomarqueurs génétiques humains trouvés dans l'ADN présent dans les selles afin de faire des corrélations entre le microbiote intestinal et les biomarqueurs humains.

8.8 Analyse métagénomique de l'ADN bactérien.

En parallèle, une analyse métagénomique de l'ADN bactérien, extraits à partir des échantillons fécaux, a été réalisée par le collaborateur « ENTEROME », selon les étapes ci-dessous sur les échantillons fécaux de quelques patients de la cohorte :

Etape 1 : Extraction de l'ADN bactérien : les échantillons ont été lysés en présence d'inhibiteurs de DNase par des méthodes à la fois chimiques et mécaniques pour obtenir une représentation homogène de toutes les espèces bactériennes. Une série d'extractions a été utilisée pour éliminer les débris cellulaires, les protéines, les composés aromatiques et l'ARN. L'ADN a été récupéré par précipitation à l'éthanol et une première estimation de la concentration et de la qualité de l'ADN extrait est réalisée.

L'analyse métagénomique quantitative nécessite de façon optimale 10-15 µg d'ADN de haut poids moléculaire (>80% des fragments doivent être > 10kb).

Basé sur la qualité et la quantité de matériel initial, une estimation a été réalisée permettant de savoir si une préparation de la librairie est faisable ou non.

Etape 2 : Préparation de la librairie : de façon à permettre de séquencer les échantillons d'ADN, le matériel initial doit être traité suivant un protocole standard pour produire des librairies. Pour ce faire, une librairie de fragments bar codés est préparée pour chaque échantillon. Ceci inclut le cisaillement de l'ADN dans un système Covaris S2, la réparation des extrémités des fragments cisailés, l'accrochage des adaptateurs de séquençage contenant jusqu'à 96 code-barres uniques pour chaque échantillon à manipuler, l'amplification de la librairie par PCR, la sélection basée sur la taille par élution différentielle, la quantification de la librairie par PCR. Les échantillons sont alors prêts à entrer dans le protocole de séquençage.

La préparation de la librairie nécessite 2 µg de matériel récupéré après cisaillement : ceci dépend de la qualité de matériel initial. Une telle quantité de matériel initiale va permettre la construction de librairies avec un nombre minimal de cycles de PCR (idéalement 5 cycles), de façon à limiter tout biais introduit pendant cette étape. La taille moyenne des fragments d'ADN constituant les librairies ainsi constituées doit être supérieure à 150 bases.

Etape 3 : Séquençage par la technique SOLiD : Les données de séquençage sont générées par la plateforme MetaQuant (INRA) grâce à des séquenceurs 5500xl. La librairie d'ADN est fixée à des billes magnétiques qui vont la purifier. Ces billes sont ensuite chargées sur un support permettant l'introduction des réactifs de séquençage dont les marqueurs fluorescents qui réalisent la réaction de séquençage chimique sur l'ADN fixé. A la fin de chaque cycle chimique, la couleur fluorescente résultante pour chacune des environ 2 millions de billes est ensuite lue par le séquenceur.

Le séquençage est réalisé par "ligation-extension". Une série de 5 amorces oligonucléotidiques est utilisée pour séquencer 50 bases en réalisant 10 cycles de ligation pour chaque oligonucléotide. Un total de 50 cycles est réalisé pour des tags de 50 bases auxquels s'ajoutent 10 cycles pour le décodage d'échantillons multiplexés avec des code-barres de 10-bases. Dans tous les cas, chaque cycle permet de décoder 2 nucléotides adjacents, résultant en une précision améliorée via le fait que chaque base est couverte deux fois. Les échantillons barcodés sont également séquencés à partir d'une amorce interne pour discriminer et séparer les séquences des librairies individuelles. Un minimum de 40 million de "cadres de lecture" (ou reads) de bonne qualité devrait alors être généré pour chaque librairie métagénomique séquencée.

Etape 4 : Analyse bioinformatique et biostatistique : L'existence de catalogue de référence des gènes microbiens intestinaux contenant plus de 3.3 millions de gènes et le développement d'outils bioinformatiques permettent d'analyser ces bibliothèques et de déterminer la présence et la fréquence des gènes microbiens présents dans les échantillons de selle et qui reflètent le microbiote intestinal. Un profil métagénomique d'abondance de gènes est généré pour chaque échantillon. A partir de ces profils d'abondance, des outils bioinformatiques permettent d'identifier les quelques gènes seulement qui varient de façon la plus significative en terme de fréquence. Ces gènes constituent la « signature métagénomique » qui est utilisée comme outil diagnostique ou prédictif, ou de stratification...etc.

