AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par

Adeline GERMAIN

Étude des facteurs génétiques prédictifs de l'histoire naturelle post-opératoire de la maladie de Crohn

Le 17 Novembre 2015

Membres du jury:

Rapporteurs :	Mr Stéphane BERDAH	PU-PH, Service de Chirurgie Viscérale et Digestive, Marseille
	Mr Yves PANIS	PU-PH, Service de Chirurgie Colorectale, Clichy
Examinateurs :	Mr Laurent BRESLER	PU-PH, Service de Chirurgie Digestive, Hépato-biliaire, Endocrinienne et Cancérologique, Nancy
	Mr Jean-Louis GUEANT	PU-PH, Directeur de l'unité Inserm U954, Université de Lorraine Co-directeur de thèse
	Mr Medhi KAROUI	PU-PH, Service de Chirurgie Digestive et Hépato-bilio-pancréatique, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris
	Mr Laurent PEYRIN-BIROULET	PU-PH, Unité Inserm U954, Université de Lorraine Directeur de thèse
Membres invités:	Mr Ahmet AYAV	PU-PH, Service de Chirurgie Digestive, Hépato-biliaire, Endocrinienne et Cancérologique, Nancy
	Mme Rosa-Maria GUEANT	PU-PH, Unité Inserm U954, Université de Lorraine

---

UMR 954 INSERM, Laboratoire de Nutrition, génétique et exposition aux risques environnementaux, 9 avenue de la Forêt de Haye-Faculté de Médecine 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy

Sommaire

Étude des facteurs génétiques prédictifs de l'histoire naturelle post-opératoire de la maladie de Crohn....1

Sommaire....2

Remerciements....5

Liste des communications et des publications....7

Publications....7

Communications orales....7

Liste des abréviations....8

Liste des figures....10

Liste des tableaux....11

Introduction....12

La maladie de Crohn....15

Epidémiologie....15

Les manifestations cliniques de la maladie de Crohn....17

Les complications de la maladie de Crohn....17

Les complications intestinales....17

Les complications extra-intestinales....20

Mortalité....20

Physiopathologie de la maladie de Crohn....21

Les facteurs environnementaux....23

Les facteurs immunitaires....25

Les facteurs génétiques....27

Le traitement chirurgical de la maladie de Crohn.....31

Les principes de la chirurgie dans la maladie de Crohn.....32

En cas de localisation sur l'intestin grêle.....32

En cas de localisation colique et/ou rectale.....33

Les complications infectieuses intra-abdominales post-opératoires.....36

Etude N°1 : L'effet du traitement immunosuppresseur sur l'infection de site opératoire après une résection pour maladie de Crohn.....37

Histoire naturelle de la récidive post-opératoire.....51

Facteurs cliniques prédictifs de la récidive post-opératoire.....52

Principes des études génétiques.....53

Les polymorphismes.....53

Les maladies complexes.....54

Les études d'association génétique.....54

Analyses statistiques.....55

L'équilibre d'Hardy Weinberg.....55

Analyses statistiques utilisées dans les études d'association.....56

Facteurs de confusion et interactions.....57

Étude d'association des facteurs génétiques prédictifs de l'histoire naturelle post-opératoire de la maladie de Crohn.....59

Les objectifs de notre travail.....59

Etude N°2 : Un variant génétique de *CARD8* est un facteur de risque de récidive chirurgicale de la maladie de Crohn.....60

Résumé.....60

Résultats scientifiques.....64

Etude N°3 : Un variant génétique de *NOD2* est un facteur de risque de complication post-opératoire de la maladie de Crohn (manuscrit soumis).....75

Résumé.....75

Résultats scientifiques.....79

Discussion générale et perspectives 92

L'effet du traitement immunosuppresseur sur l'infection de site opératoire après une résection pour maladie de Crohn.....93

Un variant génétique de *CARD8* est un facteur de risque de récidive chirurgicale de la maladie de Crohn.....94

Un variant génétique de *NOD2* est un facteur de risque de complication post-opératoire de la maladie de Crohn.....96

Conclusion.....98

Références.....99

Annexes 111

Annexe 1 – The effect of immune therapy on surgical site infection following Crohn's Disease resection. 111

.....116

Annexe 2 – CARD8 gene variant is a risk factor for recurrent surgery in patients with Crohn's disease.....117

Annexe 3 - NOD2 gene variant is a risk factor for post-operative complications in patients with Crohn's disease: a genetic association study.....123

Annexe 4 – Liste des SNPs étudiés et des gènes correspondants.....146

Remerciements

A Monsieur le Professeur Ahmet Ayav

Votre écoute, vos conseils et votre soutien, à chaque étape, nous ont permis d'aboutir à la réalisation de ce travail. Votre disponibilité permanente est une aide inestimable, votre détermination, un modèle à suivre.
Trouvez ici le témoignage de notre grande amitié et de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Stéphane Berdah

Vous avez accepté de juger ce travail et nous en sommes très honorés.
Recevez l'expression de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Laurent Bresler

Vous nous avez accordés votre confiance et nous espérons en être à la hauteur. Nous vous remercions pour votre soutien.
Recevez l'expression de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Jean-Louis Guéant

Vous nous avez accueillis au sein de votre unité et nous vous en remercions. Nous espérons que ce travail sera à la hauteur de vos attentes.
Recevez l'expression de notre profond respect.

A Madame le Professeur Rosa-Maria Guéant

Vous nous avez aidé dans la réalisation de ce travail et nous vous en remercions.
Recevez l'expression de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Medhi Karoui

Vous avez immédiatement accepté de juger ce travail et nous vous en sommes reconnaissants.
Recevez l'expression de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Yves Panis

Vous avez accepté de juger ce travail et nous vous en remercions.
Recevez l'expression de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Laurent Peyrin-Biroulet

Votre enthousiasme, votre dynamisme et votre disponibilité ont suscité notre admiration et ont été d'une grande aide tout au long de ce travail. Nous vous remercions pour la confiance que vous nous avez accordée.
Trouvez ici le témoignage de notre profond respect.

A Messieurs les Professeurs Ahmet Ayav, Laurent Bresler et Laurent Brunaud,

Vous m'avez accordé votre confiance il y a plusieurs années et je vous en serai toujours reconnaissante. J'espère être à la hauteur de celle-ci. Travailler à vos côtés chaque jour est une chance inestimable. Vos personnalités si différentes et si complémentaires me permettent de trouver un équilibre parfait au sein du service. Je vous remercie pour votre soutien constant.

"Le bon professeur est celui qui suggère plutôt qu'impose, et qui donne à son élève l'envie d'enseigner lui aussi." Edward Bulwer-Lytton

A mes parents,

Merci pour votre soutien indéfectible à chaque étape de ce parcours qui vous paraît sans fin.

A mes amis,

Carole et Ahmet. Merci d'être présents, toujours, dans les bons moments comme dans les moins bons. Votre amitié m'est précieuse et indispensable.

Catherine et Stéphane. Votre amitié, votre gentillesse et votre enthousiasme sont un soutien inestimable pour moi, merci d'être là.

Marie et Richard. Votre amitié est de celles qui ne bougent pas avec le temps ni la distance. Merci.

Myriam et Claire. Il n'est pas possible de vous dissocier, votre complicité galvanise notre amitié. Même si nos routes s'éloignent, notre amitié suivra toujours le même chemin. Merci d'être là.

Adeline, Catherine, Floriane, Julie, Marie, Nadine, Sophie. Les années passent et vous êtes toujours là. Notre amitié est essentielle pour moi et m'aide à chaque étape. Merci.

Valérie. Ton enthousiasme, ton dynamisme et ta ténacité sont un exemple pour moi. Nos discussions m'aident infiniment, et ton écoute attentive m'est précieuse. Merci.

Aux internes et assistants passés dans le service, qui m'ont donné, et me donnent envie de continuer ce parcours.

A l'ensemble du personnel du service de Chirurgie Digestive, Hépato-biliaire, Endocrinienne et Cancérologique du CHU de Nancy.

Liste des communications et des publications

Publications

The effect of immune therapy on surgical site infection following Crohn's Disease resection. Thomas Serradori, **Adeline Germain**, ML Scherrer, C Ayav, M Perez, B Romain, JP Palot, S Rohr, L Peyrin-Biroulet, L Bresler. Br J Surg. 2013 Jul;100(8):1089–93.

CARD8 gene variant is a risk factor for recurrent surgery in patients with Crohn's disease **Adeline Germain**, Rosa-Maria Guéant, Mathias Chamaillard, Laurent Bresler, Jean-Louis Guéant, Laurent Peyrin-Biroulet. Dig Liver Dis. 2015 Jul 29. pii: S1590-8658(15)00419-3. doi: 10.1016/j.dld.2015.07.013.

NOD2 gene variant is a risk factor for post-operative complications in patients with Crohn's disease: a genetic association study

Adeline Germain, Rosa-Maria Guéant, Mathias Chamaillard, Patrick B. Allen, Laurent Bresler, Jean-Louis Guéant, Laurent Peyrin-Biroulet. Soumis.

Communications orales

NOD2 gene variant is a risk factor for post-operative complications in patients with Crohn's disease: a genetic association study

ESCP 2015, 10th Scientific and Annual Meeting of the European Society of Coloproctology, Ireland, Dublin, 23 - 25 September 2015.

Liste des abréviations

MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
MC	Maladie de Crohn
RCH	RectoColite Hémorragique
GWAS	Genome Wild Association Studies
NOD2	Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2
CARD15	CAspase Recruitment Domain-containing protein 15
CIIP	Complications Infectieuses Intra-abdominales Post-opératoires
RR	Risque Relatif
OR	Odds Ratio
TLR	Toll-Like Receptors
TGF-beta	Transforming Growth Factor -beta
MDP	peptidoglycan-derived Muramyl DiPeptide
NF-κB	Nuclear Factor –Kappa B
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ATG16L1	AuTophaGy-related protein 16-1
IRGM	Immunity-Related GTPase family M protein
LRRK2	Leucine-Rich Repeat Kinase 2

IL23R	Interleukin 23 Receptor
JAK2	Janus kinase 2
STAT3	Signal Transducer ans Activator of Transcription 3
Anti-TNF alpha	Anti-Tumor Necrosis Factor alpha
RPO	Récidive Post-Opératoire
CNV	Copy Number Variation
APOE4	APOlipoprotein E4
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4
ANOVA	ANalysis Of VAriance
ANCOVA	ANalysis Of COVAriance
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
DS	Dérivation Standard
CARD8	CAspase Recruitment Domain-containing protein 8
NAT2	N-AcetylTransferase 2
NLRP3	NOD-Like Receptor family, pyrin domain containing 3
ASC	Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD
TUCAN	Tumor-Upregulated CARD-containing antagonist of caspase 9

Liste des figures

Figure 1 - Prévalence des MICI dans le monde (Source ONU).....15

Figure 2 - Gradient nord/sud de la maladie de Crohn en France (Source EPIMAD) 16

Figure 3 Probabilité cumulée de complications intestinales pénétrantes ou sténosantes à partir de la date du diagnostic 17

Figure 4 – Résection iléo-caecale pour bloc fistuleux iléo-iléal 18

Figure 5 - Incidence cumulée des fistules intestinales et des fistules ano-périnéales dans une population de 176 patients suivis pendant 23 ans 19

Figure 6 - Répartition de la fréquence des fistules selon leur type (ano-périnéale, entéro-entérique, recto-vaginale et autre) 19

Figure 7 - La maladie de Crohn est une pathologie multifactorielle 22

Figure 8 Coloproctectomie totale avec iléostomie définitive par voie laparoscopique 34

