



HAL
open science

Implication de facteurs génétiques dans le développement de l'hépatopathie alcoolique et la réponse au traitement

Romain Buttolo

► **To cite this version:**

Romain Buttolo. Implication de facteurs génétiques dans le développement de l'hépatopathie alcoolique et la réponse au traitement. *Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]*. 2018. hal-01723057

HAL Id: hal-01723057

<https://ephe.hal.science/hal-01723057>

Submitted on 6 Mar 2018

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

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



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté

par

BUTTOLO Romain

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE : Implication de facteurs génétiques dans le développement de l'hépatopathie alcoolique et la réponse au traitement

Soutenu le 12 décembre 2017 devant le jury suivant :

Pr JOUEN François – Président

Dr HOUCHI Hakim – Tuteur scientifique

Dr NEILDEZ Thi My Anh – Tuteur pédagogique

Dr RAMOZ Nicolas – Rapporteur

Dr MEZGER Valérie – Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr HOUCHI Hakim

**Laboratoire GRAP : Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances,
INSERM ERI24, Université de Picardie Jules Verne**

Directeur : *Pr NAASSILA Mickaël*

et de

Dr NEILDEZ Thi My Anh

**Laboratoire de biologie moléculaire EPHE, INTEGRARE UMR_ SU95,1 Inserm,
Généthon**

Directeur : *Pr PALDI Andras*

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Mickaël Naassila pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de recherche dès mon diplôme universitaire, et pour m'avoir permis de réaliser ma formation de diplôme EPHE. Merci de m'avoir donné l'opportunité d'être impliqué dans de nombreux projets, ainsi que pour votre disponibilité et proximité quotidienne.

Je tiens ensuite à remercier particulièrement le Docteur Hakim Houchi pour la qualité de son encadrement, la confiance qu'il m'a accordé dans la réalisation de mes travaux de recherche et pour m'avoir encouragé à intégrer la formation de l'EPHE. Je te remercie également pour le temps que tu réussis toujours à nous accorder malgré ton emploi du temps très rempli, ta bonne humeur infaillible, ton humour, ta générosité et bien plus.

Je tiens également à remercier sincèrement le Docteur Thi-My-Anh Neildez pour m'avoir accompagné, conseillé et encouragé tout au long de ma formation à l'EPHE ainsi que durant la préparation de mon mémoire et de ma soutenance.

Je remercie également le Professeur Eric Nguyen-Khac sans qui je n'aurais pas pu réaliser mes travaux de recherche.

Je remercie sincèrement les membres du jury pour avoir accepté l'invitation à ma soutenance de Diplôme EPHE et de me faire l'honneur de juger mon mémoire de fin d'études.

Mes remerciements vont également à l'ensemble de l'équipe du GRAP : Catherine, Judith, Ingrid, Véronique, Olivier, Jérôme, Hicham, Karim, Johann, et les anciens du labo : Martine, Margareth, Carmen, Béa, Sandrine, Rémi, Khaled et Michel pour vos bons conseils, votre aide, ainsi que votre gentillesse et votre bonne humeur qui anime toujours le laboratoire et rendent son ambiance si agréable. Je tiens notamment à remercier le Docteur Stéphanie Alaux-Cantin qui m'a également encadré durant mon DU et une partie de ma formation à l'EPHE.

Un grand merci à Elodie qui est toujours hyper-organisée, efficace et sympathique, et qui a toujours gardé le sourire malgré les problèmes de commandes que je lui ai donné !

Merci aux étudiants du laboratoire qui sont devenus bien plus que des super-potes : les nouveaux et futurs docteurs : Virginie, Benoit, Fabien, Sophie, Charles-Antoine et Ichrack ; Alexandre mon confrère, ainsi que leurs conjointes et conjoints : Giulia, Babette, Sandrine, Alexis et Reda. Merci à tous pour toutes les chouettes soirées, sorties, concerts, vacances,... que nous avons passées ensemble ! C'est toujours un grand plaisir de vous revoir ! Une grosse pensée par la même occasion à tous les copains/copines du BTS Bio et plus largement des alentours d'Arras et de Lille !

Enfin, je souhaite remercier particulièrement MJ et Bernard qui m'ont accueillis chez eux et chouchouté durant toutes ces années ! Merci pour tous les très bons moments que nous avons passés ensemble et pour les délicieux petits plats (qui en ont fait bavé plus d'un !) que vous m'avez préparé.

Mes remerciements vont également à l'ensemble de ma grande famille, ma sœur, mon frère et mes parents pour tout le bonheur que vous m'apportez et pour vous occuper si bien de nous !

Enfin, et pour finir, je remercie infiniment ma petite chérie pour m'avoir encouragé, supporté et soutenu tout au long de mes études et pour tous les moments de bonheur que nous partageons ensemble, ainsi que tous ceux à venir ! Je t'aime !

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
SOMMAIRE	4
LISTE DES ABBREVIATIONS	5
INTRODUCTION.....	6
I. Contexte scientifique.....	7
II. Physiologie et métabolisme.....	9
A. Foie sain	9
B. Métabolisme de l'alcool.....	9
III. Trajectoire de la maladie alcoolique du foie	11
A. Stéatose	11
B. Hépatites alcooliques	12
C. Fibrose.....	13
D. Cirrhose.....	15
E. Hépatite alcoolique aiguë sévère.....	17
IV. Prise en charge thérapeutique	20
A. Examens clinico-biologiques et scores diagnostiques	20
B. Confirmation morpho-histologique	22
C. Traitement	22
V. Approche génétique.....	25
A. Approche génétique par gène candidat	26
B. Adiponutrine	27
C. Manganèse superoxyde dismutase	28
D. GLCC11.....	29
VI. Rationnel de l'étude.....	31
A. Problématique	31
B. Question scientifique	31
C. Objectifs	31
MATERIEL ET METHODES	32
I. Les patients.....	33
A. Critères d'inclusion :.....	33
B. Echantillonnage.....	33
C. Profils cliniques et biologiques	34
II. Protocole expérimental.....	34
III. Réactifs utilisés.....	36
IV. Analyse statistique	36
Bibliographie.....	37
ANNEXES	43

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADH : alcool déshydrogénase
ALAT : alanine aminotransférase
ASAT : aspartate aminotransférase
CHC : carcinome hépatocellulaire
CI : intervalle de confiance (confidence interval)
 γ GT : gamma-glutamyl-transpeptidase
GLCCI1 : glucocorticoid induced 1
GPX : glutathion peroxydase
GST : glutathion s-transférase
GWAS : étude d'association pangénomique (genome wide association scan)
HA : hépatite alcoolique
HAA : hépatite alcoolique aiguë
IL : interleukine
INR : International Normalized Ratio
LPS : lipopolysaccharides
MAF : maladie alcoolique du foie
MEC : matrice extra cellulaire
MELD : model for end-stage liver disease
MnSOD : manganese superoxyde dismutase
NAC : n-acétylcystéine
NAD⁺ : nicotinamide adénine nucléotide
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
OR : risque relatif (odds ratio)
PAL : phosphatase alcaline
PBH : ponction biopsie hépatique
PCR : réaction en chaîne par polymérase (polymerase chain reaction)
PNN : polynucléaires neutrophiles
PNPLA3 : patatin-like phospholipase domain-containing protein 3
ROS : espèces réactives oxygénées (reactive oxygen species)
SNP : single nucleotid polymorphism
SOD : superoxyde dismutase
TNF α : tumor necrosis factor alpha
TP : taux de prothrombine

INTRODUCTION

I. Contexte scientifique

L'alcoolodépendance est une maladie chronique, hautement récidivante, même après une longue période d'abstinence, caractérisée par une dépendance physique et psychologique à l'alcool. Ce comportement se développe au détriment de nombreuses autres activités de l'individu et ceci malgré la connaissance d'effets délétères sur la santé et sur l'équilibre social. On évalue le pourcentage de la population française adulte de consommateurs à risques et consommateurs réguliers d'alcool respectivement à 8% et 42% (Beck *et al.*, 2015). Il existe des variabilités interindividuelles dans le développement de la dépendance qui sont en grande partie expliquées par des vulnérabilités génétiques. Près de 49 000 décès par an sont imputables directement ou indirectement à l'alcool, ce qui représente 13% de la mortalité annuelle globale en France (Guérin *et al.*, 2013). Par ailleurs, le coût social de l'alcool est estimé à 120 milliards d'euros par an sur le territoire français, soit près de 6% du PIB (Kopp, 2015).

La dépendance à l'alcool pose un problème majeur de santé publique de par sa chronicité et la gravité des pathologies induites. En effet, l'éthanol est une molécule de petite taille, qui passe facilement les barrières naturelles de l'organisme (intestinale, hémato-encéphalique, cellulaire et même nucléaire) et qui, de par sa conformation, interagit avec de nombreuses protéines. L'éthanol et les composés produits lors de son métabolisme possèdent des effets toxiques cellulaires. De ce fait, en fonction des quantités, une consommation d'alcool entraîne le développement de diverses pathologies telles que des maladies psychiques, cardiovasculaires et digestives, des cancers, ainsi que de nombreux troubles hépatiques (stéatose, fibrose, cirrhose, carcinome hépatocellulaire (CHC), hépatite alcoolique (HA) et hépatite alcoolique aiguë (HAA)). L'alcool est ainsi responsable de plus de 200 pathologies et représente une des premières causes d'hospitalisation en France (Paille *et al.*, 2015).

Les thématiques de recherche de notre laboratoire, le Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances (GRAP), concernent à la fois les aspects somatiques et comportementaux de l'impact de l'alcool *in utero*, à l'adolescence et à l'âge adulte. Nous étudions les facteurs génétiques et environnementaux, impliqués dans la vulnérabilité à l'alcoolodépendance. Nos études sont menées à la fois chez l'Homme et à l'aide de modèles animaux dans le but de mieux comprendre les mécanismes de l'addiction à l'alcool et de la

maladie alcoolique du foie (MAF), afin d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients.

Durant ma formation à l'EPHE, et avant de débiter les travaux présentés dans ce mémoire, j'ai eu l'opportunité de poursuivre des travaux entrepris au sein du GRAP lors de la réalisation de mon diplôme universitaire. Leurs objectifs ont été d'évaluer l'impact de traitements pharmacologiques sur le niveau de consommation d'alcool. Ces études ont été réalisées chez un modèle de rats dépendants à l'alcool, en période de sevrage aiguë, et la consommation a été évaluée en auto-administration opérante. Les résultats obtenus ont contribué à la rédaction de deux articles publiés dans la revue *Addiction Biology*. J'ai également participé à une étude, toujours en cours de réalisation, dont l'objectif est d'identifier les facteurs de vulnérabilité, notamment génétiques, aux conduites d'alcoolisations ponctuelles intermittentes ou de type *binge drinking*, dans une population de jeunes adultes.

Enfin, la part la plus importante des travaux que j'ai réalisée au laboratoire a concerné la MAF. Le foie métabolise 75 à 80% de l'alcool, ce qui le rend particulièrement vulnérable en cas de consommations chroniques et excessives. De plus, les pathologies digestives associées à l'alcool représentent plus de 8000 décès par an (Guérin, 2013) ce qui fait de l'hépatologie un domaine incontournable dans le champ de la recherche en alcoologie.

Dans ce contexte, notre laboratoire et le service d'hépto-gastro-entérologie du CHU d'Amiens travaillons sur différentes thématiques, dans le but de mieux caractériser les stades les plus avancés de la MAF afin d'améliorer le dépistage et la prise en charge thérapeutique des patients. Au cours de ma formation, j'ai participé à un projet qui vise à effectuer un repérage précoce des patients atteints d'un carcinome hépatocellulaire, par quantification de micro-ARN circulants au niveau sanguin, qui ne sera pas présenté au cours de ce travail.

Dans ce mémoire, je vais m'attacher à vous présenter la dernière partie des travaux réalisés au cours de ma formation à l'EPHE, à savoir l'étude de l'implication de facteurs génétiques dans la physiopathologie de la MAF et la réponse thérapeutique.

II. Physiologie et métabolisme

A. Foie sain

Le foie remplit différentes fonctions essentielles pour l'organisme : digestion, stockage et restitution des nutriments, régulation des taux hormonaux, production de protéines et détoxification. Pour cela, de nombreux échanges ont lieu entre ses cellules et le sang, dans des structures appelées lobules hépatiques.