8.9 Analyse immuno-histochimique.

Une analyse histologique à M0 et M6 sera réalisée à partir des prélèvements fixés en formol, et inclus en paraffine, intitulés par les préleveurs: B-berge inflammatoire et I-marge proximale iléale.

Plusieurs items d'analyse seront évalués sur coupes colorées par l'hématéine et éosine safran (liste consensuelle des items d'analyse histologique prévue sur chaque échantillon de paroi iléale à M0 (validée par le Pr JF Fléjou et le Dr D Cazals-Hatem)) :

A M0 : un fragment de paroi de 1cm de coté au minimum, au niveau de la zone inflammatoire, sera prélevé sur la pièce opératoire, comprenant muqueuse + musculuse + séreuse (échantillon de toute la paroi) envoyé en formol sous 48h maximum au Département de Pathologie ; Hôpital Beaujon.

Un autre fragment de paroi de 1cm de coté au minimum, au niveau de la zone non inflammatoire, sera prélevé également sur la pièce opératoire, comprenant muqueuse + musculuse + séreuse (échantillon de toute la paroi) envoyé en formol, de la même façon, sous 48h maximum au Département de Pathologie ; Hôpital Beaujon.

A M6 : 2 biopsies seront prélevées au niveau de l'anastomose et envoyées sous 48h maximum au Département de Pathologie ; Hôpital Beaujon

L'existence ou non en histologie d'une plexite inflammatoire sur la marge iléale proximale pourra, entre autre, être déterminée.

8.10 Evolution à long terme des patients

- Population d'intérêt : patients inclus dans POP-REMIND depuis au moins 18 mois et revus en consultation par leur médecin référent dans leur centre d'inclusion dans le cadre de la prise en charge habituelle.
- Les données suivantes seront recueillies sur une fiche remplie lors de la consultation par le médecin référent : données cliniques ; modification ou optimisation du traitement ; consommation de tabac ; survenue d'une rechute ; données d'examen(s) endoscopique(s) ; données d'examen(s) radiologique(s) ; survenue d'une complication (abcès, manifestation occlusive, lésions anopérinéale) ; intervention chirurgicale
- L'analyse statistique portera sur l'évaluation du critère de jugement principal et sur les critères de jugement secondaires

Critère d'évaluation principale : Survenue d'une rechute

La rechute sera définie par : Une intensification thérapeutique : modification ou optimisation thérapeutique secondaire à des symptômes ou à une rechute endoscopique/à l'imagerie, ou une complication : Abscès/Manifestation occlusive/Lésions anopérinéale, ou une nouvelle chirurgie

9 DUREE DES INCLUSIONS

Les inclusions seront réalisées jusqu'au recrutement des 575 patients nécessaires pour l'étude (cf. calcul d'effectif : paragraphe 11)

10 NOMBRE DE CENTRES PARTICIPANTS

Les centres participants sont agréés par le GETAID et ont la capacité de stocker les prélèvements de façon sécurisée au sein de laboratoire de recherche. La liste des médecins investigateurs et équipes participants est indiquée en annexe.

11 ASPECTS STATISTIQUES

Calcul du nombre de sujets

Le nombre estimé de patient avait initialement été calculé sur la partie concernant le rôle des souches E.Coli adhérentes et invasives (AIEC), avec une estimation de prévalence des souches AIEC chez les patients atteints de maladie de Crohn sans rechute de 22%.

Sur l'analyse de réévaluation réalisée sur 121 patients, la prévalence observée de souches AIEC chez les patients sans rechute était inférieure à celle attendue (18%). Par ailleurs il a été observé près de 25% de patients pour lesquels le critère de jugement portant sur la récurrence endoscopique n'était pas obtenu (20% perdus de vue et 5% exclus pour délai de réalisation de coloscopie > 1 an).

Au vue de ces 2 éléments, selon les mêmes caractéristiques statistiques initialement posées (augmentation relative de la fréquence des 2/3 au test bilatéral au risque de première espèce de 5% et une puissance de 80%) le nombre de sujets nécessaires est réévalué à 575 patients.

12 SURVEILLANCE DE L'ETUDE

Conseil scientifique

Le conseil scientifique de l'étude est constitué des mêmes membres que celui de l'association REMIND, promoteur de l'étude, et se réunit deux fois par an (en suivant les directives des associations Loi 1901). Il s'assure de la bonne marche de l'étude, du respect du protocole, et du respect des règles d'éthiques en cours d'étude. Il s'informe de l'état d'avancement de l'étude, des problèmes cliniques et biologiques et des résultats. Il décide toute modification pertinente du protocole nécessaire à la poursuite de l'étude. Il informe le promoteur de l'avancement de

Le conseil scientifique définit et veille à l'application des règles de publication et de la valorisation industrielle des résultats.