Figure 9 – Algorithme du traitement chirurgical de la maladie de Crohn de localisation colorectale 35

Figure 10 Indication for first surgery in 280 genotyped Crohn's disease patients. 68

Figure 11 Survival curve for time to surgical recurrence according to *Caspase recruitment domain-containing protein 8* genotype. 71

Figure 12 - Indications for first surgery. 84

Figure 13 Kaplan Meier curve for post-operative intra-abdominal infectious complications according to *NOD2* genotype. 88

Liste des tableaux

Tableau 1 Classification de Montréal. 21

Tableau 2 Exemples de gènes de susceptibilité à la MC. 27

Tableau 3 - Comparison of baseline data between groups with and without infection. 45

Tableau 4 - Comparison of perioperative data between groups with and without infection. 46

Tableau 5 - Comparison of specific treatments and centres between groups with and without infection. 47

Tableau 6 - Multivariable logistic regression analysis of risk of postoperative intra-abdominal infections in patients with Crohn's disease. 48

Tableau 7 Clinical characteristics of CD patients according to surgical recurrence. 69

Tableau 8 *CARD8 and NAT2* allele frequency distribution. 70

Tableau 9 Multivariable logistic regression analysis of risk of surgical récurrence 71

Tableau 10 Clinical characteristics of CD patients according to post-operative complications. 86

Tableau 11 NOD2 allele frequency distribution. 87

Introduction

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont un groupe d'affections idiopathiques. Ces maladies représentent un véritable problème de santé publique compte tenu de leur fréquence (3 millions en Europe et 200.000 en France) (1,2), leur coût de prise en charge (3,4), leur pronostic à court et à long terme (5,6), leur retentissement sur la qualité de vie, et du handicap fonctionnel qu'elles engendrent (7). Le terme de maladie inflammatoire chronique intestinale regroupe trois entités différentes: la MC, la RCH et les colites indéterminées. Ces entités présentent des phénotypes clinico-pathologiques similaires mais différent sur leurs caractéristiques histologiques et leur localisation sur le tractus digestif. La MC se distingue de la RCH par sa localisation iléale, par son atteinte périnéale, par ses fistules, par les granulomes à l'histologie et par l'atteinte de toute la paroi intestinale alors que celle-ci reste muqueuse dans la RCH.

Malgré une présentation clinique différente, la MC et la RCH partagent une pathogénèse complexe qui reste partiellement connue à ce jour, multifactorielle, associant des facteurs génétiques de prédisposition à des facteurs environnementaux, à une modification de la flore bactérienne digestive et à une altération de la perméabilité intestinale, qui contribuent à l'apparition des lésions intestinales.

Il n'existe actuellement pas de traitement médical curatif de la MC. Les traitements médicaux permettent un contrôle à plus ou moins long terme de la maladie, mais le risque de devoir recourir à la chirurgie reste important. Celui-ci est évalué à 40-55% après 10 ans d'évolution de la maladie (8).

En ce qui concerne l'histoire naturelle post-opératoire de la MC, celle-ci est d'abord marquée par un risque important de survenue de complications intra-abdominales infectieuses post-opératoires

(CIIP) qui exposent au risque de reprise chirurgicale et de confection de stomies temporaires ou définitives (9). Il est donc important de connaître les facteurs de risque de CIIP afin de définir une prise en charge personnalisée de chaque patient dans le but d'améliorer sa qualité de vie. Des facteurs de risque cliniques tels que le tabagisme actif, la dénutrition, la prise de corticoïdes, la découverte d'une fistule ou d'un abcès en per-opératoire ont été décrits comme augmentant le risque de CIIP, faisant passer ce risque de 5% si aucun facteur n'était présent à 50% si ces 4 facteurs étaient présents (10). Ces facteurs sont actuellement pris en compte pour décider d'un rétablissement de la continuité digestive immédiat ou non. En ce qui concerne l'influence du traitement pré-opératoire sur la survenue de CIIP, une méta-analyse a montré que l'utilisation d'anti-TNF alpha pendant la période pré-opératoire augmentait significativement le risque de survenue de complications post-opératoires globales (OR: 1.45; 95% CI: 1.03-2.05) (11). Cependant, en raison des limites propres à ce type d'étude, les données de cette méta-analyse nécessitaient d'être confirmées par une étude en population de grande échelle ne s'intéressant qu'aux CIIP. La première partie de notre travail a donc consisté à réaliser une étude de l'influence du traitement immunosuppresseur sur le risque de survenue des CIIP sur une population interrégionale française de patients atteints d'une MC et ayant bénéficié d'une résection iléo-colique.

D'autre part, l'histoire naturelle post-opératoire de la MC est marquée par la récidive post-opératoire (RPO). En effet, la chirurgie ne permet pas de traiter de manière curative la MC, la récidive est la règle. Les manifestations cliniques de la RPO sont très variables. On différencie 3 types de récidives (12–14):

- les récidives cliniques dont le taux est de 18 à 30% après 1 an et de 50 à 60% après 5 ans (13).
- les récidives endoscopiques dont le taux est de 45% à 80% à 12 mois et de 80% à 100% à 3 ans de la chirurgie (13).

- les récidives chirurgicales dont le risque est évalué à 25 à 30% à 10 ans après la première chirurgie (15,16)

Il est donc essentiel de comprendre la pathogénie de la MC afin d'identifier des facteurs prédictifs de la RPO, ce qui permettrait d'élaborer des prises en charge personnalisées pour chaque patient et non des prises en charge standardisées.

L'étude des facteurs génétiques influençant l'histoire naturelle de la MC est en plein développement. Des études d'association pangénomiques (GWAS) ont permis d'identifier de nombreux gènes associés à la RCH, à la MC, et aux MICI en général. De nombreuses équipes se sont attachées à l'étude de la corrélation génotype/phénotype selon le polymorphisme génétique des patients. Le premier gène de susceptibilité identifié est le *nucleotide oligomerization domain 2 (NOD2),* mis en évidence en 2001 par 2 équipes indépendantes (17,18). Il marque une étape clef dans la compréhension de la MC en proposant un agent étiologique et une voie originale d'activation de l'inflammation. Mais, la valeur diagnostique et pronostique du génotypage *NOD2/CARD15* ne permet pas à l'heure actuelle de l'inclure dans les outils diagnostiques et thérapeutiques en pratique courante.

Le génotypage des patients atteints de la MC pourrait être utile à l'élaboration de la stratégie thérapeutique et notamment chirurgicale et permettrait de personnaliser la prise en charge de chaque patient, mais il n'est pas à l'heure actuelle utilisable en soins courants.

Ainsi, l'autre partie de ce travail de thèse repose sur l'hypothèse que le polymorphisme génétique pourrait expliquer une partie des différences interindividuelles observées dans l'histoire naturelle post-opératoire des patients porteurs d'une MC. Nous avons donc réalisé 2 études d'association génétique étudiant l'influence du polymorphisme génétique sur le risque de récidive chirurgicale et sur le risque de CIIP chez les patients ayant eu une résection digestive pour MC.

La maladie de Crohn

Epidémiologie

Actuellement, l'incidence de la MC est la plus forte en Amérique du Nord (20,2 nouveaux cas par an pour 100000 habitants), alors que l'incidence de la RCH est la plus forte en Europe (24,3 nouveaux cas par an pour 100000 habitants). On note une émergence des MICI dans les pays en cours d'industrialisation tels que le Chine, l'Inde, la Corée du Sud, l'Afrique du Nord (19,20). La France présente une incidence plus élevée de MC que la plupart des pays d'Europe (8,2 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants) (Figure 1).

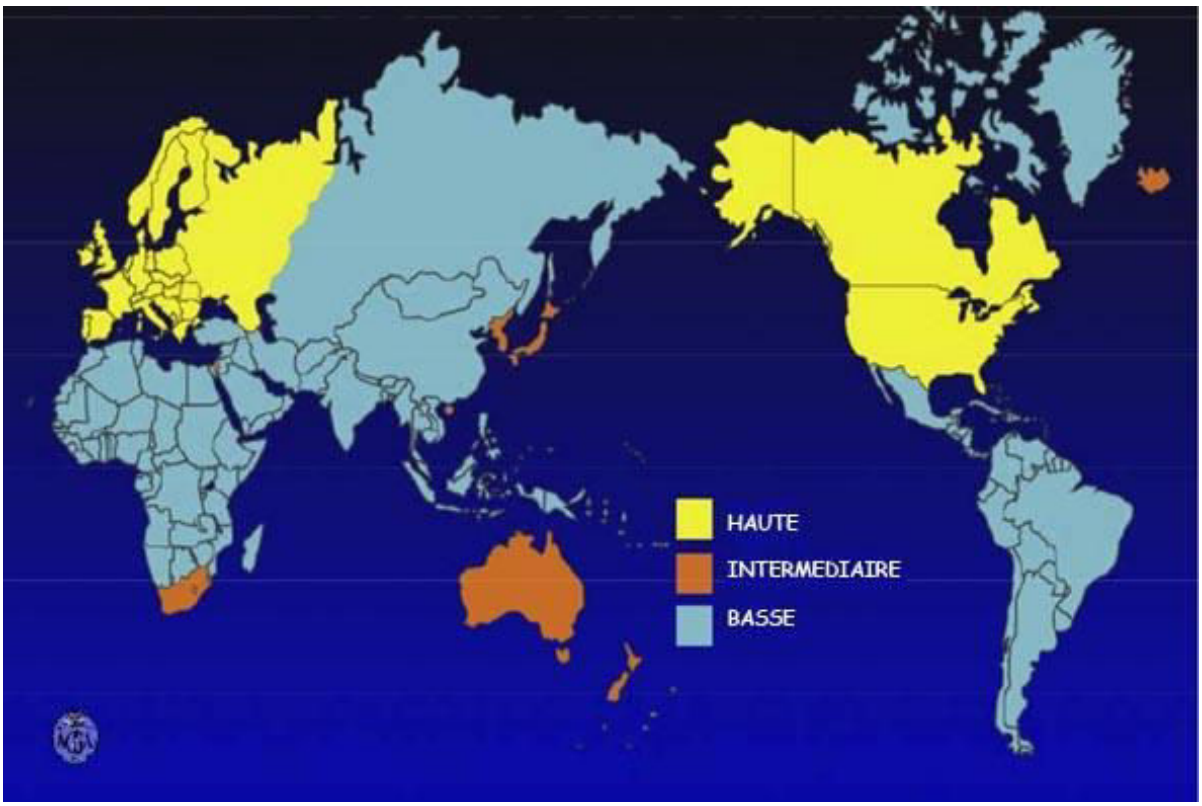


Figure 1 - Prévalence des MICI dans le monde (Source ONU)

Il existe un gradient Nord-Sud avec une incidence plus élevée dans le tiers Nord de la France (Figure 2). Dans le Nord-Ouest de la France, l'incidence de la maladie a augmenté de 30% entre 1987 à 2008, passant de 5,3 à 7,6 cas pour 100 000 habitants, avec un pic particulièrement marqué pour la tranche d'âge 10-19 ans (augmentation de 100%, passant de 6,5 à 12,9 pour 100 000 habitants) (21). L'augmentation de l'incidence de la MC est sans doute liée au mode de vie, mais aussi à des facteurs environnementaux émergents depuis une cinquantaine d'années. La prévalence de la MC montre une discrète prépondérance chez la femme avec un «sex ratio» homme/femme de 0,7 à 0,8 (8).