Les lobules hépatiques sont les unités fonctionnelles du foie. (Annexe 1). Ils sont de forme hexagonale et possèdent des espaces portes (contenant : artères, veines et canaux biliaires) en leurs sommets. Ils sont constitués de petits capillaires sanguins : les capillaires sinusoides qui sont formés en périphérie des lobules et orientés de façon radiaire vers la veine centrolobulaire. Les capillaires sinusoides sont constitués de cellules sinusoidales (20% des cellules du foie) qui forment un endothélium discontinu et bordent les travées hépatocytaires (travées de Remak), (Annexe 2). Les hépatocytes représentent environ 65% des cellules du foie et permettent son activité métabolique. Enfin, le foie est constitué à 10% par des cellules de Kupffer (des macrophages résidents) et à 5% par des cellules stellaires qui jouent un rôle dans le stockage des graisses.

B. Métabolisme de l'alcool

L'éthanol est métabolisé au niveau des hépatocytes (dans le cytoplasme et la mitochondrie), par deux étapes d'oxydation, en acétaldéhyde puis en acétate (figure 1). Ces mécanismes ont pour conséquence d'augmenter le nombre de radicaux libres présents dans les cellules.

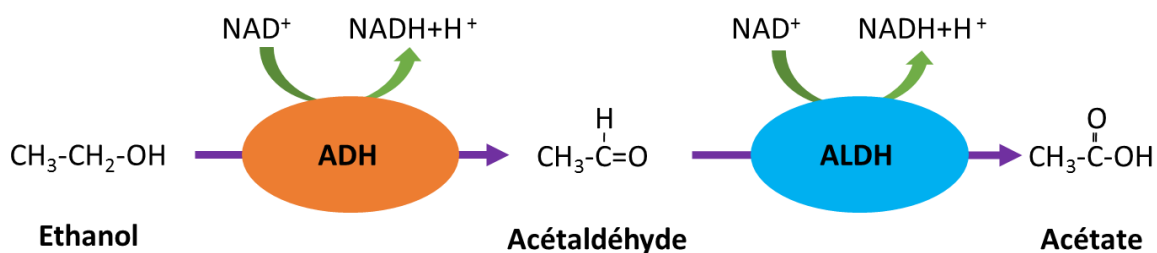


Figure 1 : métabolisme de l'éthanol

Les radicaux libres sont des espèces réactives oxygénées (ROS) possédant un électron non apparié sur leur orbitale externe (exemple : radical hydroxyle OH^\bullet , l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$). Ce sont des molécules très réactives, aux propriétés oxydantes qui peuvent réagir à la fois avec les lipides (peroxydation lipidique : altération des fonctions membranaires), les protéines (dénaturation et fragmentation), l'ADN (coupure, mort cellulaire) et le glucose (entraînant son oxydation et la libération de nouveaux radicaux libres).

L'organisme possède un système de défense antioxydante notamment par l'intermédiaire du glutathion mais également grâce à des enzymes antioxydantes telles que les catalases, les peroxydases et les superoxydes dismutases (SOD). Ils permettent notamment d'empêcher la formation des radicaux libres, de les éliminer en les neutralisant et de réparer les dommages tissulaires et cellulaires.

Les défenses antioxydantes de l'organisme sont normalement en quantité supérieure aux ROS mais il arrive que la balance s'inverse à cause d'un déficit en antioxydant, à la surproduction de radicaux libres ou les deux à la fois. Cela entraîne des souffrances de l'organisme : on parle alors de stress oxydatif.

III. Trajectoire de la maladie alcoolique du foie

La maladie alcoolique du foie évolue selon une trajectoire suivant plusieurs stades caractéristiques d'une atteinte hépatique croissante. En effet, 90 à 95% des consommateurs ayant une utilisation chronique et aiguë d'alcool développent de la stéatose. La pathologie évoluera pour 20 à 40% d'entre eux vers de la fibrose, puis pour 8 à 20% vers une cirrhose (Gao et Bataller, 2011). Enfin, 3 à 10% de ces consommateurs à risques développent un carcinome hépatocellulaire, qui ne sera pas abordé au cours de ce travail.

Le développement de la MAF est accentué par l'apparition d'hépatites alcooliques qui sont intercurrentes à chacun des stades de la maladie. Enfin, la MAF peut également évoluer vers une hépatite alcoolique aiguë, une des formes les plus sévères et brutales des hépatopathies alcooliques.

A. Stéatose

La stéatose hépatique correspond à la formation d'un foie « gras », induit par l'accumulation de triglycérides dans le cytoplasme des hépatocytes.

L'augmentation des triglycérides dans l'organisme est liée à un apport énergétique surabondant. En effet, le métabolisme de l'alcool entraîne la formation d'acétates, qui seront transformés en acétyl-coenzyme A par l'acétyl-coenzyme A synthétase. Par l'intermédiaire du cycle de Krebs, l'acétyl-coenzyme A permet une libération d'énergie sous forme d'ATP (7 calories/g d'éthanol), qui s'ajoute à l'apport calorique de l'alimentation, ce qui entraîne une augmentation du stockage énergétique par l'organisme. De plus, une seconde voie peut également être mise en place lorsque la quantité d'énergie disponible dans l'organisme est surabondante : l'acétyl-coenzyme A est également utilisée pour la synthèse de triglycérides, en étant combinée au glycerol-3-phosphate (provenant de l'oxydation du glucose).

Par ailleurs, lors d'une consommation chronique d'alcool, le NADH produit au cours de son métabolisme s'accumule dans les cellules et entraîne des perturbations telles que l'inhibition du cycle de Krebs et de l'oxydation des triglycérides. L'acétyl-coenzyme A est par conséquent principalement stockée sous forme de triglycérides et sera peu dégradée, ce qui accentue l'hyperlipidémie et la formation de stéatose (Lieber, 2004).

Les lipides vont donc s'accumuler dans le foie, sous forme de macrovésicules (aussi appelées gouttelettes lipidiques), préférentiellement dans les hépatocytes de la zone centrale du lobule hépatique qui deviennent hypertrophiés et arrondis.

La stéatose hépatique est asymptomatique et réversible en cas d'arrêt de la consommation d'alcool. Elle correspond cependant aux premiers signes d'alcoolopathie du foie et survient dès les premiers niveaux de consommation chronique (10 à 20g d'alcool par jour durant 5 ans). La stéatose peut être classifiée en différentes phases correspondant à la proportion de macrovésicules dans le tissu : phase I (5-25%) ; II (25-50%) ; III (50-75%) et IV (>75%).

Bien qu'elle soit asymptomatique, la stéatose entraîne une accumulation importante de lipides au niveau cellulaire, ce qui peut provoquer la rupture de leur membrane.

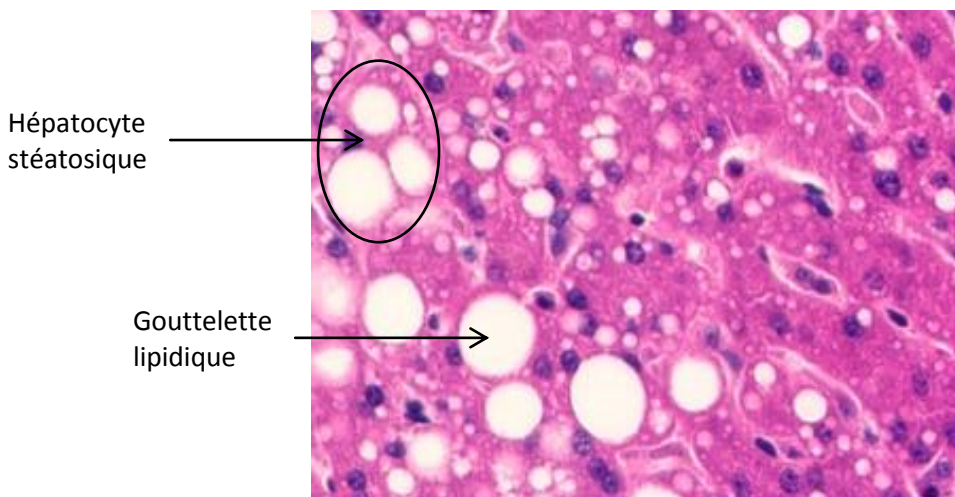


Figure 2 : Coupe histologique de foie stéatosique. (Pr Denis Chatelain, CHU Amiens)

B. Hépatites alcooliques

L'hépatite alcoolique (HA) est une maladie intercurrente apparaissant sur un foie stéatosique, fibrosé ou cirrosé. Elle survient généralement chez des patients ayant une consommation d'alcool régulière et depuis plusieurs années (consommation quotidienne supérieure à 60g d'alcool chez la femme et 80g chez l'homme). Elle est généralement limitée

à une partie du foie, transitoire et asymptomatique, mais est néanmoins à l'origine de souffrances et de mort cellulaire.

L'accumulation importante de triglycérides au niveau des hépatocytes (stéatohépatites) et le stress oxydatif entraîne son installation, ce qui conduit à un état d'inflammation du foie. En effet, dans un contexte d'alcoolisation chronique, les mécanismes d'oxydation liés au métabolisme de l'alcool et des lipides engendrent une augmentation de la quantité de ROS présents dans l'organisme. Les défenses antioxydantes vont être consommées jusqu'à s'épuiser et entraîner une augmentation du stress oxydatif au sein des cellules qui provoque un état d'inflammation du foie. Le stress oxydatif induit également une peroxydation des lipides membranaires à l'origine de la perte de leurs fonctions, leur dégradation voir leur destruction ; ce qui se traduit par la mort des cellules par nécrose, clarification et ballonnisation.

Les processus inflammatoires de l'HA entraînent une augmentation du taux de TNF α (facteur de nécrose tumorale alpha), qui engendre des phénomènes d'apoptose et une accentuation du stress oxydatif. Au cours du métabolisme de l'alcool, la diminution des mécanismes antioxydants mitochondriaux se traduit notamment par la diminution des stocks de glutathion. Le glutathion mitochondrial jouant un rôle majeur de détoxification des ROS, cette diminution conduit à une augmentation du stress oxydatif et rend les hépatocytes plus sensibles au TNF α augmentant par conséquent la mort cellulaire (Colell *et al.*, 1998).

En plus de sa cytotoxicité, le stress oxydatif est également responsable de dysfonctionnements mitochondriaux associés à des délétions de l'ADN mitochondrial de même qu'à un déficit énergétique entraînant un vieillissement précoce des cellules et conduisant également à leur mort.

C. Fibrose

Parallèlement à la mort cellulaire observée au cours des stéatoses et des HA, les alcoolisations répétées vont entraîner des agressions cellulaires supplémentaires. L'acétaldéhyde produit par l'oxydation de l'alcool est très toxique pour les cellules ; il dégrade leur membrane et provoque leur lyse.

On appelle fibrose hépatique la formation d'un tissu cicatriciel fibreux, non fonctionnel, qui va remplacer temporairement les cellules endommagées au cours des différents phénomènes de mort cellulaire, avant qu'elles ne soient régénérées (figure 3). L'activation des cellules stellaires permet la formation de ce tissu, par une augmentation des constituants de la matrice extra cellulaire (MEC) dont notamment le collagène.

La fibrose hépatique se situe dans un premier temps en périphérie des lobules hépatocytaires, au niveau des espaces portes, puis augmente vers la veine centrolobulaire en cas de poursuite de la consommation. La fibrose est classée par stades en fonction de son degré de gravité : le stade F0 (pas de fibrose) ; F1 (fibrose périportale) ; F2 (fibrose modérée avec quelques septa fibreux) ; F3 (fibrose étendue avec de nombreux septa fibreux). Le stade F4 correspond au stade de cirrhose, avec de la fibrose très développée dans l'ensemble du tissu hépatique et la présence de nodules de régénération. La fibrose est, dans un premier temps, réversible et les tissus peuvent se régénérer, retrouver leurs physiologies et fonctions normales en cas d'arrêt de la consommation, mais elle devient irréversible lorsqu'elle est trop étendue et évoluée. Les conséquences de la fibrose résultent de l'accumulation de matrice extra cellulaire et vont être à l'origine d'une distorsion architecturale du tissu. Au sein des lobules hépatiques, la MEC entraîne une capillarisation des sinusoides qui perdent de leur perméabilité. Cela conduit à un isolement des hépatocytes qui ne pourront plus procéder aux échanges avec le sang et remplir correctement leurs fonctions.