13 MONITORING DE L'ETUDE

13.1 Organisation générale

Le monitoring des données sera assuré par REMIND sous la responsabilité du conseil scientifique. A tout moment, les membres du conseil scientifique ou l'investigateur coordinateur, Pr Matthieu Allez, peuvent être contactés pour toute question relative au protocole, à son application pratique ou aux conduites à tenir devant certains événements.

13.2 Visites de monitoring

L'étude sera contrôlée par des visites sur site, des transmissions de courriers et de fax, et des appels téléphoniques réguliers. La validation des données portera sur 100% des données clés (consentement éclairé, dates de visites, de prélèvements, d'événements, des données biologiques et d'événements indésirables graves). Les données du patient seront consultées dans le respect de la confidentialité et du secret professionnel.

Un appel téléphonique sera effectué par le MRC de l'étude, tous les 2 mois, à chaque centre pour l'envoi et la centralisation des tubes.

Une visite de suivi sera effectuée dans tous les centres tous les 6 mois pour valider toutes les données en cours d'étude.

Une attention particulière sera accordée lors de ces visites à la qualité des prélèvements et notamment aux conditions de stockage sur site, aux conditions thermiques lors du transport vers et au départ du Service d'Anatomie pathologique du CHU de Nice, et du stockage à ce niveau.

A la fin des inclusions, le MRC se déplacera dans chacun des centres pour valider les données, pour vérifier que tous les prélèvements ont été bien envoyés et pour fermer le centre.

14 ASPECTS ETHIQUES ET REGLEMENTAIRES

14.1 Soumission au CPP et à l'ANSM

L'investigateur coordonnateur de l'étude a soumis ce protocole au Comité de Protection des Personnes Ile de France IV de l'Hôpital Saint Louis le 22 août 2009 avec l'article L.1123-6 de la loi Huriet ainsi qu'à l'ANSM (anciennement AFSSAPS), le 22 octobre 2009. Les avis favorables de ces instances administratives sont demandés par l'investigateur principal et le promoteur avant le début de l'étude.

Le promoteur et l'investigateur coordonnateur signeront conjointement le protocole et les annexes (notice d'information et de consentement) qui auront été avalisés par le CPP.

14.2 Amendement au protocole de l'étude et extension de l'étude

Il n'y aura pas d'altération ou de changement à ce protocole sans accord de l'ensemble des investigateurs et du promoteur. En cas d'un tel accord, les modifications prévues devront faire l'objet d'un amendement qui sera joint au protocole. Tout amendement au protocole de l'étude devra être notifié au CPP par le coordonnateur si les altérations prévues modifient les aspects éthiques ou médico-scientifiques de l'étude (critères d'évaluation, adjonction d'un nouveau centre, ...). Des modifications mineures d'ordre administratif ne nécessitent pas un nouvel avis du CPP.

14.3 Documentation de l'étude

Avant de commencer l'étude, l'investigateur fournira aux représentants du promoteur une copie de son curriculum vitae personnel ainsi que de ceux de ses co-investigateurs. Il s'engagera à respecter les obligations de la loi Huriet, les termes de la Déclaration d'Helsinki, à mener cette étude selon les Bonnes Pratiques Cliniques (BPC) et selon le protocole.

14.4 Notice d'information du patient et consentement

Les patients ne pourront pas participer à cette étude que s'ils ont donné leur consentement écrit. Au préalable, ils auront reçu une information de la part de leur médecin référent sur le but de cette étude, les procédures qui seront suivies, et la confidentialité des données. L'ensemble de ces informations est résumé sur une note d'information remise à chaque patient. Les

formulaire de consentement seront signés en trois exemplaires par le patient et par l'investigateur. Une copie de ce document sera remise à la personne participant à l'étude, l'investigateur devra garder le deuxième exemplaire dans ses archives pendant un minimum de 15 ans ; le troisième exemplaire sera remis à la fin de l'étude au promoteur sous enveloppe scellée.

14.5 Transcription des données

Toutes les données requises par le protocole doivent être fournies, et une explication donnée pour chaque donnée manquante. Les données seront transférées dans un cahier d'observation électronique (e-CRF) au fur et à mesure qu'elles seront obtenues, qu'il s'agisse de données cliniques ou paracliniques.