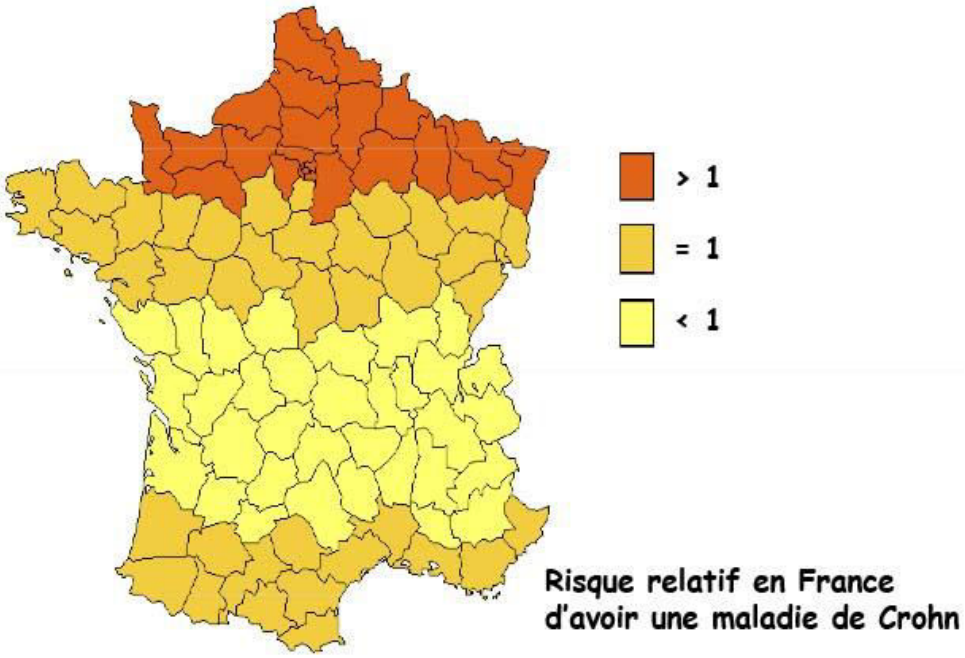


Figure 2 - Gradient nord/sud de la maladie de Crohn en France (Source EPIMAD)(21)

Les manifestations cliniques de la maladie de Crohn

Les symptômes sont principalement digestifs. Dans sa forme classique, le début de la MC est lent et insidieux associant des épisodes de diarrhée épisodique avec des douleurs abdominales pendant plusieurs mois voire années. Les signes cliniques varient selon la localisation des lésions.

La MC se manifeste également par des signes extra-digestifs dans 20 à 40% des cas. Il s'agit de manifestations articulaires (16 à 33% des cas), de signes cutanéo-muqueux (3 à 12 % des cas), des troubles hépatiques (stéatose, cholangite sclérosante primitive...).

Les complications de la maladie de Crohn (9)

Les complications intestinales

Le risque de survenue d'une complication augmente avec la durée d'évolution de la maladie. Dans une étude de population, Thia et al. décrit un taux de complications intestinales de 19% dans les 90 premiers jours après le diagnostic et de 50% après 20 ans d'évolution (Figure 3) (22).

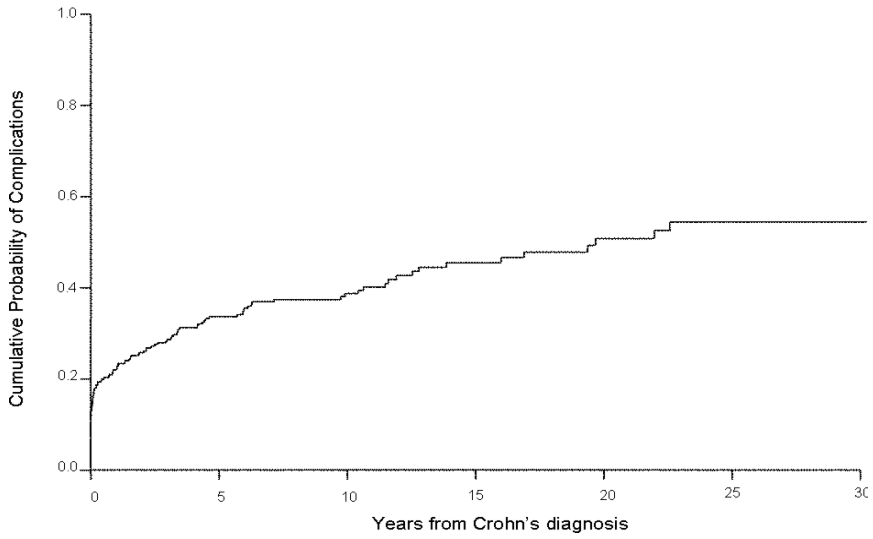


Figure 3 Probabilité cumulée de complications intestinales pénétrantes ou sténosantes à partir de la date du diagnostic (données issues de 306 patients du Comté de Olmsted diagnostiqués entre 1970 et 2004) (22).

Les sténoses intestinales sont fréquentes et peuvent être à l'origine d'une occlusion intestinale. Quand elles sont inflammatoires, elles peuvent s'améliorer sous traitement médical. Si la lésion est cicatricielle, symptomatique et courte, l'obstacle peut être traité par dilatation endoscopique. En cas de sténose longue ou entrainant une dilatation de l'intestin d'amont, le traitement est chirurgical (résection ou stricturoplasties).

Les fistules dans le cadre de la MC peuvent être entéro-entériques (Figure 4), entéro-coliques, entéro-vésicales, entéro-cutanées, entéro-vaginales et/ou ano-périnéales. Elles peuvent être traitées par traitement médical (antibiothérapie, anti-TNF alpha), mais lorsqu'elles sont très symptomatiques et altèrent la qualité de vie du patient, elles nécessitent une prise en charge chirurgicale.

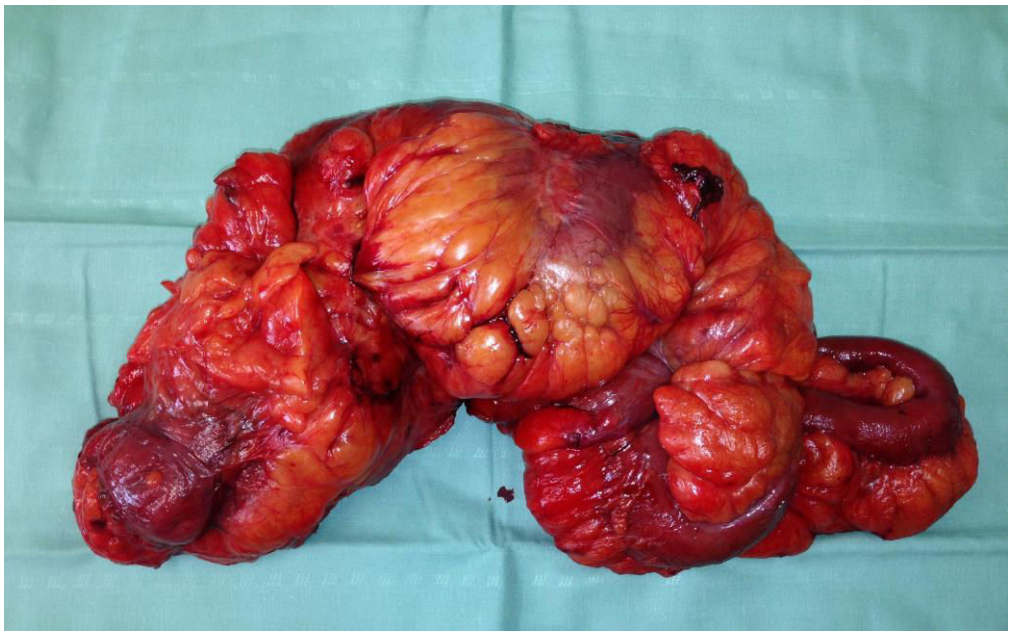


Figure 4 – Résection iléo-caecale pour bloc fistuleux iléo-iléal (Données personnelles)

Le risque de voir apparaître une fistule intestinale est plus élevé en cas d'atteinte iléale qu'en cas d'atteinte colique isolée, comme l'a décrit Thia et al (22). Schwartz et al., en 2002, a décrit dans une étude de cohorte avec un suivi de 23 ans l'apparition d'une fistule chez 35% des patients

(fistule entéro-entérale (24%), entéro-cutanée (6%), entéro-vésicale (3%)) (Figures 5 et 6). Dans près de 90% des cas, elles sont la complication d'une sténose (23). Dans les centres référents, le risque de fistule ano-périnéale est de 14 à 26% en fonction de la durée du suivi (23,24).

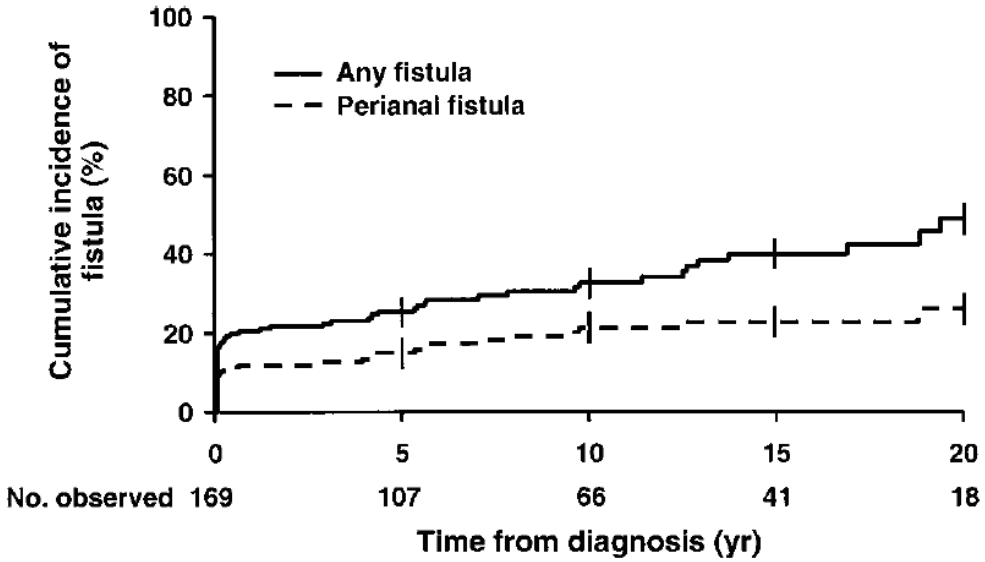


Figure 5 - Incidence cumulée des fistules intestinales et des fistules ano-périnéales dans une population de 176 patients suivis pendant 23 ans (23).

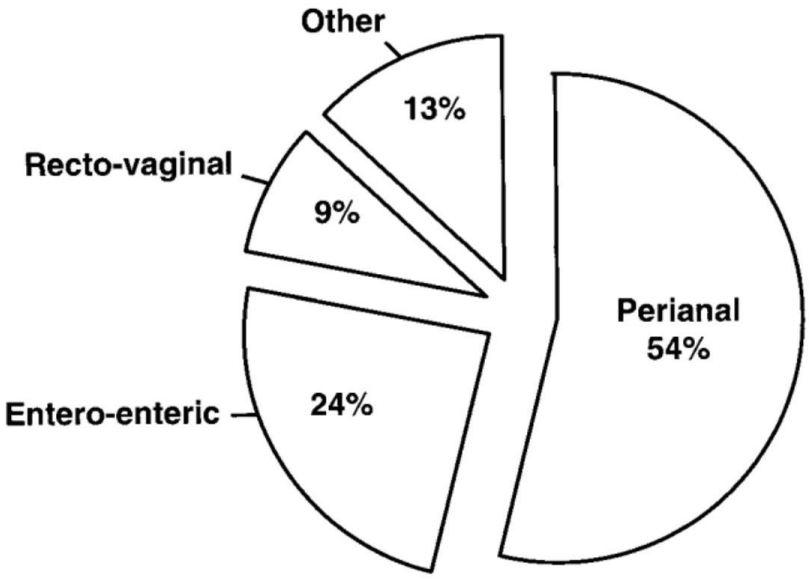


Figure 6 - Répartition de la fréquence des fistules selon leur type (ano-périnéale, entéro-entérique, recto-vaginale et autre) (23).