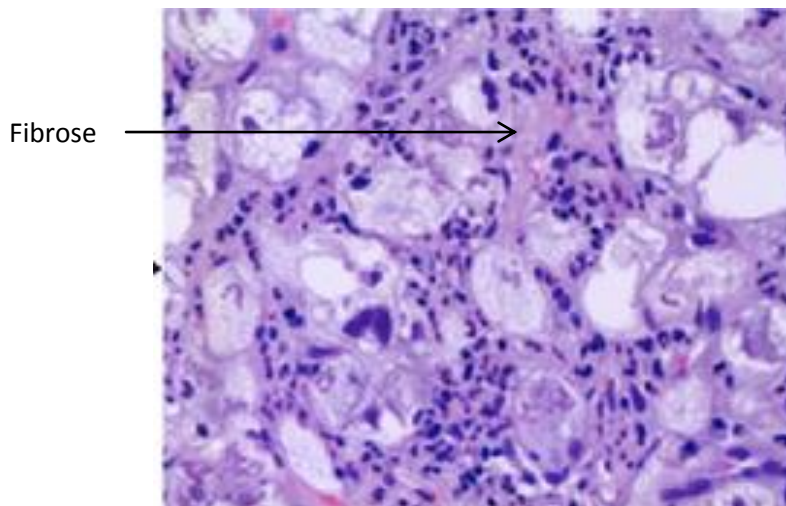


Figure 3 : Coupe histologique de foie fibrosique (Gao et Bataller, 2011)

D. Cirrhose

Lorsque la fibrose atteint un stade de développement majeur et touche l'ensemble du tissu hépatique (stade F4), on parle de cirrhose (figure 4). Pour compenser la nécrose hépatocytaire, les hépatocytes restants se régénèrent, mais ce processus est perturbé par la quantité importante de fibrose dans le tissu. Les lobules hépatiques ne peuvent plus se reformer correctement et ce phénomène aboutit à la formation de structures anarchiques appelées nodules de régénérations. Ces nodules sont composés d'hépatocytes se régénérant, entourés par du tissu fibreux, dont les connections vasculaires et biliaires sont perturbées.

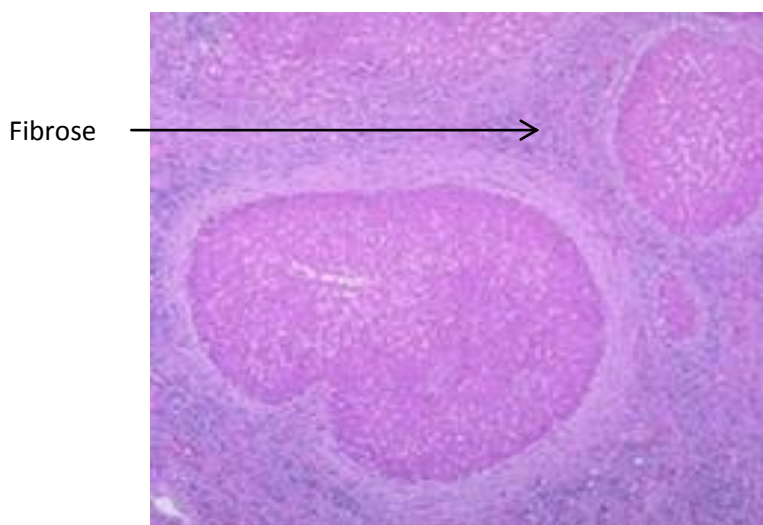


Figure 4 : Coupe histologique de foie cirrhotique (Gao et Bataller, 2011)

Dans un premier temps, la cirrhose sera compensée, c'est-à-dire asymptomatique. L'accumulation de fibrose et de nodules de régénération va progressivement entraîner une désorganisation de l'ensemble de l'architecture du foie, à la fois sur le plan anatomique et fonctionnel, conduisant à 4 grands syndromes caractéristiques d'atteinte des fonctions hépatiques ; la cirrhose devient alors décompensée.

- Le syndrome de cytolyse : augmentation de la perméabilité des membranes des hépatocytes ou destruction par nécrose, ayant pour conséquence le relargage des composants hépatocytaires dans les capillaires sinusoides, puis dans le sang périphérique.

- Le syndrome de cholestase : atteinte au niveau des mécanismes d'excrétion biliaire qui empêche la bile d'être correctement dirigée vers l'intestin. Celle-ci finit par s'accumuler

dans le foie puis refluer dans le sang. Ces origines peuvent être intra-cellulaires (atteinte du pôle biliaire des hépatocytes), ou extra-cellulaires (obstruction des voies biliaires).

- Le syndrome d'insuffisance hépatocellulaire : atteinte des fonctions hépatiques dues à la désorganisation structurelle des lobules hépatiques, se traduisant par une diminution des fonctions principales du foie (digestion, stockage, détoxification, synthèse d'hormones et de protéines,...).

- Le syndrome méenchymateux : augmentation importante de production d'anticorps dans l'ensemble de l'organisme. Ce phénomène résulte de la diminution de l'infiltration du sang portal au niveau du foie et à l'insuffisance des fonctions des cellules de Kupffer. Cela a pour conséquence une mauvaise destruction des antigènes (du sang portal), qui atteignent le sang périphérique, où ils induisent la formation d'anticorps.

Ces différents syndromes vont être à l'origine d'un grand nombre de variations dans l'organisme qui conduiront au diagnostic de la maladie :

- La cytolyse entraîne une augmentation des aspartates aminotransférases (ASAT) et alanines aminotransférases (ALAT) au niveau sanguin avec un taux d'ASAT supérieur aux ALAT, spécifique de la consommation d'alcool ainsi qu'une augmentation des phosphatases alcalines (PAL).

- La diminution de la sécrétion biliaire due à la cholestase n'est pas observable directement, mais par l'intermédiaire de l'augmentation de la synthèse de 3 enzymes au niveau sanguin : les PAL, la gamma-glutamyl-transpeptidase (γ GT) et la 5' nucléotidase. D'autre part, la bilirubine ne va plus être correctement évacuée par les voies naturelles et va refouler dans le sang, entraînant l'apparition d'un ictère (jaunisse) lié à son accumulation dans les cellules de l'organisme.

- L'insuffisance hépatocellulaire entraîne une diminution de l'albumine (rôle dans la pression osmotique, le transport) ainsi que de certains facteurs de coagulation observables par le calcul du taux de prothrombine (TP) ou de l'INR (International Normalized Ratio). Les facteurs de coagulation I, II, V, VII, X interviennent dans la détermination du TP, et l'INR permet d'affiner le résultat en prenant en compte la sensibilité des réactifs utilisés. L'absence

de protéines liées à l'insuffisance hépatocellulaire entraîne la formation d'ascite : l'eau contenue dans le sang diffuse à travers la membrane et s'accumule dans la cavité abdominale. De plus, l'accumulation de toxine peut entraîner des encéphalopathies (troubles neurologiques) et parfois l'apparition d'angiomes.

- Le syndrome méenchymateux est caractérisé par une augmentation d'immunoglobulines due aux conflits immunologiques présents dans l'organisme ; les IgA orientant le diagnostic vers une pathologie d'origine alcoolique.

Répercussions :

Outre les différents troubles hépatiques décrits précédemment, la cirrhose est également à l'origine d'une augmentation de la résistance intrahépatique à la circulation sanguine, entraînant une hypertension portale. L'augmentation de la pression sanguine dans le système porte, peut conduire en fonction de son intensité, à l'apparition de varices œsogastriques (œsophage, estomac, rectum), ainsi qu'à des dysfonctionnements rénaux (syndrome hépatorénal) accentuant l'apparition d'ascite. Des complications supplémentaires, telles que des hémorragies dues à des ruptures de varices œsophagiennes ou une infection du liquide d'ascite, peuvent s'ajouter à ce tableau clinique. Enfin, la cirrhose d'une manière générale, constitue un facteur de risque important évoluant couramment vers un carcinome hépatocellulaire après 15 à 20 ans d'évolution de la maladie.

La nécrose hépatocellulaire va également être à l'origine de processus inflammatoires, entraînant une augmentation du TNF α et donc de phénomènes d'apoptose, ainsi qu'une augmentation du stress oxydatif, lui-même responsable de nécrose. Les phénomènes de mort cellulaire et de fibrogenèse sont par conséquent auto-entretenus, ce qui accentue les déficits fonctionnels du foie.

E. Hépatite alcoolique aiguë sévère

L'hépatite alcoolique aiguë (HAA) sévère est une des formes les plus graves de la maladie alcoolique du foie. Elle se développe à la suite d'une consommation excessive et chronique d'alcool (150 à 400g d'alcool par jour durant plusieurs semaines). Son incidence en France est évaluée à 50 à 60 cas par million d'habitants en 2008 (Nguyen-Khac *et al.*, 2010). L'HAA sévère engage le pronostic vital du patient à court et moyen terme, avec une mortalité

proche de 25% à 1 mois (Mathurin *et al.*, 2002) et 50% à 6 mois (Ramond *et al.*, 1992) pour les formes les plus sévères et en cas de non réponse au traitement.

a. Caractéristiques cliniques

La symptomatologie de l'HAA est très bruyante. Elle se manifeste avec l'apparition rapide d'un ictère, d'une fièvre modérée, de douleurs au niveau de l'hypocondre droit ainsi que différents signes d'insuffisances hépatocellulaire, de cholestase et de cytolyse qui traduisent une cirrhose sous-jacente très fréquente.

b. Physiopathologie

L'HAA sévère touche l'ensemble du tissu hépatique et entraîne une quantité importante de mort cellulaire. Sa physiopathologie repose sur deux mécanismes qui s'auto-entretiennent : le stress oxydatif et l'endotoxémie (Lucey *et al.*, 2009).

Le stress oxydatif joue un rôle majeur dans la physiopathologie de l'HAA sévère. Comme pour l'HA, il est accentué par la présence de TNF α lié à l'inflammation et entraîne une dégradation des lipides membranaires provoquant la perte de leurs fonctions, un vieillissement pathologique précoce, des dysfonctionnements mitochondriaux et une mort cellulaire par nécrose, clarification et/ou ballonnisation. Des corps de Mallory sont également observables et sont représentatifs d'une hépatite d'origine alcoolique. Ce sont des agrégats de filaments au sein des hépatocytes qui sont retrouvés en cas d'inflammation du foie et issus de la toxicité de l'alcool.

Parallèlement, les alcoolisations chroniques, entraînant la présence répétée d'éthanol et d'acétaldéhyde, ainsi que l'augmentation du stress oxydatif dans le tube digestif provoquent des agressions de l'épithélium, au niveau des jonctions serrées, qui se relâchent et deviennent perméables. Des bactéries (ou fragments de paroi bactérienne) peuvent ainsi traverser la barrière intestinale, notamment des bacilles à Gram négatifs (dont la membrane externe est principalement constituée de lipopolysaccharides : LPS). La présence de ces LPS entraîne une réponse immunitaire par infiltration hépatique de polynucléaires neutrophiles (PNN), attirés par des cytokines, ce qui est caractéristique de l'HAA.