Un numéro unique sera attribué à chaque patient et permettra son identification :

N° de centre ___ / N° d'inclusion dans la recherche ___ / Initiales patient ___ (nom, prénom)

14.6 Responsabilité

REMIND est le promoteur de cette étude. En accord avec la loi Huriet, une assurance a été contractée auprès du groupe SHAM couvrant sa responsabilité civile pour les dommages potentiels qui pourraient survenir à des sujets participant à cette étude sous le contrat N°132.009

L'ensemble des renseignements concernant les sujets sera traité de façon anonyme en étant couverts par le secret médical. Les données recueillies pour l'étude font l'objet d'un traitement informatisé déclaré à la Commission Nationale Informatique et Liberté (CNIL).

14.7 Archivage

Toutes les observations seront conservées par l'investigateur pendant 15 ans. Le promoteur gardera un duplicata de ces informations pendant 15 ans également.

14.8 Rapport final

REMIND est propriétaire des données et aucune utilisation ou transmission à un tiers ne peut être effectuée sans son accord préalable.

15 REFERENCES

- Allez M, Mayer L. Regulatory T cells: peace keepers in the gut. *Inflamm Bowel Dis.* 2004; 10:666-76.
- Allez M, Tieng V, Nakazawa A, et al. CD4+ NKG2D+ T cells in Crohn's disease mediate inflammatory and cytotoxic responses through MICA interactions. *Gastroenterology* 2007; 132:2346-2358.
- Anderson, KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 13-9.
- Backhed, F., R. E. Ley, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005; 307: 1915-20.
- Barnich, N., F. A. Carvalho, et al. "CEACAM6 as receptor of Adherent-Invasive Escherichia coli supports ileal mucosa colonization in Crohn's disease patients. *Journal of Clinical Investigation* 2007;117:1566-74.

- Barrett JC, Hansoul S, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet.* 2008; 40:955-62.
- Boudeau, J., A. L. Glasser, et al. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* 1999; 67: 4499-509.
- Brimnes J, Allez M, Dotan I, Shao L, Nakazawa A, Mayer L. Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. *J Immunol* 2005; 174:5814-22.
- Caprilli R, Gassul MA, et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease : Special situations. *Gut* 2006; 55:36-58
- Carvalho, F. A., N. Barnich, et al. Crohn's disease-associated *Escherichia coli* LF82 aggravates colitis in injured mouse colon via signaling by flagellin. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 1051-60.
- Darfeuille-Michaud, A., C. Neut, et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998; 115: 1405-13.
- Darfeuille-Michaud, A., J. Boudeau, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; 127: 412-21.
- Darfeuille-Michaud, A., J. Boudeau, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; 127: 412-21.
- D'Haens, G. R., K. Geboes, et al. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology* 1998; 114: 262-7.
- Dotan I, Allez M, Nakazawa A, et al. Intestinal epithelial cells from inflammatory bowel disease patients preferentially stimulate CD4+ T cells to proliferate and secrete interferon-gamma. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292:G1630-40.
- Eckburg, P. B., E. M. Bik, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308: 1635-8.
- Ehrhardt, R. O., B. R. Ludviksson, et al. Induction and prevention of colonic inflammation in IL-2-deficient mice. *J Immunol* 1997; 158: 566-73.
- Frank, D. N., A. L. St Amand, et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 ; 104:13780-5
- Garrett WS, Lord GM et al. Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell.* 2007 ;131:33-45
- Glasser, A. L., J. Boudeau, et al. Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect Immun* 2001; 69: 5529-37.
- Kuespert, K., S. Pils, et al. CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18: 565-71.

- Kuhn, R., J. Lohler, et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993; 75: 263-74.
- Manichanh, C., L. Rigottier-Gois, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 2006; 55: 205-11.
- Probert CS, Saubermann LJ, Balk S, Blumberg RS. Repertoire of the alpha beta T-cell receptor in the intestine. *Immunol Rev.* 2007; 215:215-25.
- Rutgeerts, P., K. Goboos, et al. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet* 1991; 338: 771-4.
- Sartor, R. B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2008; 134: 577-94.
- Seksik, P., L. Rigottier-Gois, et al. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003; 52: 237-42.
- Sokol, H., B. Pigneur, et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 16731-6.
- Sokol, H., C. Lay, et al. Analysis of bacterial bowel communities of IBD patients: What has it revealed? *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 858-867.
- Sokol, H., P. Seksik, et al. Specificities of the Fecal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2006; 12: 106-111.
- Strober, W., P. J. Murray, et al. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 9-20

REMIND

16 FIGURES

Figure 1: Implication des AIEC dans la MC chez les patients prédisposés exprimant CEACAM6 au niveau de l'épithélium iléal (Sartor 2008).