Les colites infectieuses sont également une complication fréquente de la MC avec, au premier rang, celles à Clostridium Difficile.

Le risque d'adénocarcinome de l'intestin grêle est considéré comme plus élevé chez les patients atteints de MC avec un risque relatif (RR) de 21,1-27,1 comparé à la population générale (25–27). Cependant, le risque réel reste faible, du fait de la rareté de ces cancers qui représentent moins de 5% des cancers digestifs. Chez un patient atteint d'une MC pancolique, le risque de cancer du côlon est le même que celui d'un patient avec une RCH et il augmente avec la durée de la maladie (25–27).

Les complications extra-intestinales

Elles peuvent être directement liées à la maladie : atteintes articulaires (spondylarthropathies, arthrites périphériques…), oculaires (épisclérite, iridocyclite, uvéite), cutanées (érythème noueux, Pyoderma gangrenosum …), aphtes, cholangite sclérosante primitive, lithiase biliaire, anémie.

Parmi les complications non directement liées à la maladie, on retrouve l'ostéoporose et les infections opportunistes qui sont dues aux traitements par corticothérapie prolongée.

Mortalité

La mortalité globale est plus élevée chez les patients atteints de MC que dans la population générale avec un Odds ratio (OR) entre 1,52 et 5. Même si une partie de cette surmortalité est due aux maladies associées à la consommation de tabac, 25 à 50% de la surmortalité est liée aux complications de la MC (dénutrition, complications post-opératoires, cancers digestifs) (28,29). Du fait des progrès dans la prise en charge des patients, cette mortalité a nettement diminué ces 30 dernières années (8). Ces données font cependant de la MC un problème de santé publique.

Physiopathologie de la maladie de Crohn

La MC peut atteindre tous les segments du tube digestif, de la bouche à l'anus, de façon chronique avec des phases d'activité alternant avec des phases de rémission. L'atteinte iléale est la plus fréquente puisqu'elle concerne 70% des patients.

La classification de Montréal distingue 3 phénotypes de la MC selon les caractéristiques initiales de la maladie: le phénotype inflammatoire, le phénotype sténosant et le phénotype perforant (Tableau 1) (30). Ces 3 phénotypes peuvent se compliquer au cours du temps sous forme de sténose ou de fistule.

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

Tableau 1 Classification de Montréal (30). (L4 peut être associé à L1, L2 ou L3, P peut être associée à B1, B2 et B3).

Même si la physiopathologie de la MC reste mal connue à l'heure actuelle, on connait son caractère multifactoriel (Figure 7). En effet, il est certain qu'elle dépend de nombreux facteurs intriqués tels qu'une prédisposition génétique, une perturbation de la flore intestinale et des facteurs immunitaires et environnementaux (31). L'hypothèse communément admise est une dérégulation de la réponse immunitaire muqueuse dirigée contre des éléments de la flore intestinale, survenant chez des patients génétiquement prédisposés, et présentant une dérégulation de la barrière intestinale.

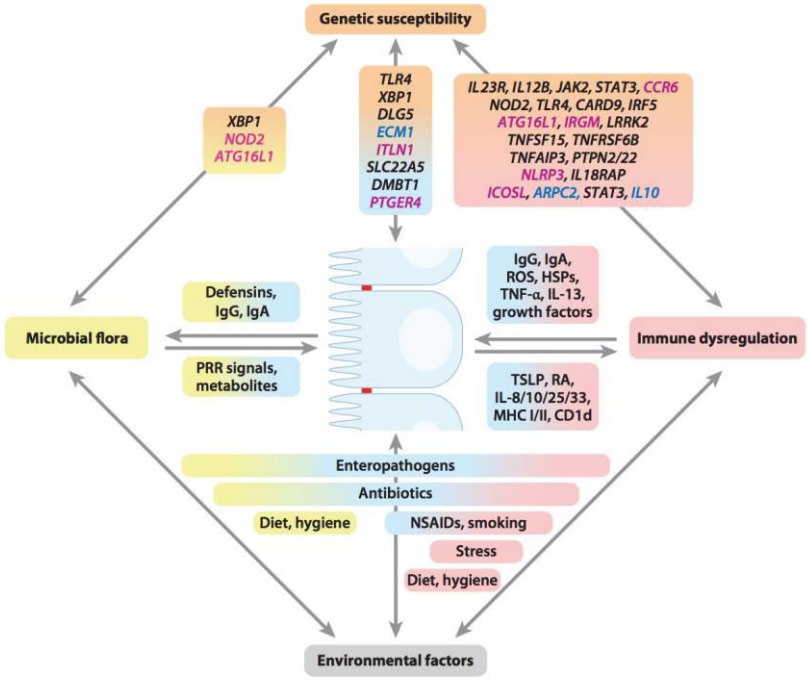


Figure 7 - La maladie de Crohn est une pathologie multifactorielle (31).

Les facteurs environnementaux

On ne connaît pas les facteurs de risque environnementaux ayant un rôle étiologique dans les MICI, on sait seulement que la MC est plus fréquente dans les pays développés et plus rare dans les pays en voie de développement. Les disparités d'incidence observées sont expliquées par l'adoption du mode de vie occidental moderne. De nombreux facteurs peuvent intervenir que ce soit le stress, l'alimentation, la pollution.

La consommation de tabac et l'appendicectomie sont les seuls facteurs environnementaux reconnus comme favorisant l'apparition de la MC. La consommation de tabac a un effet délétère bien établi sur l'évolution de la MC pré- et post-chirurgicale (32). Le tabagisme actif multiplie par 2 le risque de MC, et chez les patients atteints d'une MC, il est associé avec une augmentation de l'agressivité de la maladie, avec un recours à la chirurgie plus fréquent et plus précoce et un risque de récidive et de nécessité de nouvelle chirurgie plus important (33–36). Le mécanisme de l'effet du tabac, et en particulier son influence contraire sur la MC et la RCH reste mal compris mais est probablement dû en partie aux effets des composants de la fumée de cigarette sur la réponse au stress oxydatif (37). De plus, l'arrêt de la consommation de tabac est bénéfique pour les patients. On note également une augmentation du risque de développer la MC après appendicectomie. Ce risque est variable en fonction du sexe et de l'âge du patient au moment de l'appendicectomie ainsi que des complications liées à celle-ci (38,39).

Il a été suggéré qu'un niveau d'hygiène élevé dans l'enfance entraînait une réduction d'exposition aux micro-organismes intestinaux qui serait source d'une dérégulation du système immunitaire et favoriserait la survenue d'une MC et pourrait expliquer l'augmentation d'incidence depuis quelques décennies (40).

L'alimentation semble également jouer un rôle comme le suggère la localisation intestinale de la MC : un déséquilibre dans la consommation de légumes, fruits et acides gras a été évoqué comme

facteurs de risque d'apparition de la MC, cependant les études épidémiologiques des habitudes alimentaires sont très difficiles à mener et les résultats souvent contradictoires (41,42).

Les facteurs immunitaires

Le système immunitaire inné représente une défense non spécifique contre les pathogènes. L'implication de celui-ci au cours de la MC a été soulignée par l'identification de *NOD2* et Toll Like Receptor (*TLR*) comme des gènes de susceptibilité de la MC (43–45). Jusqu'à présent, plus de 11 *TLR*s, 23 *NOD*s, quelques ''C-type lectin-like molecules'' et ''beta-glucan receptors'' ont été identifiés. Il a été montré que *NOD2* régule l'expression de certains peptides antimicrobiens comme les défensines dont l'expression est diminuée au cours de la MC, ce qui contribuerait au défaut d'élimination des microbes (46).

Ces anomalies du système immunitaire inné sont associées à une rupture de tolérance et donc à une inflammation intestinale qui entraînera une activation excessive du système adaptatif qui va être responsable des lésions intestinales. Cette réponse immunitaire spécifique est médiée par différents types cellulaires résidant dans la paroi intestinale ou recrutés lors du développement d'une inflammation : les lymphocytes B muqueux produisant des immunoglobulines G et A, différentes sous-populations de lymphocytes T de phénotype Th1, Th2 ou Th17, et les lymphocytes T/B régulateurs (47). Classiquement, la MC est considérée comme étant de phénotype Th1, et la RCH comme étant de phénotype Th2. Récemment, des études suggèrent un chevauchement plus complexe et plus significatif entre RCH et MC. Une nouvelle lignée de lymphocytes T CD4 au phénotype Th17 a été mise en évidence et impliquée dans la pathogénie des MICI. Le développement du phénotype Th17 est favorisé par IL23 et est inhibé par des cytokines favorisant les phénotypes Th1 et Th2 (48). Enfin, d'autres types cellulaires que sont les lymphocytes T régulateurs produisant IL-10 et/ou le ''transforming growth factor-beta'' (TGF-beta) sont également nécessaires au maintien d'une homéostasie intestinale chez l'homme.

Dans une méta-analyse des GWAS sur des cohortes européennes et nord-américaines, il a été montré une association de plus de 30 régions génomiques avec la MC (49). Sur les trente régions,

quatre (IL23R, IL12B, STAT3 et JAK2) ont un rôle dans la signalisation IL-23R. L'IL23 régule l'expression de l'IL17. L'IL17 stimule la sécrétion de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires par des fibroblastes, les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules épithéliales et la production locale de IL17 va aboutir à l'activation des cellules inflammatoires. L'IL 23 peut contribuer à maintenir une inflammation chronique pathologique (50).

Les facteurs génétiques

Des études épidémiologiques, portant sur des jumeaux et sur l'observation de formes familiales de MC soulignent l'implication de facteurs génétiques dans la pathogénie de celle-ci (51–54). Les études d'association pangénomique (GWAS) ont permis d'identifier à ce jour plus de 160 gènes décrits comme étant impliqués dans la prédisposition génétique aux MICI, pour la plupart retrouvés à la fois dans la population atteinte d'une MC et dans celle atteinte d'une RCH (55,56). Cette liste n'est pas exhaustive et de nouveaux gènes de susceptibilité sont mis en évidence régulièrement (Tableau 2).