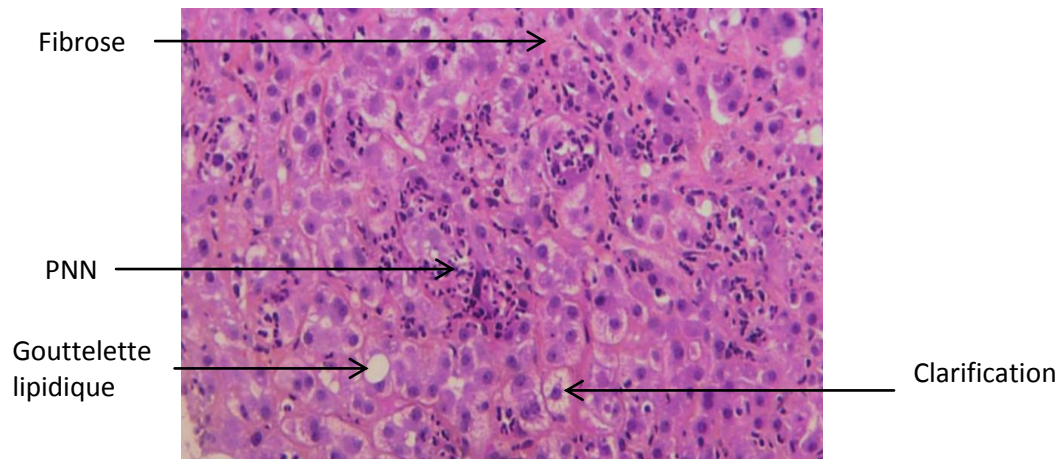


Figure 5 : Coupe histologique de foie avec des PNN entourant un hépatocyte en voie de nécrose au cours d'une HAA sévère (Pr Denis Chatelain, CHU Amiens)

Les LPS vont interagir sur les récepteurs CD14 et TLR4 des cellules de Kupffer (Rao, 2009). Leur activation induit la production de ROS et de cytokines pro-inflammatoires dont le $TNF\alpha$ et les interleukines (IL) 6, 8 et 10.

- Le $TNF\alpha$, par l'intermédiaire de ses récepteurs membranaires (notamment TNFR1), est à l'origine de lésions hépatiques. Yin et ses collaborateurs ont observé l'absence de lésions hépatiques chez la souris *knockout* TNFR1 exposée à l'alcool (Yin *et al.*, 1999).

- À l'inverse, les IL-6 et 10 ont un effet cytoprotecteur. Ils permettent l'activation de STAT3, un facteur de transcription de l'hépatocyte, des cellules endothéliales et des macrophages, à l'origine de la transcription de facteurs antiapoptotiques, antioxydants et pro-oncogéniques (Miller *et al.*, 2011).

La régulation entre les facteurs délétères pro-inflammatoires et protecteurs anti-inflammatoires reste à éclaircir. Cependant, les PNN circulants vont aboutir par chimiotactisme autour d'hépatocytes en cours de souffrance ou de mort cellulaire et adhérer aux tissus en formant des infiltrats caractéristiques de l'HAA (Sheron *et al.*, 1993).

IV. Prise en charge thérapeutique

A. Examens clinico-biologiques et scores diagnostiques

Il existe différents scores qui s'appuient sur les examens cliniques et biologiques des patients qui ont pour but de graduer la sévérité de l'hépatopathie alcoolique. Les résultats permettent de déterminer le degré de sévérité de la maladie, d'orienter la prise en charge thérapeutique et de calculer le pronostic de survie en fonction de la réponse au traitement.

a. Score Child-Pugh

Le score de Child-Pugh (Child *et al.*, 1964 ; Pugh *et al.* 1973), permet de définir le degré d'insuffisance hépatique et ainsi, de différencier les cirrhoses compensées (classe A), des décompensées (classe B et C). En cas d'HAA, il permet d'estimer la survie des patients à 1 an et la contre-indication à la réalisation d'une opération chirurgicale (risque de décès important pour les patients ayant un score de Child-Pugh plus élevé).

<u>Nombre de points</u>	1	2	3
Bilirubine (µmol/l)	<35	35-50	>50
Albumine (g/l)	>35	28-35	<28
Ascite	-	facile à contrôler	constante
TP (ratio TP patient/TP contrôle)	>54%	44-54%	<44%
Encéphalopathie	absente	légère à modérée	sévère

Points attribués:

Classe A : 5 à 6 : survie à 1 an de 100%

Classe B : 7 à 9 : survie à 1 an de 80%

Classe C : 10 à 15 : survie à 1 an de 45%

b. Score de Maddrey

Le score de Maddrey (Maddrey *et al.*, 1978) permet de repérer les formes d'HAA sévères. Il se calcule selon la formule suivante :

$$\text{Score de Maddrey} = 4,6 \times (\text{TP patient} - \text{TP contrôle}) + \text{bilirubine}$$

Unité : TP en secondes et bilirubine en mg/dL

L'HAA des patients présentant un score de Maddrey inférieur à 32 est considérée comme non sévère (survie d'environ 90% à 6 mois en l'absence de traitement). L'HAA des patients ayant un score supérieur à 32 est suspectée sévère (mortalité de 25% à 1 mois et 50% à 6 mois en l'absence de traitement) (Mathurin *et al.*, 2002).

c. Score de MELD

Le score de MELD (*Model for End-Stage Liver Disease*) (Kamath *et al.*, 2001) permet également d'évaluer la sévérité d'une HAA et il est indicatif du risque de décès sans transplantation hépatique. Il est donc également utilisé pour sélectionner les candidats à une transplantation hépatique. Le score de MELD se calcule selon la formule suivante :

$$\text{Score de MELD} = 3,78 \times \ln(\text{bilirubine}) + 11,2 \times \ln(\text{INR}) + 9,57 \times \ln(\text{créatinine}) + 6,43$$

Unité : bilirubine et créatinine en mg/dL

Les patients ayant un score de MELD supérieur à 21 ont une espérance de vie diminuée en l'absence de traitement (Srikureja *et al.*, 2005).

d. Score de Lille

Le score de Lille (Louvet *et al.*, 2007) permet d'évaluer le niveau de réponse au traitement des patients présentant une HAA sévère après 7 jours de corticothérapie et d'estimer leur pronostic de survie. Il se calcule selon la formule :

$$\text{Score de Lille} = e^{(-R)} / 1 + e^{(-R)}$$

Avec $R = [3,19 - (0,101 \times \text{âge})] + (1,47 \times \text{albumine}) + [0,28215 \times (\text{bilirubine initiale} - \text{bilirubine jour 7})] - (0,206 \times \text{insuffisance rénale oui} = 1 ; \text{non} = 0) - (0,11115 \times \text{bilirubine initiale}) - (0,0096 \times \text{TP})$

Unité : âge en années, l'albumine en g/dL, la bilirubine en mg/dL et le TP en secondes.

Le score obtenu varie entre 0 et 1 et correspond à des niveaux de réponse au traitement du patient :

- un score inférieur à 0,16 correspond à une réponse totale au traitement,
- de 0,16 à 0,56 : réponse partielle,
- supérieur à 0,56 : pas de réponse (spécifique de la corticorésistance).

De plus, les patients ayant un score inférieur à 0,45 ont un risque de décès de l'ordre de 15% à 6 mois et ceux ayant un score supérieur à 0,45 ont un risque de décès de 75% à 6 mois. Les patients ayant un score supérieur à 0,56 ont un risque de décès de 47% à 1 mois.

B. Confirmation morpho-histologique

Parallèlement aux examens clinico-biologiques, l'aspect du foie peut être contrôlé histologiquement par ponction biopsie hépatique (PBH). Cet examen permet le diagnostic de certitude de la maladie, par observation des différents éléments caractéristiques des hépatopathies, tels que la présence de stéatose, de fibrose et éventuellement de PNN, de corps de Mallory et de cellules cancéreuses. Cependant, cet examen ne peut être réalisé sur tous les patients et de manière préventive (risque hémorragique, d'autant plus grand si le taux de facteur de coagulation est bas). Dans ce cas, la ponction peut alors être réalisée par voie transjugulaire. En revanche, lorsque les signes cliniques et hématologiques sont flagrants, en particulier au cours de l'HAA sévère, la PBH n'est pas nécessaire car elle risquerait d'aggraver d'avantage l'état physiologique du patient.

Une technique non-invasive d'élastographie impulsionnelle peut également être utilisée et pratiquée à l'aide d'un Fibroscan®. Son but est d'effectuer un suivi régulier de l'état physique du foie du patient et de permettre de repérer la maladie aux stades les plus précoces. L'appareil émet un choc impulsionnel qui est renvoyé par le foie, puis capté par une sonde. La dureté du foie est calculée en fonction de la vitesse de retour de l'onde (plus celui-ci est fibrosé, plus il sera dense et dur, et plus rapidement l'onde reviendra vers la sonde). Le résultat obtenu en kPa est rapporté à des valeurs seuils, correspondant à des proportions de fibrose.

C. Traitement

a. Cirrhose

Les patients atteints de cirrhose ont un suivi régulier (tous les 6 mois) effectué par les services d'hépto-gastro-entérologie. Les lésions hépatiques causées par la cirrhose sont irréversibles et peuvent s'accroître avec le temps, mais l'abstinence totale à l'alcool permet de réduire cette vitesse de dégradation. Le seul traitement permettant de retrouver une

physiologie saine est la transplantation hépatique. Cependant, elle ne peut être réalisée systématiquement, principalement pour des raisons de disponibilité des greffons et des problèmes de considérations éthiques.

b. HAA

Concernant l'HAA, la corticothérapie est le traitement le plus répandu. Il existe d'autres traitements tels que l'assistance hépatique extracorporelle ou le Pentoxifylline (anti-TNF α) qui ne seront pas traités au cours de ce travail. La transplantation hépatique permet également d'améliorer la survie des patients, cependant sa réalisation reste problématique pour les raisons similaires à celles évoquées précédemment. L'état physique du patient prend également une part importante quant à la réalisation d'une transplantation, une encéphalopathie hépatique ou une insuffisance rénale étant reconnues comme facteurs de mauvais pronostic pour la réalisation de cette opération.

La corticothérapie, aux propriétés anti-inflammatoires, associée à un sevrage alcoolique, permet d'améliorer à 80% à 1 mois et 67.5% à 6 mois la survie des patients (Mathurin *et al.*, 2002). Néanmoins, environ 40% des patients sont résistants à ce traitement et 80% d'entre eux décèdent à 6 mois. Une nouvelle option thérapeutique a été proposée et mise en place par notre laboratoire et consiste à lutter contre le stress oxydatif en complétant le traitement avec de la N-acétylcystéine. Ceci a permis une diminution de la mortalité pour les patients non-répondants (Nguyen-Khac *et al.*, 2011).

c. Fonctionnement de la corticothérapie.

La prédiction de la réponse au traitement et par conséquent le recours à la transplantation prennent donc une importance majeure dans la prise en charge thérapeutique du patient, c'est pourquoi il convient de mieux comprendre les mécanismes de la corticothérapie.

Les corticoïdes possèdent une action anti-inflammatoire puissante. Ils diffusent passivement à travers la membrane cytoplasmique des cellules et se fixent sur leurs récepteurs cytosoliques. Le complexe formé traverse la membrane nucléaire et interagit avec le génome au niveau de facteurs de transcription, dans les régions promotrices de certains gènes, dont celui de l'élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE). C'est la fixation du complexe sur la séquence génétique qui permet l'action anti-inflammatoire en activant le facteur de

transcription GRE. La transcription du gène du Glucocorticoid Induced 1 (GLCCI1) est également un élément nécessaire aux mécanismes génomiques anti-inflammatoires. En effet, sont transcrit *glcci1* entraîne l'augmentation de l'expression des gènes de l'annexine 1 (inhibiteur de la phospholipase A2) et du GILZ (inhibiteur du NF- κ B). La corticothérapie joue également un rôle anti-inflammatoire en inhibant des facteurs de transcription (AP-1, NF- κ B) impliqués dans l'expression de gènes pro-inflammatoires, tel que le TNF α (Quax *et al.*, 2013).

Toutefois, les patients traités par corticothérapie ne répondent pas tous de la même façon au traitement et des variations individuelles sont observées avec parfois de véritables résistances comme décrit précédemment. Des mécanismes de résistance peuvent être impliqués à différentes étapes : diffusion transmembranaire, fixation aux récepteurs, voies de signalisation, interaction avec l'ADN. Des facteurs génétiques sont également à l'origine de cette résistance en modulant la disponibilité des corticostéroïdes et les fonctions de leurs récepteurs. Le gène GLCCI1 a notamment été identifié et associé à la réponse à la corticothérapie au cours de maladie inflammatoire, ce qui sera développé dans le chapitre suivant.