Chr	Position (hg19 (Mb))	SNP	Key Genes (+N additional in locus)
		Crohn's Disease	
1	78.62	rs17391694	(5)
1	114.3	**rs6679677**§	**PTPN22**//**,(8)**
1	120.45	rs3897478	ADAM30,(5)
1	172.85	**rs9286879**	**FASLG,TNFSF18,(0)**
2	27.63	**rs1728918**	UCN,(23)
2	62.55	rs10865331	(3)
2	231.09	**rs6716753**	SP140,(5)
2	234.15	**rs12994997**	**ATG16L1**//**, (8)**
4	48.36	rs6837335	(6)
4	102.86	rs13126505	(1)
5	55.43	rs10065637	**IL6ST,IL31RA,(1)**
5	72.54	rs7702331	(4)
5	173.34	rs17695092	CPEB4,(2)
6	21.42	rs12663356	(3)
6	31.27	**rs9264942**	(22)
6	127.45	rs9491697	(3)
6	128.24	**rs13204742**	(2)
6	159.49	**rs212388**	TAGAP,(5)
7	26.88ǂ	rs10486483	(2)
7	28.17	rs864745	CREB5,JAZF1,(1)
8	90.87	rs7015630	RIPK2,(4)
8	129.56	**rs6651252**	0
13	44.45	**rs3764147**	LACC1,(3)
15	38.89	rs16967103	**RASGRP1,SPRED1,(2)**
16	50.66**	**rs2066847**§	**NOD2**//**, (6)**
17	25.84	**rs2945412**	**LGALS9,NOS2,(3)**
19	1.12	**rs2024092**	GPX4,HMHA1,(20)
19	46.85ǂ	rs4802307	(9)
19	49.2	**rs516246**	FUT2, (25)
21	34.77	**rs2284553**	**IFNGR2,IFNAR1, (10)**

Tableau 2 Exemples de gènes de susceptibilité à la MC (55)

NOD2/CARD15 et la maladie de Crohn

En 2001, deux équipes ont découvert le premier gène de prédisposition à la MC, baptisé Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing 2 (*NOD2*) puis renommé Caspase activation recruitment domains 15 (*CARD15*) (17,18). *NOD2* code pour un récepteur de produits de dégradation ou de renouvellement de la paroi bactérienne. Un patient sur deux atteints de la MC présente au moins une mutation du gène *NOD2* en faisant un gène majeur de prédisposition de cette maladie.

Il existe 3 polymorphismes principaux de *NOD2* ayant été associés à la MC : Gly908Arg, Arg702Trp et mutation Leu1007fsinsC (17). Les mutations de *NOD2* sont bien identifiées et elles restent, à ce jour, les facteurs de risque génétiques les plus spécifiques de la MC, cependant elles ne suffisent pas pour induire la maladie.

La protéine *NOD2* est un récepteur intracellulaire pour un composé de la paroi bactérienne, le muramyl-dipeptide, et est exprimé par les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules de Paneth (43,44). *NOD2/CARD15* est impliqué dans l'identification d'un produit bactérien, le peptidoglycan- derived muramyl dipeptide (MDP). L'activation de *NOD2* par le MDP met en jeu les voies du facteur nucléaire-κB (NF-κB) et des mitogenactivated-proteins-kinases (MAPKs) (57).

Dans les cellules mononuclées humaines primaires, chacun des trois principaux variants de *NOD2* est associé à une diminution de l'activation de NF-κB en réponse à la stimulation MDP (58).

Les mécanismes qui sous-tendent la relation entre *NOD2* et la MC restent mal connus. Une diminution significative de l'expression des alpha-défensines a été observée chez les patients atteints de la MC qui sont porteurs d'un variant de *NOD2* (46,59). La diminution de la clairance microbienne des muqueuses résultant d'une diminution de l'expression des défensines pourrait

provoquer des changements dans la flore intraluminale et induire une vulnérabilité tout au long de la barrière épithéliale à l'infection par des agents pathogènes tels que E. coli adhérent-invasif et Mycobacterium paratuberculosis (60). Les mutations de *NOD2/CARD15* n'expliqueraient que 20% de la prédisposition génétique à la MC et d'autres gènes sont donc impliqués dans cette prédisposition.

Les autres gènes candidats associés au développement de la maladie de Crohn

Au fur et à mesure, les analyses de liaisons génétiques (sur des familles atteintes de MC) n'ont plus suffit pour identifier de gènes de prédisposition aux maladies complexes comme la MC. Contrairement aux études de liaison, les études d'association permettent de mettre en évidence des gènes de prédisposition à l'aide de cohortes de patients sans nécessité de paires de frères et sœurs atteints. Cela permet l'étude de cohortes de plusieurs milliers d'individus.

Ces dernières années, ces études d'association sur génome entier (GWAS) ont permis d'identifier d'autres gènes candidats au développement de la MC.

Dans le gène *ATG16L1*, un single nucleotide polymorphisms (SNP) (Ala281Thr) est très significativement associé à la MC (61). *ATG16L1* est membre d'une famille de gènes impliqués dans l'autophagie. Une mutation d'*ATG16L1* aurait pour conséquence la réduction de la clairance des agents pathogènes. Il a été rapporté que l'expression de *ATG16L1* par les cellules épithéliales intestinales est essentielle à l'efficacité de l'autophagie de S. typhimurium (62). Une observation intéressante a été celle de l'association de variants génétiques dans le gène *IRGM* avec la MC (63). Des expériences de knockdown de *IRGM* ont permis de montrer son rôle dans l'autophagie, et le contrôle de la charge en mycobactéries intracellulaires (64). Une étude récente a montré l'induction de l'autophagie par un mutant leucine-rich repeat kinase 2 (*LRRK2*), qui est fortement associé à la MC et aux gènes d'autophagie *ATG16L1* et *IRGM2-5* (65). Dans l'ensemble, les associations de SNPs dans *NOD2*, *ATG16L1*, *IRGM* et *LRRK2* avec la MC indiquent que les

modifications du devenir intracellulaire des bactéries constituent un élément central de la pathogenèse de la MC.

Plus récemment un nouveau gène *IL23R* associé aux MICI a été mis en évidence en analysant plus de 300 000 polymorphismes génétiques dans une population d'Amérique du Nord (66). Le gène codant pour IL23R, le récepteur de l'IL-23, a été identifié comme étant associé à un moindre risque de MC et de RCH. IL-23 est composé des sous-unités p19 (IL23A, chromosome 12q13) et p40 (IL12B, chromosome 5q33). Le blocage par des anticorps spécifiques de p40 inhibe les voies de signalisation liées à IL-23 et IL-12, alors que des anticorps spécifiques de p19 inhibent seulement les voies liées à l'IL-23. Suite à l'engagement de l'IL-23R par IL-23, Janus kinase 2 (*JAK2*) est activé, ce qui conduit à l'autophosphorylation de *JAK2* et la phosphorylation de l'*IL-23R*. Cela se traduit par l'homodimérisation et la translocation nucléaire de *STAT3*. *STAT3* joue un rôle central dans la différenciation des cellules Th17 (67).

A l'heure actuelle, la connaissance de ces variations génétiques ne permet pas d'élaborer des outils de dépistage des sujets à risque, et ne sont donc pas actuellement utilisées dans la prise en charge de la MC en pratique courante car elles ne sont que faiblement associées à des présentations cliniques spécifiques ou à la prédiction de réponses aux traitements.

Par contre, la connaissance de ces variations génétiques permet d'expliquer certains mécanismes physiopathologiques de l'histoire naturelle de la MC, ce qui pourrait permettre de personnaliser la prise en charge thérapeutique des patients. Par exemple, les mêmes variations du gène *NOD2* ont été retrouvées comme associées à la fois à la MC, à la surinfection du liquide d'ascite chez le cirrhotique et à la surmortalité liée au choc septique chez des patients hospitalisés en unité de soins intensifs (68,69). Le mécanisme commun à ces situations serait un excès de perméabilité intestinale en cas de déficit de *NOD2*.

Le traitement chirurgical de la maladie de Crohn

Malgré le développement et l'amélioration des stratégies de prise en charge médicale de la MC, la chirurgie reste souvent une étape essentielle dans le traitement de la MC. En effet, à l'heure actuelle, elle reste nécessaire chez environ 50% des patients après 10 ans d'évolution de la maladie (70). Une cohorte danoise a cependant montré un taux de résection intestinale dans l'année suivant le diagnostic de MC significativement inférieur par rapport aux cohortes plus anciennes, passant de 35 à 12 % ($p < 0,001$) (26). Cette évolution pouvant être probablement rapportée à l'utilisation des anti-TNF alpha.

La chirurgie dans la MC n'est pas un traitement curatif à l'heure actuelle. La RPO est souvent la règle, faisant modifier les pratiques chirurgicales ces dernières années. Une étude de cohorte de 1978 à 2003 a mis en évidence un taux d'environ 5 % de patients nécessitant une intervention chirurgicale par an, qui reste stable au cours de la période étudiée. L'objectif de la chirurgie est de traiter les lésions macroscopiques tout en réalisant une épargne digestive maximale puisque le risque de chirurgies itératives est important.

Les principes de la chirurgie dans la maladie de Crohn

Le traitement chirurgical doit être considéré comme un complément du traitement médical permettant d'obtenir une période sans symptômes et/ou de traiter les complications, et non de traiter la totalité des lésions microscopiques. L'objectif du traitement chirurgical doit être avant tout l'amélioration de la qualité de vie des patients en évitant au maximum les complications fonctionnelles (incontinence, fréquence des selles), les complications nutritionnelles (syndrome du grêle court) et les conséquences sur le schéma corporel (stomies définitives).

La chirurgie ne sera donc proposée qu'en cas d'échec d'un traitement médical optimisé ou en cas de complications (71). Cette décision doit être prise en réunion de concertation pluridisciplinaire MICI où sont réunis chirurgiens colorectaux, hépato-gastro-entérologues, radiologues et nutritionnistes. Cela expose cependant les patients qui seront finalement opérés à un risque plus élevé de complications post-opératoires puisqu'il s'agit de patients présentant une forme sévère et compliquée de la MC (71).

En cas de localisation sur l'intestin grêle

Le risque principal à long terme en cas de chirurgie itérative est le syndrome du grêle court. De ce fait, les résections doivent être le plus limité possible, limitées aux zones de lésions macroscopiques. Il a été démontré que l'atteinte microscopique de la marge de résection n'augmentait pas le risque de récidive anastomotique, ne faisant pas recommander les exérèses larges (72).

En cas de forme sténosante limitée sans signe d'activité inflammatoire mais symptomatique, la chirurgie est le traitement recommandé (73). Dans ce cas, l'intervention la plus souvent réalisée est la résection iléo-caecale par voie laparoscopique.

En cas d'atteintes étagées et/ou diffuses, il se discute soit la réalisation de résections multiples, soit la réalisation de stricturoplasties. Les résections étendues emportant touts les sténoses ne sont pas recommandées car elles exposent au risque de syndrome du grêle court. En 2007, Yamamoto et al. a réalisé une méta-analyse qui confirme la faisabilité et l'efficacité des stricturoplasties dans la prise en charge des sténoses étagées ou longues (74).

Les formes pénétrantes avec fistule entéro-cutanée peuvent être traitées soit de façon médicale (traitement par anti-TNF alpha), soit de façon chirurgicale (75).
En cas de forme pénétrante compliquée d'un abcès, il est recommandé de réaliser dans un premier temps un drainage radiologique ou chirurgical associée à une antibiothérapie adaptée. Une chirurgie d'exérèse est à réaliser « à froid » environ 6 semaines plus tard. Cela permet d'augmenter les possibilités de rétablissement immédiat de la continuité digestive (71).

En cas de fistule iléo-sigmoïdienne où le bilan d'évaluation (coloscopie totale) a montré une atteinte exclusive de l'iléon terminal, une suture simple et un drainage au contact suffisent souvent. Il est rare qu'une colectomie segmentaire associée soit nécessaire sauf en cas d'atteinte du sigmoïde par la MC (76). En cas de fistule iléo-vésicale, une suture simple associée à un drainage vésical trans-urétral permet dans la plupart des cas un traitement efficace (77).

En cas de localisation colique et/ou rectale

En cas de localisation colorectale de la MC, le risque à long terme est la réalisation d'une coloproctectomie totale avec iléostomie définitive (Figure 8).

Figure 8 Coloproctectomie totale avec iléostomie terminale définitive par voie laparoscopique (Données personnelles)

En cas d'atteinte colique isolée sur segment, la réalisation d'une colectomie segmentaire plutôt qu'une colectomie totale avec anastomose iléo-rectale peut être discutée. Kiran et al a montré dans une étude prospective de 108 patients un avantage à la réalisation de colectomies segmentaires chez les patients ne présentant pas de comorbidités (78). La méta-analyse de Tekkis, comparant les patients ayant eu une colectomie totale avec anastomose iléo-rectale et les patients ayant eu une colectomie segmentaire, conclut qu'il n'existe pas de différence concernant le taux de récidive mais que cette récidive survenait plus tardivement en cas d'anastomose iléo-rectale (79). Actuellement le consensus européen recommande la réalisation d'une colectomie segmentaire en

cas d'atteinte touchant moins d'un tiers du cadre colique (71).

En cas d'atteinte du colon et du rectum, et en l'absence de lésions iléales et ano-périnéales, il peut être discutée au cas par cas la réalisation d'une coloproctectomie totale avec anastomose iléo-anale. Panis et al. a publié en 1996 des résultats satisfaisants chez des patients sélectionnés et informés des résultats fonctionnels (80). Depuis, d'autres études ont analysé les résultats fonctionnels des anastomoses iléo-anales à long terme. Des disparités en terme de résultats sont observés puisque selon les séries, 25 à 50% des patients conservent un réservoir à 10 ans avec une qualité de vie comparable aux patients opérés pour une RCH ou une polypose adénomateuse familiale (81–84). Ces différences peuvent être expliqués par des critères de sélection des patients plus ou moins stricts. Cette intervention ne doit être envisagée qu'en cas d'impossibilité de conservation du rectum, le cas échéant, l'anastomose iléo-rectale reste l'intervention de choix.

La prise en charge chirurgicale des atteintes colorectales dans la maladie est impérativement une prise en charge personnalisée pour chaque patient. Les modalités de cette prise en charge ont été résumées par Champault et al. dans un algorithme (Figure 9) (85).

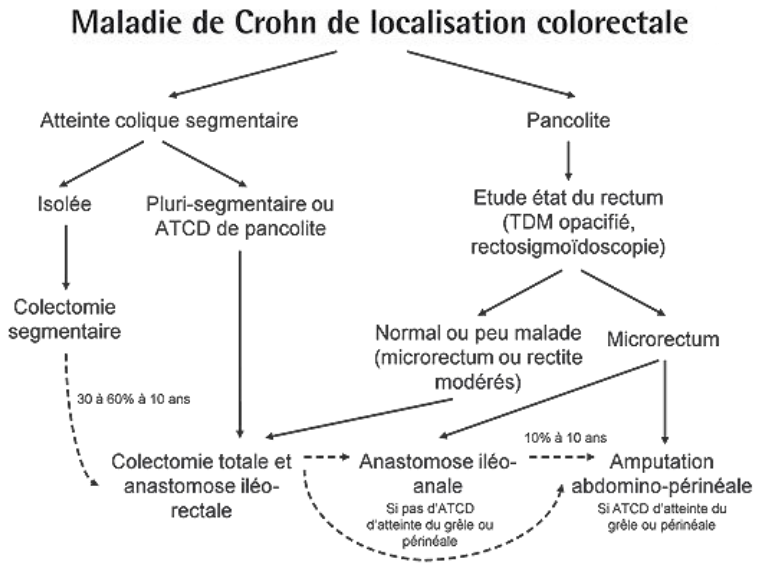


Figure 9 – Algorithme du traitement chirurgical de la maladie de Crohn de localisation colorectale (85)

Les complications infectieuses intra-abdominales post-opératoires

Les CIIP correspondent aux fistules anastomotiques et aux abcès intra-abdominaux survenant dans les 90 jours après une chirurgie colorectale.

Des facteurs de risque cliniques de CIIP ont été mis en évidence et sont actuellement pris en compte pour réaliser un rétablissement de la continuité digestive immédiat ou non. Yamamoto et al. a décrit qu'un taux d'albumine plasmatique inférieur à 30 g/l, de la prise de corticoïdes en pré-opératoire, la découverte d'une fistule ou d'un abcès en per-opératoire augmentaient le risque de CIIP, faisant passer ce risque de 5% si aucun facteur n'était présent à 50% si les 4 facteurs étaient présents (10). Alves et al. a retrouvé une association entre le risque de CIIP et une perte de poids supérieure à 10%, une corticothérapie supérieure à 3 mois, la présence d'abcès découvert en per-opératoire et le nombre de poussées de MC. Les patients à très haut risque, c'est-à-dire présentant au moins 3 de ces facteurs, ne semblent pas devoir bénéficier d'un rétablissement immédiat de la continuité digestive (86).

En ce qui concerne l'influence du traitement pré-opératoire il a été décrit dans une méta-analyse que la prise d'anti-TNF alpha augmentait significativement le risque global de complications post-opératoires (11). En raison des limites propres à ce type d'étude, il était nécessaire de confirmer ces résultats dans une étude en population de plus grande ampleur, raison pour laquelle nous avons réalisé une étude sur l'influence de la prise d'un traitement immunosuppresseur sur la survenue d'infections du site opératoire sur une population interrégionale de patients atteints d'une MC et ayant bénéficié d'une résection iléo-colique.

Cette étude constitue la première étape de notre travail de thèse.

Etude N°1 : L'effet du traitement immunosuppresseur sur l'infection de site opératoire après une résection pour maladie de Crohn

The effect of immune therapy on surgical site infection following Crohn's Disease resection.

Thomas Serradori, **Adeline Germain**, ML Scherrer, C Ayav, M Perez, B Romain, JP Palot, S Rohr, L Peyrin-Biroulet, L Bresler. Br J Surg. 2013 Jul;100(8):1089–93.

Résumé

Le développement des traitements par anti-TNF alpha au début des années 90 a modifié considérablement le traitement de la MC ayant résisté au traitement médical standard (corticoïdes, immunosuppresseurs). Actuellement, deux médicaments ont des indications validées au cours des MICI : l'infliximab et l'adalimumab. Ces médicaments sont des anticorps monoclonaux capables de reconnaître spécifiquement les formes solubles et transmembranaires du TNF alpha, de s'y lier en formant des complexes stables, et ainsi d'inhiber son action. Même s'il a été démontré que l'utilisation des anti-TNF alpha a diminué le recours à la chirurgie, celui-ci reste fréquent (10,86). Nous avons décrit précédemment dans notre cohorte appelée la « Nancy IBD cohort », un risque cumulé de résection chirurgicale chez les patients atteints d'une MC de 26% après 5 ans d'évolution de la maladie (87). L'histoire naturelle post-opératoire de MC est marquée par un taux de morbidité élevé, Il a été clairement établi que des facteurs cliniques pré-opératoires tels que le tabagisme actif, la dénutrition, la prise de corticoïdes, la présence d'un abcès augmentaient le risque de CIIP (10,86). A l'heure actuelle, la quasi-totalité des patients nécessitant une resection intestinale pour MC bénéficie d'un traitement par anti-TNF alpha au moment de la chirurgie. En ce qui concerne l'influence de la prise d'anti-TNF alpha, il existe des données contradictoires dans la littérature. Malgré cela, une méta-analyse a montré que la prise d'anti-TNF alpha était associée à un risque global augmenté de complications post-opératoires (11). En raison des limites propres à ce type d'étude, il semblait nécessaire de confirmer ces résultats sur une étude en population de grande envergure, raison pour laquelle nous avons mené un premier travail sur une population de patients atteints d'une MC et issus de 3 centres référents de l'interrégion Est.

Objectif

L'objectif de ce travail était d'évaluer, sur une population interrégionale, l'impact des traitements par anti-TNF alpha sur la survenue de CIIP dans le but d'adapter les modalités de la prise en charge chirurgicale à chaque patient en fonction de son traitement pré-opératoire.

Population et méthodes

Au cours de ce travail de thèse, nous avons travaillé sur une population de patients atteints d'une MC qui ont bénéficié d'une résection iléo-caecale ou iléo-colique pour localisation de la MC dans 3 centres référents de l'interrégion Est (CHU de Nancy, CHU de Reims, CHU de Strasbourg) entre Janvier 2000 et Décembre 2010. Il s'agit d'une étude rétrospective, multicentrique, portant sur les données issues des dossiers médicaux de chaque patient inclus. Les données étudiées ont également été extraites de tous les compte-rendus opératoires, compte-rendus de scanner et dossiers paramédicaux.

Résultats

Au total, 217 patients ont été inclus sur une période de 10 ans, dont 126 femmes (58,1%). L'âge médian au moment de la chirurgie était de 36,8 ans (15-78 ans), et la durée moyenne de la maladie avant la chirurgie était de 8,6 (0-36 ans). Une CIIP est survenue chez 24 patients (11,1%). En analyse univariée, un âge inférieur à 25 ans (p=0,023), la prise de corticoïdes (p=0,004), la prise d'anti-TNF alpha (p=0,043) et l'association corticoïdes et anti-TNF alpha (p=0,004) étaient associés à un risque augmenté de CIIP. En analyse multivariée, seule l'association corticoïdes et anti-TNF alpha augmentait significativement le risque de CIIP (odds ratio 8,03, intervalle de confiance à 95% 1,93-33,43; p=0,035). Ces résultats étaient en accord avec les données publiées antérieurement.

Conclusion

Notre série a permis d'établir que l'utilisation combinée de corticoïdes et d'anti-TNF alpha avant une chirurgie pour MC augmentait de manière indépendante le risque de CIIP et permet ainsi de tenir compte de ce facteur dans la décision chirurgicale.

Résultats scientifiques

Abstract

Background: Patients with Crohn's disease are increasingly receiving antitumour necrosis factor α (anti-TNF-α) therapy. Whether anti-TNF-α therapy increases the risk of postoperative infectious complications in Crohn's disease is a matter of debate.

Methods: This was a retrospective study of three referral centres. The charts of patients who underwent ileocaecal or ileocolonic resection for Crohn's disease between 2000 and 2011 were reviewed. The impact of baseline characteristics and Crohn's disease-related medications on the risk of post-operative intra-abdominal infectious complications was investigated by univariable and multivariable analysis.

Results: A total of 217 patients were included in the study. Median age at the time of surgery was 36.8 (range 15–78) years. A postoperative intra-abdominal infection occurred in 24 (11.1 per cent) of 217 patients. No deaths were reported. On univariable analysis, age less than 25 years (p=0.023), steroid use (p=0.017), anti-TNF-α therapy (p=0.043) and anti-TNF-α treatment in combination with steroids (p=0.004) were associated with an increased risk of postoperative intra-abdominal infectious complications. On multivariable analysis, only anti-TNF-α therapy in combination with steroids significantly increased this risk (odds ratio 8.03, 95 per cent confidence interval 1.93 to 33.43; p=0.035).

Conclusion: Combined use of steroids and anti-TNF-α therapy was associated with an increased risk of postoperative intra-abdominal infectious complications.