A l'heure actuelle, aucune donnée n'a été publiée concernant l'implication des polymorphismes génétiques du GLCCI1 dans les mécanismes de résistance aux corticoïdes au cours d'une HAA sévère, ce qui fait de lui une cible potentielle dans la prédiction de la réponse au traitement.

V. Approche génétique

L'HAA est une pathologie multifactorielle, intercurrente de la maladie alcoolique du foie (MAF), qui engage le pronostic vital du patient à court et moyen terme.

Bien que de nombreux facteurs de vulnérabilité tels que le surpoids et le genre féminin aient été identifiés (Naveau *et al.*, 1997), seuls 10 à 35% des buveurs excessifs développent des hépatopathies alcooliques (Gao et Bataller, 2011).

Le rôle de la prédisposition génétique dans le développement de maladies alcooliques, à la fois au niveau physique que psychologique, est connu depuis de nombreuses années (Hrubec *et al.*, 1981). En effet, une mutation génétique, même d'un seul nucléotide, peut entraîner une diminution voire une perte de fonction au niveau protéique se traduisant par des variations au niveau physiologique. Ces mutations sont dites de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) et interviennent également dans la vulnérabilité à développer la MAF.

Bien qu'étant l'une des formes des plus sévères de la MAF, les connaissances sur l'HAA restent encore à préciser, plus particulièrement en ce qui concerne les mécanismes génétiques et leur implication dans les voies physiopathologiques et pharmacologiques de cette maladie. Dans ce contexte, nous avons ciblé des voies génétiques candidates afin de les étudier en se basant sur les données clinico-biologiques de patients.

Concernant l'origine physiopathologique de la maladie, la voie immuno-inflammatoire représente une piste majeure (Lucey *et al.*, 2009). Les polymorphismes des gènes codants pour les cytokines pro-inflammatoires intervenant dans la physiopathologie de l'HAA ont été étudiés. Notre laboratoire a notamment mis en évidence l'implication d'une mutation de type SNP, située dans la région promotrice du gène du TNF α associée à la survenue d'une HAA (Nguyen-Khac *et al.*, 2008). En revanche, la mutation de ses récepteurs, TNFR1 et TNFR2, n'avaient pas d'influence sur la survenue de la maladie dans nos populations (Nguyen-Khac *et al.*, 2010). L'association entre les polymorphismes génétiques de l'IL-10 et le risque supérieur d'avoir une MAF à un stade plus avancé a été montrée (Grove *et al.*, 2000), mais cette association n'a pas été retrouvée avec les IL-6 et 8 (Marcos *et al.*, 2009).

A. Approche génétique par gène candidat

Des études d'association pangénomique (« *genome wide association scan* » (GWAS)) sont réalisées afin d'explorer l'implication de polymorphismes génétiques dans l'induction et le développement de certaines pathologies. Leur but est de corrélérer des variations génétiques à des traits phénotypiques, en analysant un grand nombre de polymorphismes, sur un grand nombre d'individus.

Parallèlement à la voie immuno-inflammatoire, la physiopathologie de l'HAA est également caractérisée par la forte implication de stress oxydatif (Lucey *et al.*, 2009). Ce stress est en partie dû à l'accumulation de triglycérides dans le foie et à la peroxydation lipidique. Une étude de GWAS, menée sur une population multiéthnique, a récemment mis en évidence une mutation fonctionnelle au niveau du polymorphisme rs738409 du gène de l'adiponutrine, un gène codant pour une protéine transmembranaire aux fonctions phospholipases (Romeo *et al.*, 2008). Cette mutation est associée à une accumulation de triglycérides dans le foie et à une inflammation hépatique. Le polymorphisme rs738409 de l'adiponutrine semble donc être un gène candidat intéressant dans l'étude de la physiopathologie de l'HAA sévère.

Par ailleurs, la diminution des défenses antioxydantes de l'organisme est également un autre point clef dans le développement de la MAF. La mutation de gènes codants pour le glutathion S-transférase (GST), une enzyme impliquée dans les réactions de détoxifications des ROS, a été corrélée à une augmentation du risque de développer la MAF (Ladero *et al.*, 2005), ainsi que la cirrhose (Khan *et al.*, 2009). Le gène SOD2 possède également un SNP et code pour une enzyme antioxydante mitochondriale majeure : la manganèse superoxyde dismutase (MnSOD). Ce polymorphisme génétique est associé à une fibrose plus avancée chez des patients atteints de stéato-hépatite non-alcoolique (Saksena *et al.*, 2003), un risque de MAF plus important (Degoul *et al.*, 2001), ainsi qu'une augmentation du risque de développer une cirrhose alcoolique (Nahon *et al.*, 2005 ; Huang *et al.*, 2016). Enfin, le polymorphisme de la SOD2 a également été associé au CHC (Nahon *et al.*, 2009) puis par Jin et ses collaborateurs au cours d'une méta-analyse (Jin *et al.*, 2011). Ces éléments font du gène SOD2 un candidat dans l'étude de la physiopathologie de l'HAA sévère.

Enfin, la corticothérapie représente un traitement pharmacologique de référence pour son action anti-inflammatoire. Dans le but d'améliorer la prise en charge des patients, l'implication de polymorphismes génétiques associée à la réponse à la corticothérapie représentent une piste de recherche majeure. Une étude de GWAS menée chez des patients asthmatiques a permis d'identifier deux SNPs du gène *GLCCI1* : rs37972 et rs37973. Leurs mutations sont associées à une diminution du transcrit *glcci1* et de la réponse au traitement aux corticostéroïdes (Tantisira *et al.*, 2011). Le polymorphisme du gène *GLCCI1* semble donc être un outil potentiel pour la détermination génétique de la réponse aux corticostéroïdes dans l'HAA sévère.

B. Adiponutrine

Comme il a été décrit précédemment, les triglycérides jouent un rôle majeur dans la mise en place et le développement de la maladie alcoolique du foie. La consommation chronique d'éthanol induit la formation de stéatose hépatique. Les épisodes successifs de stéatohépatite ont pour conséquence la stimulation des processus fibrosants qui mènent à long terme vers une cirrhose.

Une étude de GWAS, réalisée sur une population multiéthnique, a mis en évidence un polymorphisme du gène de l'adiponutrine aussi appelé PNPLA3 (Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3) (Romeo *et al.*, 2008). Localisé au niveau du locus q13.31 du chromosome 22, ce gène code pour une protéine transmembranaire aux fonctions phospholipases (Falleti *et al.*, 2011 ; Krawczyk *et al.*, 2011). Elle est exprimée dans de nombreux tissus et elle est particulièrement présente dans le foie, au niveau des hépatocytes (Huang *et al.*, 2010). Sa mutation fonctionnelle est située au niveau de l'exon 3 (rs738409). Il s'agit d'une mutation par transversion d'une cytosine en guanine, qui entraîne un changement au niveau de l'acide aminé 148 d'une isoleucine en méthionine. Il a été montré que cette mutation entraîne une réduction de l'activité hydrolase de l'adiponutrine (He *et al.*, 2010) ayant pour conséquence d'entraîner une accumulation des triglycérides sous forme de gouttelettes de stéatose. Ces triglycérides induisent une augmentation du stress oxydatif qui contribue aux dommages hépatiques (Yamaguchi *et al.*, 2007).

De plus, le polymorphisme muté du gène *PNPLA3* rs738409 a été corrélé à des troubles hépatiques dont notamment :

- un haut niveau de transaminases sériques chez des patients sains (Kollerits *et al.*, 2010)
- une augmentation des risques de stéatohépatites d'origine non-alcoolique (Rotman *et al.*, 2010 ; Sookoian *et al.*, 2011) et des dommages hépatiques chez des adolescents en surpoids ou obèses (Romeo *et al.*, 2010)
- des risques plus importants de développer la MAF à des stades plus avancés et de développer une cirrhose (Trépo *et al.*, 2011 ; Stickel *et al.*, 2011)
- une augmentation du niveau de fibrose observé par élastographie impulsionnelle (Krawczyk *et al.*, 2011)

Le polymorphisme rs738409 de l'adiponutrine possède donc une influence majeure dans le niveau d'activité enzymatique. Sa mutation entraîne des dommages hépatiques liés à l'accumulation de lipides (en l'absence ainsi qu'en présence d'alcool) et elle est associée à la sévérité de la MAF. Ce polymorphisme semble donc être un gène candidat dans l'étude de la physiopathologie de l'HAA sévère.

C. Manganèse superoxyde dismutase

Étant à l'origine de la formation d'une quantité importante de radicaux libres, le métabolisme de l'alcool entraîne une augmentation importante du stress oxydatif, en particulier au niveau intrahépatique. Le stress oxydatif est responsable de nécrose cellulaire et joue un rôle essentiel dans la physiopathologie de la MAF, notamment dans celle de l'HAA sévère (Lucey *et al.*, 2009).

Physiologiquement, les catalases, les peroxydases et les superoxydes dismutases sont les barrières contre le stress oxydatif. À l'heure actuelle, trois isoformes de SOD ont été identifiées, dont la manganèse superoxyde dismutase (MnSOD) : une enzyme antioxydante mitochondriale considérée comme la défense principale contre le stress oxydatif. Elle catalyse la réduction de l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) en dioxygène (O_2) et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui sera réduit en eau (H_2O) par la glutathion peroxydase (GPX). La MnSOD est codée par le gène SOD2 et comporte 5 exons situés sur le locus q25 du chromosome 6.

Un SNP de ce gène a été repéré : le rs4880 C>T. Il s'agit d'une mutation par transition pyrimidique d'une cytosine vers une thymine, entraînant un changement au niveau de l'acide

aminé 16, d'une alanine en valine. Cette mutation est à l'origine de modification de la structure secondaire de la protéine et par conséquent son adressage au niveau mitochondrial. *In vitro*, l'activité de l'enzyme alanine-MnSOD est 30 à 40% plus importante en comparaison avec la valine-MnSOD (Sutton *et al.*, 2003). Cependant, la présence de l'allèle C, codant pour l'alanine, a été corrélé à une augmentation du risque de développer des stéato-hépatites non-alcooliques (Huang *et al.*, 2014), ainsi qu'à une augmentation du risque de développer une cirrhose alcoolique (Huang *et al.*, 2016). Il a également été montré que l'homozygotie C/C est associée à une augmentation de la stéatose, des HA et des cirrhoses (Degoul *et al.*, 2001). Enfin, Nahon et ses collaborateurs ont associé l'allèle C à une augmentation du risque de développer une cirrhose, ainsi qu'à une augmentation du risque d'hépatocarcinome et de mortalité chez des patients cirrhotiques (Nahon *et al.*, 2005 ; Nahon *et al.*, 2009). Cette association a également été montrée au cours d'une méta-analyse (Jin *et al.*, 2011).

Le rôle du gène SOD2 rs4880 C>T dans la réponse antioxydante et l'implication de son polymorphisme dans le développement de la MAF en font un gène candidat dans l'étude de la physiopathologie de l'HAA sévère.

D. GLCCI1

Lors d'un traitement par corticothérapie, il a été montré une augmentation de la transcription du gène GLCCI1 qui semble nécessaire aux mécanismes génomiques anti-inflammatoires. En effet, l'augmentation de son transcrit *glcci1* est associée à une augmentation de l'expression de gènes aux propriétés anti-inflammatoires et de leurs protéines. Le gène GLCCI1 est situé sur le locus p21.3 du chromosome 7 et comporte 8 exons (Chapman *et al.*, 1995)

Une étude pangénomique a récemment permis d'identifier deux SNPs du gène GLCCI1 : rs37972 C>T et rs37973 A>G, associés à une baisse du transcrit *glcci1* (Tantisira *et al.*, 2011). Les auteurs ont démontré le caractère fonctionnel des mutations des deux variants génétiques du GLCCI1 qu'ils ont associés à une diminution de la réponse au traitement aux corticostéroïdes inhalés. Cette corrélation a également été observée chez des patients atteints de méningite bactérienne et traitée par corticothérapie (Brouwer *et al.*, 2012)

Le gène *GLCCI1* semble donc jouer un rôle notable dans la réponse anti-inflammatoire au cours d'une corticothérapie. Sa mutation entraîne une augmentation de la résistance chez les patients mutés se traduisant par une diminution de la réponse au traitement.