Introduction

The advent of antitumour necrosis factor α (anti-TNF-α) agents changed the treatment for Crohn's disease, but surgery is still often required (89). In a French referral centre cohort, the cumulative risk of major abdominal surgery in patients with Crohn's disease was 26 per cent after 5 years (87). Although the risk of postoperative complications associated with corticosteroids is well established (86,88), it remains uncertain whether anti-TNF-α therapy increases this risk. In ulcerative colitis, a recent meta-analysis demonstrated that preoperative anti-TNF-α use increased the risk of short-term postoperative complications (90). Although data for patients with Crohn's disease have been conflicting, a meta-analysis found that preoperative anti-TNF-α treatment was associated with more postoperative infectious complications (91). The aim of this study was to evaluate the impact of Crohn's disease-related medications on the risk of specific postoperative morbidity.

Methods

All adult patients (aged more than 16 years) who underwent ileocaecal or ileocolonic resection for Crohn's disease in three French referral centres (Visceral Surgery Department and Emergency Surgery Department of University Hospital of Nancy (centre 1), Visceral Surgery Department of University Hospital of Strasbourg (centre 2) and Visceral Surgery Department of University of Reims (centre 3) between January 2000 and December 2010 were included in this retrospective study. The terms 'Crohn disease', 'ileocaecal resection', 'ileo-colonic resection' and 'right colectomy' were used to identify eligible patients using the database of the Department of Medical Information. Retrospective studies do not require any ethical approval in France. The charts of all included patients with an established diagnosis of Crohn's disease, according to Lennard-Jones Criteria (92), were reviewed. Patients with a temporary stoma were excluded from the analysis as the aim of the study was to evaluate the risk of postoperative intra-abdominal infectious

complications (PIICs; abscess, anastomotic leakage and enterocutaneous fistula). The following data were retrieved for each patient included in the analysis: demographic data, Montreal classification (30), weight loss, smoking status, nutritional support, history of Crohn's disease-related surgery, urgency of surgery (emergency or elective), indication for surgery (ileal stenosis, abscess and/or fistula) and American Society of Anesthesiologists (ASA) fitness grade. Information regarding Crohn's disease-related médications was collecting, including: use of budesonideand systemic (oral and intravenous) steroids, dose of systemic steroids, use of anti-TNF-α therapy (infliximab, adalimumab), use of immunomodulators (thiopurine, methotrexate). Only steroid or immunomodulator use at the time of surgery was included in the analysis. For infliximab and adalimumab, the last infusion had to be administered within 12 weeks before surgery to be included in the analysis, based on the pharmacokinetics infliximab (93). Information on bowel preparation with électrolyte solution before surgery, surgical antibiotic prophylaxis, and the type of surgical approach (laparotomy and/or laparoscopic procedure) was analysed. Mean operating time was calculated. The type of anastomosis (handsewn, stapled, end-to-end, end-to-side or side-to-side) was noted. The duration of intra-abdominal drainage, if needed, was recorded.

Statistical analysis

Patients were divided into two groups according to the occurrence of PIICs. These groups were first compared by univariable analysis using the $\chi 2$ test for qualitative variables and Wilcoxon test for continuous data. Variables with $p < 0.200$ between the two groups were then included in a multivariable logistic regression model to identify independent predictors of PIIC using a forward variable selection method. Statistical significance was set at $p \leq 0.050$. Statistical analysis was carried out using SAS® software version 9.2 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA).

Results

A total of 217 patients were included over a 10-year period, including 126 women (58.1 per cent). Some 42 patients with Crohn's disease were excluded (Strasbourg 15, Nancy 7, Reims 20) because the chart review indicated that the type of surgery had been misclassified. A further 41 patients with Crohn's disease (Strasbourg 4, Nancy 21, Reims 16) had a temporary stoma and were also excluded. The median age of included patients at the time of surgery was 36.8 (range 15–78) years and the mean(s.d.) duration of disease was 8.6(8.1) (range 0–36) years. PIICs were recorded in 24 patients (11.1 per cent). Twelve patients had an intra-abdominal abscess, of whom ten had radiological drainage and reoperation. Ten patients had an anastomotic leak with peritonitis requiring reoperation and stoma. Two patients developed enterocutaneous fistula and both required surgery. The median time to onset of first PIIC was 10 (range 2–30) days. There were no deaths. A comparison of the baseline characteristics of patients with PIICs and those without is presented in Table 3.

	No PIIC ($n=193$)	PIIC ($n=24$)	P‡
Age (years)			0·023
< 25	29 (15·0)	9 (38)	
25–45	104 (53·9)	10 (42)	
> 45	60 (31·1)	5 (21)	
Mean(s.d.)	39·2(13·9)	32·2(11·6)	0·022§
Sex ratio (M : F)	84 : 109	7 : 17	0·178
Active smoker	90 (47·6) ($n=189$)	12 (50)	0·825
ASA grade			0·954
I	70 (37·8)	9 (41)	
II	105 (56·8)	12 (55)	
III	10 (5·4)	1 (5)	
Montreal classification A			0·135
A1	14 (7·3)	2 (8)	
A2	138 (71·5)	21 (88)	
A3	41 (21·2)	1 (4)	
Montreal classification B			0·540
B2	133 (68·9)	18 (75)	
B3	60 (31·1)	6 (25)	
Montreal classification L			0·939
L1	168 (87·0)	21 (88)	
L2	1 (0·5)	0 (0)	
L3	24 (12·4)	3 (13)	
Perianal disease	18 (9·3)	4 (17)	0·261
Duration of disease (years)*	8·6(8·1) ($n=192$)	8·3(8·0)	0·310§
5-Aminosalicylic acid	17 (8·8)	2 (8)	0·938
Weight loss (kg)*†	5·2(6·1) ($n=166$)	4·8(3·7) ($n=19$)	0·930§
Body mass index (kg/m^2)*	22·1(3·8) ($n=183$)	20·7(2·7)	0·656§
Preop. nutritional support	21 (10·9)	0 (0)	0·088

Values in parentheses are percentages unless indicated otherwise; *values are mean(s.d.). †In relation to healthy weight. PIIC, postoperative intra-abdominal infectious complication; ASA, American Society of Anesthesiologists. ‡χ^2 test, except §Wilcoxon test.

Table 3 - Comparison of baseline data between groups with and without infection.

Patients who developed PIICs were younger, but there were no differences between the two groups regarding sex ratio, ASA grade or Montreal classification. Nor were there any differences in indication for surgery, bowel preparation, histological findings and type of anastomosis (Table 4).

	No PIIC ($n = 193$)	PIIC ($n = 24$)	P†
Abscess at time of surgery	28 (14·5)	2 (8)	0·409
Occlusion at time of surgery	17 (8·8)	3 (13)	0·556
Fistula at time of surgery	4 (2·1)	1 (4)	0·520
Peritonitis at time of surgery	1 (0·5)	1 (4)	0·078
Stenosis at time of surgery	166 (86·0)	19 (79)	0·373
Surgery in an emergency setting	21 (10·9)	2 (8)	0·702
First ileocaecal resection	135 (69·9)	16 (67)	0·741
Laparoscopic approach	89 (46·1)	11 (46)	0·979
Epidural analgesia	4 (2·2) ($n = 186$)	0 (0)	0·487
Bowel preparation	100 (51·8)	11 (46)	0·580
Peroperative antibiotics	174 (92·6) ($n = 188$)	20 (91) ($n = 22$)	0·783
Duration of operation (min)*	133·2(57·3) ($n = 191$)	128·3(47·7) ($n = 23$)	0·469‡
Histological analysis			
No inflammatory lesions	70 (38·0)	8 (35)	
Inflammatory lesions	114 (62·0)	15 (65)	
Type of anastomosis			
End-to-end	20 (10·4)	0 (0)	0·097
End-to-side	86 (44·6)	9 (38)	0·510
Side-to-side	87 (45·1)	15 (63)	0·107
Handsewn	115 (59·6)	12 (50)	0·368
Stapled	78 (40·4)	12 (50)	0·368
Peroperative abdominal drainage	112 (58·0)	16 (67)	
Duration of hospital stay (days)*	9·3(5·4)	24·0(12·7)	< 0·001‡

Values in parentheses are percentages unless indicated otherwise; *values are mean(s.d.). PIIC, postoperative intra-abdominal infectious complication; †χ^2 test, except ‡Wilcoxon test.

Table 4 - Comparison of perioperative data between groups with and without infection.

Preoperative specific treatments are summarized in Table 5.

	No PIIC ($n=193$)	PIIC ($n=24$)	P†
Steroids	72 (37·3)	15 (63)	0·017
Steroid dose (mg)*	23·4(16·1) ($n=70$)	29·0(13·1) ($n=15$)	0·293‡
Anti-TNF-α (8-week washout period)	26 (13·5)	7 (29)	0·043
Anti-TNF-α (12-week washout period)	33 (17·1)	9 (38)	0·026
Steroids and/or anti-TNF-α (8-week washout for biologicals)			0·004
None	103 (53·4)	7 (29)	
Steroids only	64 (33·2)	10 (42)	
Anti-TNF-α only	18(9·3)	2 (8)	
Steroids + anti-TNF-α	8 (4·1)	5 (21)	
Steroids and/or anti-TNF-α (12-week washout period for biologicals)			0·005
None	98 (50·8)	6 (25)	
Steroids only	62 (32·1)	9 (38)	
Anti-TNF-α only	23 (11·9)	3 (13)	
Steroids + anti-TNF-α	10 (5·2)	6 (25)	
Budesonide	22 (11·4)	3 (13)	0·873
Azathioprine	48 (24·9)	5 (21)	0·664
5-Aminosalicylic acid	17 (8·8)	2 (8)	0·938
Centre			0·453
1	120 (62·2)	18 (75)	
2	9 (4·7)	1 (4)	
3	64 (33·2)	5 (21)	

Values in parentheses are percentages unless indicated otherwise; *values are mean(s.d.). PIIC, postoperative intra-abdominal infectious complication; TNF, tumour necrosis factor. †χ^2 test, except ‡Wilcoxon test.

Table 5 - Comparison of specific treatments and centres between groups with and without infection.

In univariable analysis, age less than 25 years, steroid use, exposure to anti-TNF-α therapy, and the use of biologicals in combination with steroids were associated with an increased risk of developing a PIIC (Tables 3 and 5). In multivariable logistic regression, only anti-TNF-α therapy in combination with steroids was independently associated with the risk of developing a PIIC; this combined treatment, with an 8-week washout period for biologicals, was associated with an eightfold increase in the risk of PIICs (Table 6).

	Washout period for biologicals			
	8 weeks		12 weeks	
	Odds ratio	*P*	Odds ratio	*P*
Age (years)		0·052		0·046
< 25	1·00		1·00	
25–45	0·26 (0·09, 0·77)		0·25 (0·09, 0·75)	
> 45	0·46 (0·11, 1·87)		0·46 (0·12, 1·87)	
Montreal classification A		0·227		0·215
A1	1·00		1·00	
A2	2·15 (0·41, 11·19)		2·06 (0·39, 10·75)	
A3	0·40 (0·02, 6·58)		0·36 (0·02, 5·83)	
Steroids and/or anti-TNF-α		0·035		0·013
None	1·00		1·00	
Steroids only	2·25 (0·79, 6·37)		2·29 (0·76, 6·94)	
Anti-TNF-α only	1·29 (0·23, 7·15)		1·88 (0·42, 8·45)	
Steroids + anti-TNF-α	8·03 (1·93, 33·43)		9·76 (2·47, 38·55)	

Values in parentheses are 95 per cent confidence intervals. The analysis was based on 217 patients. Only factors with $P < 0·200$ in the univariable model were included in the multivariable model and forward selection of variables was used. TNF, tumour necrosis factor.

Table 6 - Multivariable logistic regression analysis of risk of postoperative intra-abdominal infections in patients with Crohn's disease.

Of note, increasing the washout period for biologicals to 12 weeks did not modify the results.