À l'heure actuelle, aucune donnée n'a été publiée concernant l'implication des polymorphismes (*rs37972 C>T* et *rs37973 A>G*) du gène *GLCCI1* dans les mécanismes de résistance aux corticoïdes au cours d'une HAA sévère, ce qui en fait un gène candidat dans la prédiction de la réponse au traitement. Les deux SNP, *rs37972 C>T* et *rs37973 A>G* du gène *GLCCI1* sont en déséquilibre de liaison totale c'est-à-dire que leur association ne se fait jamais aléatoirement (le locus C du gène *rs37972* est toujours accompagné du locus A du gène *rs37973* et inversement). Au cours de notre étude, nous utiliserons uniquement le *rs37972* afin d'étudier la mutation du gène *GLCCI1*.

VI. Rationnel de l'étude

A. Problématique

L'HAA survient généralement dans un contexte d'alcoolisation massive, de façon aiguë et bruyante. C'est une pathologie fréquente car elle touche entre 10 et 35% des buveurs excessifs (Gao et Bataller, 2011) et son taux de mortalité est élevé à court et moyen terme (Mathurin *et al.*, 2002 ; Ramond *et al.*, 1992).

L'HAA se développe sur un foie stéatosique, fibrosé ou cirrhosé, et les mécanismes du stress oxydatif et de l'endotoxémie sont les deux éléments majeurs de sa physiopathologie (Lucey *et al.*, 2009). Néanmoins, l'implication des mécanismes génétiques dans les voies physiopathologiques de cette maladie reste encore à préciser.

Bien que certains polymorphismes génétiques aient été identifiés, il convient de mieux caractériser l'HAA sur le plan génétique. L'objectif de ces travaux est de définir des biomarqueurs génétiques dans le but de mieux appréhender la maladie, la dépister et d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients, en effectuant un repérage plus précoce des patients sensibles.

B. Question scientifique

Les polymorphismes des gènes impliqués dans la physiopathologie de l'HAA sévère sont-ils des bio-marqueurs pertinents du développement et du traitement de la maladie ?

C. Objectifs

L'objectif de ce travail est de déterminer le rôle des facteurs génétiques dans la vulnérabilité à développer la MAF et la réponse aux corticoïdes grâce à une étude d'association génétique, en comparant la distribution des SNPs de gènes candidats, en fonction des phénotypes de maladie alcoolique du foie. Mon travail portera sur l'implication des polymorphismes rs738409 C>G du gène PNPLA3 et rs4880 C>T du gène SOD2 dans la sévérité de la maladie par une analyse clinico-biologiques. Nous évaluerons également l'implication du polymorphisme rs37972 C>T du gène GLCCI1 dans la réponse à la corticothérapie par l'intermédiaire du score de Lille et selon la mortalité à 6 mois.

MATERIEL ET METHODES

I. Les patients

Les patients ont été inclus à l'étude par le service d'hépatogastro-entérologie du CHU d'Amiens et leurs données médicales et génétiques ont été collectées.

Il s'agit d'une cohorte de 302 individus caucasiens répartis en trois groupes :

- Témoins sains : groupe Contrôle (105)
- Patients atteints de cirrhose sans hépatite alcoolique aiguë : groupe Cirrhose sans HAA (n = 103)
- Patients atteints d'une hépatite alcoolique aiguë sévère : groupe HAA sévère (94)

A. Critères d'inclusion :

Les patients du groupe cirrhose sans HAA devaient correspondre à un tableau clinique, biologique et échographique correspondant au diagnostic d'une cirrhose en l'absence d'antécédent d'HAA.

Les patients du groupe HAA sévère devaient avoir un ictère récent, un score de Maddrey supérieur à 32 et une histologie hépatique correspondant à l'HAA sévère. De plus, leur consommation quotidienne d'alcool devait être supérieure à 50g d'alcool au cours des trois derniers mois.

Les patients ayant une hépatopathie d'origine non-alcoolique ou combiné n'ont pas été inclus à l'étude. Exemple : hépatite d'origine virale, origine génétique, auto-immune. De même pour les patients présentant un cancer du foie ou refusant d'être inclus.

Les individus témoins sont des individus sains et volontaire qui ont été sélectionnés afin de correspondre aux patients du groupe HAA sévère (sur le plan de l'âge et du genre).

B. Echantillonnage

Après accord du patient par consentement écrit, l'ADN était extrait (à partir de prélèvements sanguins) puis stocké par la biobanque de Picardie et mis à disposition après accord du comité d'éthique.

C. Profils cliniques et biologiques

Les données cliniques et biologiques des patients ont été collectées afin d'évaluer le degré de sévérité de la maladie. Les critères cliniques évalués sont : l'âge, le genre, la survie à 6 mois, la présence d'encéphalopathie, d'ascite et de varices oesophagiennes. Les critères biologiques évalués sont le TP, l'albumine, la bilirubine, l'ASAT, les γ GT, les PAL, l'urée, les leucocytes, les protéines C réactives et les plaquettes. La fonction hépatique des patients a été évaluée par l'intermédiaire des scores de Child-Pugh et la sévérité de l'HAA par le score de Maddrey. Enfin, nous avons observé l'influence du génotype dans la mortalité par une analyse de Kaplan-Meier et la réponse au traitement par le calcul du score de Lille à des seuils de 0,45 et 0,56.

II. Protocole expérimental

Les expériences de détermination génotypique ont été réalisées par la technique de réaction en chaîne par polymérase (PCR), sur des appareils StepOneplus®, en ayant recours à la technologie Taqman® (figure 6) ; Applied Biosystems®, Life Technologies®, Thermo Fisher Scientific®, Waltham-Massachusetts-USA. Leur but est d'évaluer de manière qualitative une mutation biallélique d'un patient pour en déterminer le génotype.

La PCR est une méthode permettant de répliquer un fragment d'ADN défini *in vitro* dans des conditions de temps et de milieu contrôlés. Elle se déroule en 2 étapes :

1- l'ADN est déshybridé à une température de 95°C au cours d'un premier cycle de 15 secondes.

2- La température diminue à 60°C durant 60 secondes pour un second cycle permettant la fixation des amorces et des sondes.

- Les amorces sont des oligonucléotides qui se fixent de manière complémentaire au niveau de l'origine du gène d'intérêt : c'est l'hybridation.

- Les sondes sont des oligonucléotides, spécifiques des deux variants de la mutation d'intérêt, qui se fixent par complémentarité au niveau du locus de la mutation. Ces sondes sont couplées à un fluorophore (bleu ou vert) ainsi qu'à un inhibiteur de fluorescence : le quencher.

Les complexes formés entre l'ADN et l'amorce permettent le recrutement de l'ADN polymérase et servent de point de départ à la synthèse du brin complémentaire du gène d'intérêt. On appelle élongation cette étape qui a lieu également durant le second cycle.

C'est l'activité exonucléasique de l'ADN polymérase qui va permettre l'hydrolyse des liaisons phosphodiester de la sonde au cours de la PCR et par conséquent la séparation du fluorophore et du quencher.

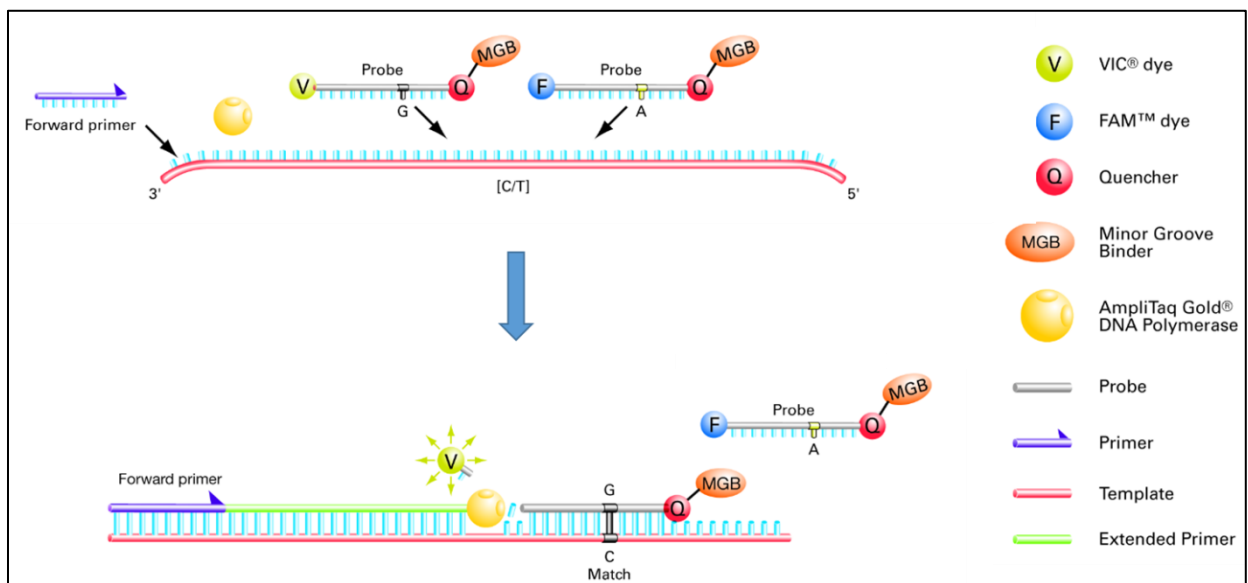


Figure 6 : Séparation du fluorophore et du quencher par l'ADN polymérase au cours de la PCR (Schéma extrait du manuel « Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™, Real-Time PCR Systems Genotyping Experiments » P7)

Ces cycles sont répétés 40 fois au cours de la manipulation et la fluorescence émise est mesurée à chaque fin de cycle. L'observation des courbes de fluorescence permet à l'expérimentateur de déterminer le génotype du patient en se référant aux données du fabricant, un fluorophore correspondant à l'allèle ancestral et le second à l'allèle muté.

Les expériences sont réalisées à l'aveugle par rapport aux données cliniques des patients. L'analyse des courbes obtenues permet de classer les patients par groupes de génotypes : ancestral/ancestral ; ancestral/muté et muté/muté.

III. Réactifs utilisés

Le mélange réactionnel utilisé pour ces réactions est constitué en excès de ces amorces (0,7 μ L) ; de master mix (dNTP et ADN polymérase - 12,5 μ L) ; d'eau ultrapure (8,8 μ L) et des échantillons (3 μ L), selon les préconisations du fournisseur.

Les références des réactifs Thermo Fisher Scientific® utilisés sont les suivantes :

- PNPLA3 : rs738409 ; ID C7241_10
- SOD2 : rs4880 ; ID C8709053_10
- GLCCI1 : rs37972 ; ID C970132_10
- MasterMix : Cat #4371355

IV. Analyse statistique

Les populations testées répondent à la loi Normale ; les comparaisons inter-groupes et de fréquences alléliques sont exprimées en pourcentage et sont réalisées en appliquant une analyse de la variance par un test de χ^2 .

Les données cliniques et biologiques sont exprimées par leurs moyennes \pm écart-type et sont comparées par l'intermédiaire d'un test ANOVA ou de Student (t test).

La mortalité est étudiée et représentée par la méthode de Kaplan-Meier et évaluée par un test de log rank.

L'ensemble des analyses statistiques est traité grâce au logiciel SigmaPlot.

Le seuil de significativité statistique est défini à $p < 0,05$ ce qui donne une puissance statistique $P = 95\%$. De plus, en cas de comparaison multiple, une correction de Bonferroni est appliquée et le seuil de significativité est réduit à $p < 0,004$.

Dans cette étude, les distributions génotypiques des trois groupes respectent l'équilibre d'Hardy-Weinberg ($p_{HWE} > 0,711$ pour PNPLA3), ($p_{HWE} > 0,591$ pour GLCCI1), ($p_{HWE} > 0,575$ pour SOD2).

Bibliographie

Beck F, Richard J.-B, Guignard R, Le Nézet O, Spilka S. (2015) Les niveaux d'usage des drogues en France en 2014, exploitation des données du Baromètre santé 2014. Tendances, n°99, 8 p.

Blue Mountains Eye Study (BMES). (2013). Genome-wide association study of intraocular pressure identifies the GLCCI1/ICA1 region as a glaucoma susceptibility locus. *Hum Mol Genet.* 22(22):4653-60.

Brind A, Fryer A, Hurlstone A, Fisher N, Pirmohamed M. (2003). The role of polymorphism in manganese superoxide dismutase in susceptibility to alcoholic liver disease. *Gastroenterology.* 124(7):2000-2.

Brouwer MC, van der Ende A, Baas F, van de Beek D. (2012). Genetic variation in GLCCI1 and dexamethasone in bacterial meningitis. *J Infect.* 65(5):465-7.

Browning JD, Cohen JC, Hobbs HH. (2010). Patatin-like phospholipase domain-containing 3 and the pathogenesis and progression of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 52: 1189–92.

Chamorro AJ, Torres JL, Mirón-Canelo JA, González-Sarmiento R, Laso FJ, Marcos M. (2014). Systematic review with meta-analysis: the I148M variant of patatin-like phospholipase domain-containing 3 gene (PNPLA3) is significantly associated with alcoholic liver cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther.* 40(6):571-8.

Chapman MS, Qu N, Pascoe S, Chen WX, Apostol C, Gordon D, Miesfeld RL. (1995). Isolation of differentially expressed sequence tags from steroid-responsive cells using mRNA differential display. *Mol Cell Endocrinol.* 108(1-2):R1-7

Cheong HI, Kang HG, Schlondorff J. (2012). GLCCI1 single nucleotide polymorphisms in pediatric nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 27(9):1595-9.

Child CG, Turcotte JG. (1964) Surgery and portal hypertension. In: *The liver and portal hypertension.* Saunders. 50-64.

Colell A, García-Ruiz C, Miranda M, Ardite E, Marí M, Morales A, Corrales F, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC. (1998). Selective glutathione depletion of mitochondria by ethanol sensitizes hepatocytes to tumor necrosis factor. *Gastroenterology.* 115(6):1541-51.

Degoul F, Sutton A, Mansouri A, Capanec C, Degott C, Fromenty B, Beaugrand M, Valla D, Pessayre D. (2001). Homozygosity for alanine in the mitochondrial targeting sequence of super-oxide dismutase and risk for severe alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 120(6):1468–1474

Falleti E, Fabris C, Cmet S, Cussigh A, Bitetto D, Fontanini E, Fornasiere E, Bignulin S, Fumolo E, Bignulin E, Pirisi M, Toniutto P. (2011) PNPLA3 rs738409C/G polymorphism in cirrhosis: relationship with the aetiology of liver disease and hepatocellular carcinoma occurrence. *Liver Int ;* 31:1137-43.

- Fernández-Checa JC, García-Ruiz C, Ookhtens M, Kaplowitz N. (1991). Impaired uptake of glutathione by hepatic mitochondria from chronic ethanol-fed rats. Tracer kinetic studies in vitro and in vivo and susceptibility to oxidant stress. *J Clin Invest.* 87(2):397-405.
- Gao B, Bataller R. (2011). Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology.* 141(5):1572-85.
- Grove J, Daly AK, Bassendine MF, Gilvarry E, Day CP. (2000). Interleukin 10 promoter region polymorphisms and susceptibility to advanced alcoholic liver disease. *Gut.*46(4):540-5.
- Guérin S, Laplanche A, Dunant A, Hill C. (2013). Alcohol-attributable mortality in France *Eur J Public Health.* 23(4):588-93
- He S, McPhaul C, Li JZ, Garuti R, Kinch LN, Grishin NV, Cohen JC, Hobbs HH. (2010). A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 285:6706-6715.
- Hosking L, Bleecker E, Ghosh S, Yeo A, Jacques L, Mosteller M, Meyers D. (2014). GLCC11 rs37973 does not influence treatment response to inhaled corticosteroids in white subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 133(2):587-9.
- Huang Y, He S, Li JZ, Seo YK, Osborne TF, Cohen JC, Hobbs HH. (2010). A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(17):7892-7.
- Huang YS, Chang CH, Lin TL, Perng CL. (2014). Genetic variations of superoxide dismutase 2 and cytochrome P450 2E1 in non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* 34(6):931-6.
- Huang YS, Wang LY, Chang CH, Perng CL, Lin HC. (2016). Superoxide Dismutase 2 Genetic Variation as a Susceptibility Risk Factor for Alcoholic Cirrhosis. *Alcohol And Alcoholism.* ISSN: 0735-0414
- Hrubec Z, Omenn GS. (1981) Evidence of genetic predisposition to alcoholic cirrhosis and psychosis: twin concordances for alcoholism and its biological end points by zygosity among male veterans. *Alcohol ClinExp Res* ;5:207–15.
- Jin F, Xiong WJ, Jing JC, Feng Z, Qu LS, Shen XZ. (2011). Evaluation of the association studies of single nucleotide polymorphisms and hepatocellular carcinoma: a systematic review. *J Cancer Res Clin Oncol.* 137(7):1095-104.
- Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR. (2001) A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology*, vol. 33, no 2, p. 464–70.
- Khan AJ, Choudhuri G, Husain Q, Parmar D. (2009). Polymorphism in glutathione-S-transferases: a risk factor in alcoholic liver cirrhosis. *Drug Alcohol Depend.* 101(3):183-90
- Kollerits B, Coassin S, Kiechl S, Hunt SC, Paulweber B, Willeit J, Brandstätter A, Lamina C, Adams TD, Kronenberg F. (2010). A common variant in the adiponutrin gene influences liver enzyme values. *J Med Genet* 47:116-9.

Kopp P. (2015) Le coût social des drogues en France. OFDT, 75p.

Krawczyk M, Grünhage F, Zimmer V, Lammert F. (2011) Variant adiponutrin (PNPLA3) represents a common fibrosis risk gene: non-invasive elastography-based study in chronic liver disease. *J Hepatol* 55:299-306.

Ladero JM, Martínez C, García-Martin E, Fernández-Arquero M, López-Alonso G, de la Concha EG, Díaz-Rubio M, Agúndez JA. (2005). Polymorphisms of the glutathione S-transferases mu-1 (GSTM1) and theta-1 (GSTT1) and the risk of advanced alcoholic liver disease. *Scand J Gastroenterol.* 40(3):348-53.

Lieber, C.S. (2004). Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* ; 34(1):9-19.

Louvet A, Naveau S, Abdelnour M, Ramond MJ, Diaz E, Fartoux L, Dharancy S, Texier F, Hollebecque A, Serfaty L, Boleslawski E, Deltenre P, Canva V, Pruvot FR, Mathurin P. (2007). The Lille model: a new tool for therapeutic strategy in patients with severe alcoholic hepatitis treated with steroids. *Hepatology.*45(6):1348-54.

Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR. (2009). Alcoholic hepatitis. *N Engl J Med.*360(26):2758-69.

Maddrey WC, Boitnott JK, Bedine MS, Weber FL Jr, Mezey E, White RI Jr. (1978). Corticosteroid therapy of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology*;75:193-9.

Marcos M, Pastor I, González-Sarmiento R, Laso FJ. (2009). Common polymorphisms in interleukin genes (IL4, IL6, IL8 and IL12) are not associated with alcoholic liver disease or alcoholism in Spanish men. *Cytokine.* 45(3):158-61.

Mathurin P, Mendenhall CL, Carithers RL Jr, Ramond MJ, Maddrey WC, Garstide P, Rueff B, Naveau S, Chaput JC, Poynard T. (2002). Corticosteroids improve short-term survival in patients with severe alcoholic hepatitis (AH): individual data analysis of the last three randomized placebo controlled double blind trials of corticosteroids in severe AH. *J Hepatol* ; 36(4):480-7.

Mathurin P, O'Grady J, Carithers RL, Phillips M, Louvet A, Mendenhall CL, Ramond MJ, Naveau S, Maddrey WC, Morgan TR. (2011). Corticosteroids improve short-term survival in patients with severe alcoholic hepatitis: meta-analysis of individual patient data. *Gut.* 60(2):255-60.

Miller AM, Horiguchi N, Jeong WI, Radaeva S, Gao B. (2011). Molecular mechanisms of alcoholic liver disease: innate immunity and cytokines. *Alcohol Clin Exp Res.*35(5):787-93.

Nahon P, Sutton A, Pessayre D, Rufat P, Degoul F, Ganne-Carrie N, Ziol M, Charnaux N, N'kontchou G, Trinchet JC, Gattegno L, Beaugrand M. (2005). Genetic dimorphism in superoxide dismutase and susceptibility to alcoholic cirrhosis, hepatocellular carcinoma, and death. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 3(3):292-8.

- Nahon P, Sutton A, Rufat P, Ziol M, Akouche H, Laguillier C, Charnaux N, Ganne-Carrié N, Grando-Lemaire V, N'Kontchou G, Trinchet JC, Gattegno L, Pessayre D, Beaugrand M. (2009). Myeloperoxidase and superoxide dismutase 2 polymorphisms comodule the risk of hepatocellular carcinoma and death in alcoholic cirrhosis. *Hepatology*. 50(5):1484-93.
- Naveau S, Giraud V, Borotto E, Aubert A, Capron F, Chaput JC. (1997). Excess weight risk factor for alcoholic liver disease. *Hepatology*. 25(1):108-11.
- Nishibori Y, Katayama K, Parikka M, Oddsson A, Nukui M, Hultenby K, Wernerson A, He B, Ebarasi L, Raschperger E, Norlin J, Uhlén M, Patrakka J, Betsholtz C, Tryggvason K. (2011). Glcc1 deficiency leads to proteinuria. *J Am Soc Nephrol*. 22(11):2037-46.
- Nguyen-Khac E, Houchi H, Daoust M, Dupas JL, Naassila M. (2008). The -308 TNFalpha gene polymorphism in severe acute alcoholic hepatitis: identification of a new susceptibility marker. *Alcohol Clin Exp Res*. 32(5):822-8.
- Nguyen-Khac E, Houchi H, Daoust M, Dupas JL, Naassila M. (2010). Lack of association between tumour necrosis factor receptor types 1 and 2 gene polymorphism and severe acute alcoholic hepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 22(7):794-800.
- Nguyen-Khac E, Cadranel JF, Goichot B, Denis J, Bronowicki JP, Thevenot T, Roudot-Thoraval S, Naveau S. (2010). Severe acute alcoholic hepatitis in France (AAH) in 2008: a nationwide survey results (AFEF, ANGH, SNFMI). *J Hepatol* ; 52(Suppl. 1):S445.
- Nguyen-Khac E, Thevenot T, Piquet MA, Benferhat S, Gorla O, Chatelain D, Tramier B, Dewaele F, Ghrib S, Rudler M, Carbonell N, Tossou H, Bental A, Bernard-Chabert B, Dupas JL. AAH-NAC Study Group. (2011). Glucocorticoids plus N-acetylcysteine in severe alcoholic hepatitis. *N Engl J Med*. 10;365(19):1781-9.
- Paille F, Reynaud M. (2015). L'alcool, une des toutes premières causes d'hospitalisation en France, BEH - Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire, n° 24-25, 2015, pp. 440-449
- Perera CS, St Clair DK, McClain CJ. (1995). Differential regulation of manganese superoxide dismutase activity by alcohol and TNF in human hepatoma cells. *Arch Biochem Biophys*. 323(2):471-6.
- Pessayre D, Fromenty B, Mansouri A. (2004). Mitochondrial injury in steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 16(11):1095-105.
- Pingitore P, Pirazzi C, Mancina RM, Motta BM, Indiveri C, Pujia A, Montalcini T, Hedfalk K, Romeo S. (2013). Recombinant PNPLA3 protein shows triglyceride hydrolase activity and its I148M mutation results in loss of function. *Biochim Biophys Acta*. S1388-1981(13)00279-5.
- Polavarapu R, Spitz DR, Sim JE, Follansbee MH, Oberley LW, Rahemtulla A, Nanji AA. (1998). Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil. *Hepatology*. 27(5):1317-23.

Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R (1973). Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *The British journal of surgery*, 60 (8): 646–9.

Quax RA, Manenschijn L, Koper JW, Hazes JM, Lamberts SW, van Rossum EF, Feelders RA. (2013). Glucocorticoid sensitivity in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. (11):670-86.

Ramond MJ, Poynard T, Rueff B, Mathurin P, Théodore C, Chaput JC, Benhamou JP. (1992). A randomized trial of prednisolone in patients with severe alcoholic hepatitis. *N Engl J Med*. 20;326(8):507-12.

Rao R. (2009). Endotoxemia and gut barrier dysfunction in alcoholic liver disease. *Hepatology*. 50(2):638-44.

Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. (2008). Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 40(12):1461-5.

Romeo S, Sentinelli F, Cambuli VM, Incani M, Congiu T, Matta V, Pilia S, Huang-Doran I, Cossu E, Loche S, Baroni MG. (2010). The 148M allele of the PNPLA3 gene is associated with indices of liver damage early in life. *J Hepatol* 53:335-8.

Rotman Y, Koh C, Zmuda JM, Kleiner DE, Liang TJ. (2010). The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 52:894-903

Roumestan C, Gougat C, Jaffuel D, Mathieu M. (2004). Glucocorticoids and their receptor: mechanisms of action and clinical implications. *Rev Med Interne*. 25(9):636-47.

Sheron N, Bird G, Koskinas J, Portmann B, Ceska M, Lindley I, Williams R. (1993). Circulating and tissue levels of the neutrophil chemotaxin interleukin-8 are elevated in severe acute alcoholic hepatitis, and tissue levels correlate with neutrophil infiltration. *Hepatology*. 18(1):41-6.

Sookoian S, Pirola CJ. (2011). Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 53:1883-94

Srikureja W, Kyulo NL, Runyon BA, Hu KQ. (2005) MELD score is a better prognostic model than Child-Turcotte-Pugh score or Discriminant Function score in patients with alcoholic hepatitis. *J Hepatol*.42(5):700-6.

Stewart SF, Leathart JB, Chen Y, Daly AK, Rolla R, Vay D, Mottaran E, Vidali M, Albano E, Day CP. (2002). Valine-alanine manganese superoxide dismutase polymorphism is not associated with alcohol-induced oxidative stress or liver fibrosis. *Hepatology*. 36(6):1355-60.

Stickel F, Buch S, Lau K, Meyer zu Schwabedissen H, Berg T, Ridinger M, Rietschel M, Schafmayer C, Braun F, Hinrichsen H, Günther R, Arlt A, Seeger M, Müller S, Seitz HK, Soyka M, Lerch M, Lammert F, Sarrazin C, Kubitz R, Häussinger D, Hellerbrand C, Bröring D, Schreiber S, Kiefer F, Spanagel R, Mann K, Datz C, Krawczak M, Wodarz N, Völzke H,

Hampe J. (2011) Genetic variation in the PNPLA3 gene is associated with alcoholic liver injury in caucasians. *Hepatology*. 53:86-95.

Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Capanec C, Pessayre D, Degoul F. (2003). The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics*. 13(3):145-57.

Szalai R, Matyas P, Varszegi D, Melegh M, Magyar L, Jaromi L, Sumegi K, Duga B, Kovesdi E, Hadzsiev K, Melegh B. (2014). Admixture of beneficial and unfavourable variants of GLCCI1 and FCER2 in Roma samples can implicate different clinical response to corticosteroids. *Mol Biol Rep*. 41(11):7665-9.

Tantisira KG, Lasky-Su J, Harada M, Murphy A, Litonjua AA, Himes BE, Lange C, Lazarus R, Sylvia J, Klanderman B, Duan QL, Qiu W, Hirota T, Martinez FD, Mauger D, Sorkness C, Szeffler S, Lazarus SC, Lemanske RF Jr, Peters SP, Lima JJ, Nakamura Y, Tamari M, Weiss ST. (2011). Genomewide association between GLCCI1 and response to glucocorticoid therapy in asthma. *N Engl J Med*. 365(13):1173-83.

Trépo E, Gustot T, Degré D, Lemmers A, Verset L, Demetter P, Ouziel R, Quertinmont E, Vercruysse V, Amininejad L, Deltenre P, Le Moine O, Devière J, Franchimont D, Moreno C. (2011). Common polymorphism in the PNPLA3/adiponutrin gene confers higher risk of cirrhosis and liver damage in alcoholic liver disease. *J Hepatol*. 55:906-12.

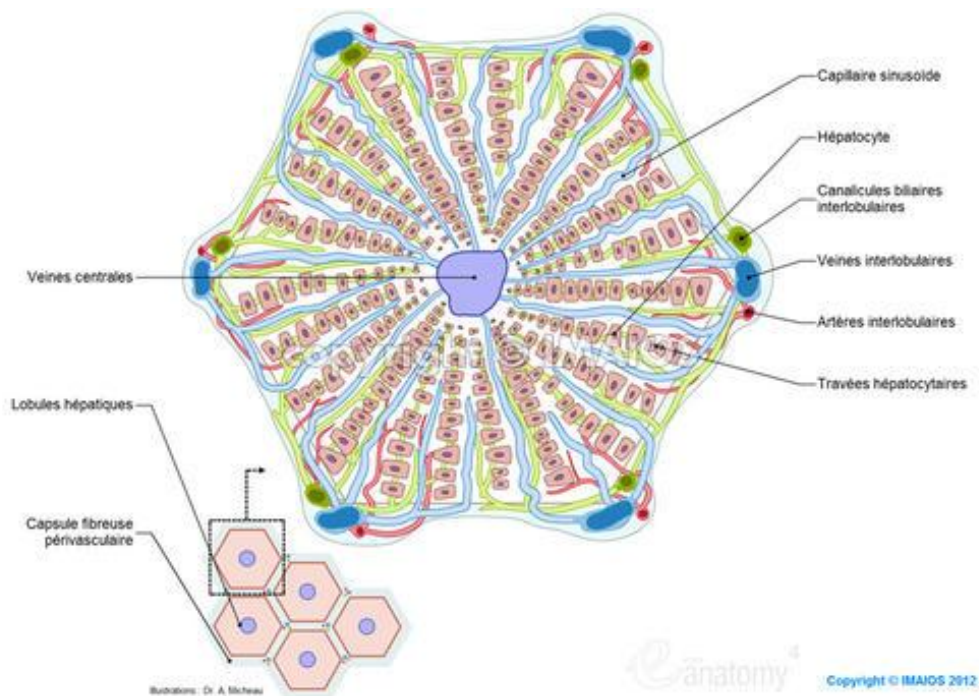
Vijverberg SJ, Tavendale R, Leusink M, Koenderman L, Raaijmakers JA, Postma DS, Koppelman GH, Turner SW, Mukhopadhyay S, Palmer CN, Maitland-van der Zee AH. (2014). Pharmacogenetic analysis of GLCCI1 in three north European pediatric asthma populations with a reported use of inhaled corticosteroids. *Pharmacogenomics*. (6):799-806.

Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, Bhanot S, Monia BP, Li YX and Diehl AM. (2007). Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 45: 1366–1374.

Yin M, Wheeler MD, Kono H, Bradford BU, Gallucci RM, Luster MI, Thurman RG. (1999). Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology* 117:942–52.

ANNEXES

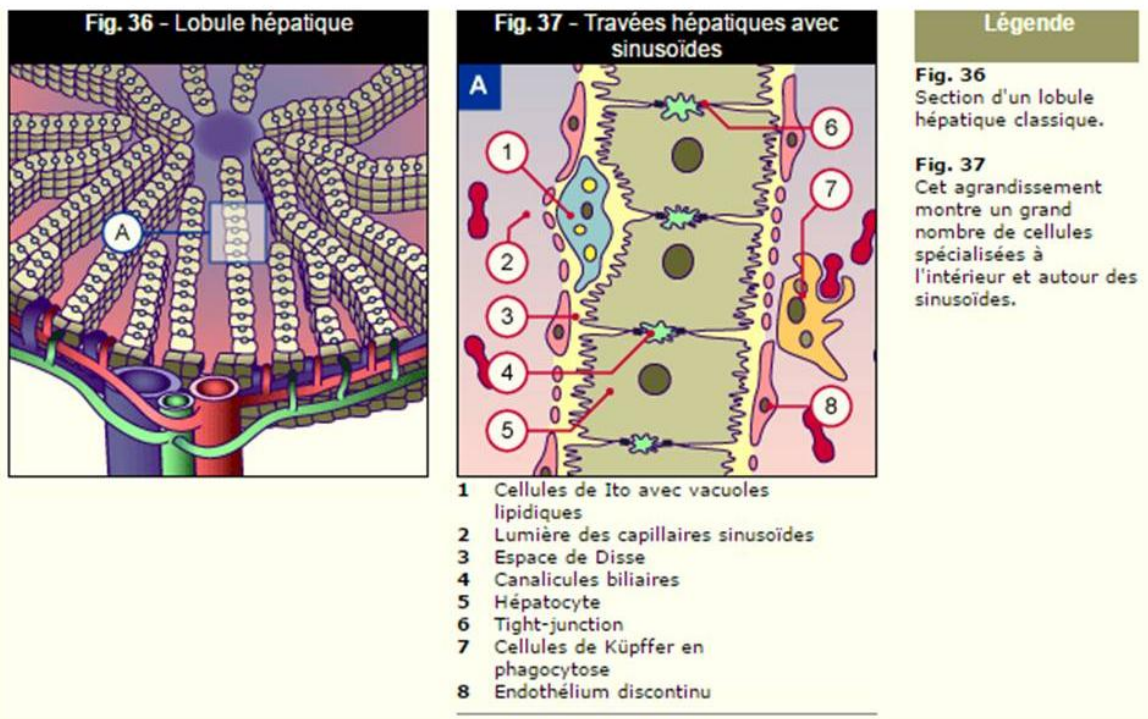
Annexe 1 : Représentation schématique d'un lobule hépatique :



<https://www.imaios.com/fr/e-Anatomy/Thorax-Abdomen-Pelvis/Systeme-digestif-Illustrations>

Dr A Micheau

Annexe 2 : Représentation schématique d'une travée hépatique :



<http://www.embryology.ch/francais/sdigestive/leber02.html#>

**ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE**

Implication de facteurs génétiques dans le développement de l'hépatopathie alcoolique et la réponse au traitement

BUTTOLO Romain

Soutenu le 12 décembre 2017

Résumé :

L'Hépatite Alcoolique Aiguë (HAA) sévère est l'une des formes des plus graves de Maladie Alcoolique du Foie (MAF), et engage le pronostic vital du patient à court et moyen terme. La MAF suit une trajectoire physiopathologique au cours de laquelle le stress oxydatif et l'inflammation jouent un rôle majeur, influencé par des paramètres tels que l'accumulation de triglycérides ou l'endotoxémie.

Des données impliquant des polymorphismes génétiques ont été associés à la physiopathologie d'hépatopathie. Les polymorphismes rs738409 du gène PNPLA3 et rs4880 du gène SOD2 ont notamment été associés au risque de stéatose et de fibrose dans des stéato-hépatites non-alcooliques et dans la MAF. Par ailleurs, la résistance à la corticothérapie au cours de l'HAA sévère est fréquente et entraîne un taux de décès d'environ 80% à 6 mois. Le polymorphisme rs37972 du gène GLCCI1 a été associé à une corticorésistance dans une étude de GWAS chez des patients asthmatiques.

Le but de notre travail a été d'évaluer l'impact de ces polymorphismes, dans la physiopathologie et la réponse au traitement de l'HAA sévère.

Notre étude a été réalisée par des techniques de PCR, sur une population de 94 patients HAA sévères, 103 cirrhotiques alcooliques sans HAA et 105 témoins sains. La sévérité de la maladie a été évaluée par l'intermédiaire des données clinico-biologiques des patients et la réponse au traitement par le score de Lille.

Au cours de notre travail, nous avons notamment associé l'implication du polymorphisme rs738409, du gène de l'adiponutrine, à la sévérité de la pathologie, ainsi qu'à l'augmentation du risque de mortalité à 6 mois pour les patients HAA sévères porteurs de l'allèle G. Nous avons également associé le polymorphisme rs37972 du gène GLCCI1 à la réponse à la corticothérapie, afin de l'utiliser comme marqueur précoce de la réponse au traitement chez les patients HAA sévères.

Mots clefs : Hépatite alcoolique aiguë, polymorphismes génétiques, PNPLA3, SOD2, GLCCI1, physiopathologie, réponse au traitement.