Discussion

The PIIC rate in the present study is similar to that reported by others (91). The risk of postoperative complications remains high in patients who have received a biological therapy despite improvements such as preoperative nutritional therapy (94). The types of PIIC included anastomotic leak, intra-abdominal abscess and fistula, as described in most published studies (95–97).

In agreement with previous studies (98–100), the use of immunomodulators, mainly azathioprine, was not a risk factor for PIIC in the present analysis. Steroids still represent the first-line treatment during outbreaks of the disease or the inaugural phase (101). Furthermore, some patients become corticodependent and require continuation of steroid therapy, despite the introduction of other therapies including biologicals. Several studies have demonstrated that steroid use is associated with an increased risk of postoperative complications (10,86,88,95–98,100). Univariable analysis here confirmed that steroid use is associated with an increased risk of PIIC, although a dose-dependent effect could not be demonstrated.

A large retrospective study concluded that the use of anti-TNF-α therapy was not associated with an increase in overall or infectious complications in patients undergoing surgery for Crohn's disease (102). In a recent meta-analysis including eight studies and 1641 patients, preoperative infliximab treatment was associated with an increased risk of postoperative infectious complications (odds ratio 1.50, 95 per cent confidence interval 1.08 to 2.08) (91). Interestingly, the largest study, which included a total of 389 patients who underwent ileocolonic resection, found that infliximab increased postoperative sepsis, abscess and readmissions in patients with Crohn's disease (96). The underlying mechanisms remain poorly understood, although delayed wound healing, possibly promoting the occurrence of PIIC, has been demonstrated in a mouse model (103). An increasing number of patients are coming to surgery receiving both steroids and

anti-TNF-α therapy, with the proportion ranging from 7 to 31 per cent (96,97,104). This combination represents a particularly high risk for perioperative complications.

The present analysis has limitations. Because the study was retrospective, some data, such as disease activity and severity, could not be collected, and there was no standardized postoperative follow-up. In addition, the number of patients receiving both steroids and biological agents was relatively small.

Histoire naturelle de la récidive post-opératoire

La récidive se définit par la réapparition de lésions, souvent anastomotiques, chez un patient qui avait été « blanchi » par exérèse chirurgicale de l'ensemble des lésions macroscopiques.

Aucune thérapeutique qu'elle soit médicale ou chirurgicale n'est actuellement curative, la récidive restant la règle. Le taux de récidive chirurgicale est de l'ordre de 25 à 30% à 10 ans (15,16). Ce taux reste très variable selon les études car la plupart des auteurs ne distinguent pas la récidive clinique de la récidive chirurgicale, endoscopique ou radiologique (105).

La prise en charge chirurgicale itérative a pour principal risque à terme d'aboutir à un syndrome du grêle court et à la réalisation de stomies définitives.

Les manifestations cliniques des RPO sont très variables. On différencie 3 types de récidives (12,13):

- les récidives cliniques avec réapparition de symptômes liés à l'activité de la maladie mise en évidence par des examens complémentaires (biologiques, endoscopiques ou radiologiques). Leur taux est de 18 à 30% après 1 an et de 50 à 60% après 5 ans (13).
- les récidives endoscopiques, définies par la découverte de lésions endoscopiques asymptomatiques. On estime ainsi qu'en l'absence de traitement préventif post-opératoire, le taux de récidive endoscopique est d'environ 45% à 80% à 12 mois et de 80% à 100% à 3 ans de la chirurgie (13).
- les récidives chirurgicales, qui nécessitent un nouveau geste d'exérèse.

Facteurs cliniques prédictifs de la récidive post-opératoire

Leur identification est d'un intérêt majeur puisqu'elle permet l'utilisation d'outils simples en pratique courante pour identifier les patients à haut risque de récidive et introduire chez eux un traitement prophylactique en post-opératoire immédiat.

Au cours de ces 20 dernières années, de nombreux facteurs ont été étudiés. Le tabagisme est le seul facteur prédictif de récidive chirurgicale démontré clairement à ce jour. Ainsi le taux de récidive chirurgicale à 10 ans est estimé à 70% chez les fumeurs contre 41% chez les non fumeurs, cette différence étant plus marquée chez les femmes (106,107). Le sevrage du tabac doit être proposé systématiquement puisque le taux de récidive revient à celui des non fumeurs après arrêt du tabac. Le phénotype pénétrant, « B3 » de la classification de Montréal, a été montré comme facteur prédictif de récidive (30). Sachar et al. a montré qu'au-delà de 3 ans, 100% des patients B3 présentaient une récidive clinique (108). La localisation périnéale, « p » de la classification de Montréal, est également considérée comme facteur prédictif de RPO avec un risque relatif estimé entre 1,6 et 16 (109,110). Un antécédent de résection chirurgicale et une résection étendue de l'intestin grêle sont également décrits comme facteurs de risque de récidive (14,73).

Ces facteurs cliniques (tabac, phénotype pénétrant, atteinte périnéale, résection antérieure et résection étendue) sont actuellement pris en compte pour déterminer les patients à haut risque de RPO qui doivent donc bénéficier d'un traitement préventif immédiat.

Plusieurs études ont suggéré le rôle de la plexite sous-muqueuse dans la prédiction de la RPO, rendant ainsi l'analyse de la pièce opératoire essentielle dans la prise en charge post-opératoire, ce qui n'est pas le cas à l'heure actuelle (111).

Principes des études génétiques

Les polymorphismes

Un polymorphisme est une variation de la séquence nucléotidique d'un gène donné dans une population. Un gène est considéré comme polymorphe s'il existe au moins deux versions différentes, appelées allèles, avec une fréquence ≥ 1%. Les polymorphismes génétiques peuvent être des mutations ponctuelles ne touchant qu'un seul nucléotide (appelé SNP), des délétions ou des insertions de plusieurs nucléotides ou des variations alléliques du nombre de copie d'un motif unique (appelé CNV (Copy Number Variation)).

Les SNPs sont les variants génétiques le plus fréquemment rencontrés dans le génome humain (112). Ces polymorphismes sont définis par une différence d'une base entre les deux allèles à un endroit déterminé du génome. Ils ont une fréquence allélique mineure supérieure ou égale à 1%. Ces variants constituent une des sources majeures de variation inter-individuelle génétique et phénotypique. Ils sont associés à la diversité entre les populations, aux différences de sensibilité aux maladies et aux médicaments. Les SNPs peuvent entraîner une altération protéique par une substitution d'acide aminé (SNPs non synonymes), par une altération de l'épissage ou de la régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle.

Les SNPs sont répartis le long du génome humain et leurs caractéristiques en font de puissants outils pour les études génétiques et leur faible taux de mutation par rapport aux autres polymorphismes permet leur utilisation dans les études de population.

Ils sont actuellement les marqueurs génétiques de choix dans les études de maladies complexes et de pharmacogénétique. L'ensemble des SNPs est référencé dans des bases de données publiques, notamment celles du projet « HapMap » (www.hapmap.org) et du NCBI (www.ncbi.org).

Les maladies complexes

Dans le cas des maladies rares de type mendéliennes, l'atteinte d'un seul gène est une condition suffisante pour développer la maladie. Plus d'un millier de gènes responsables de ces maladies a été identifié.

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

L'implication des SNPs dans la prédisposition aux maladies complexes a été confirmée par la mise en évidence du rôle de certains gènes dans ce type de maladies complexes : la maladie d'Alzheimer et APOE4 (113), le diabète de type 2 et KCNJ11 (114), la thyroïdite auto-immune et CTLA4 (115), et la MC et NOD2 (1). Ces SNPs peuvent être situés au niveau des régions codantes ou non-codantes. Il est probable que dans la plupart des cas, ce ne soit pas une perte de fonction de la protéine codée qui soit en cause, mais une association d'effets tels que des altérations de régulation au niveau de la transcription ou de la traduction.

Les études d'association génétique

Ces études comparent la fréquence allélique d'un polymorphisme, ou d'un ensemble de polymorphismes, chez des sujets malades et chez des sujets sains afin d'identifier des marqueurs pour lesquels ces fréquences sont significativement différentes entre les deux groupes. Elles permettent l'identification d'allèles de variants associés à un phénotype (risque accru de développer une maladie en présence de ce variant, avec une pénétrance pouvant être faible). Le lien de cause à effet entre cet allèle et le risque accru n'est pas connu à l'issue de ces études.

Analyses statistiques

L'équilibre d'Hardy Weinberg

Lors des études d'association, pour chaque polymorphisme testé, il est nécessaire de vérifier que celui-ci respecte l'équilibre d'Hardy-Weinberg dans la population étudiée. La loi de l'équilibre d'Hardy-Weinberg stipule que, dans une très grande population dans laquelle les mariages entre individus se font au hasard (panmixie), et qui ne connaît ni migration, ni sélection naturelle, les fréquences alléliques et génotypiques restent stables au fil des générations. Dans cette hypothèse, la loi d'Hardy-Weinberg permet de calculer les fréquences alléliques à partir de la mesure des fréquences génotypiques et inversement.

Selon cette loi, si A1 et A2 sont les allèles d'un locus autosomique bi-allélique, de fréquence respective p et q (avec q=1-p), les fréquences des trois génotypes possibles A1A1, A1A2 et A2A2, sont respectivement p^2, 2pq et q^2. Une population dans laquelle la distribution génotypique observée est statistiquement compatible avec cette distribution théorique est dite en équilibre d'Hardy-Weinberg pour le locus considéré.

Pour vérifier qu'un polymorphisme respecte l'équilibre d'Hardy-Weinberg dans la population témoin, on utilise un test du χ^2 à 1 degré de liberté qui permet de calculer l'écart entre les fréquences observées et les fréquences théoriques respectives des différents génotypes. Si cet écart est significatif, la distribution du polymorphisme dans la population n'est pas en équilibre d'Hardy-Weinberg. La raison la plus fréquente d'une déviation de l'équilibre d'Hardy Weinberg correspond à des erreurs de génotypage. Il peut également s'agir d'un biais de sélection de la population étudiée. En effet, la distribution d'un polymorphisme potentiellement impliqué dans des maladies modifiant la survie d'un individu peut ne pas respecter l'équilibre d'Hardy-Weinberg dans les populations les plus âgées.

Analyses statistiques utilisées dans les études d'association

Les études d'association réalisées dans des échantillons de population composés d'individus non apparentés consistent à évaluer des associations statistiques entre les génotypes d'un SNP et un phénotype donné en comparant les fréquences des génotypes entre un échantillon d'individus présentant le phénotype étudié (par exemple, une maladie) et un échantillon d'individus ne présentant pas le phénotype. Ce type d'analyse se formalise, le plus souvent, sous la forme d'un tableau croisé 2x3. Un test du Chi2 permet de tester la différence entre les effectifs génotypiques observés dans les deux groupes et ceux attendus sous l'hypothèse d'une indépendance entre la maladie et le polymorphisme étudié. La surreprésentation statistiquement significative d'un génotype particulier dans l'un des deux groupes comparés suggère l'association de cet allèle avec la maladie. La force de l'association est alors estimée par le calcul de l'OR défini comme le rapport entre la proportion d'individus porteurs de l'allèle mineur chez les cas et la proportion d'individus porteurs de l'allèle mineur chez les témoins. Les calculs d'OR sont réalisés par un modèle de régression logistique ajusté sur les facteurs de risque conventionnels de la maladie. Cet OR illustre l'augmentation (si OR>1) ou la diminution (si OR<1) du risque de survenue de la maladie chez les individus porteurs de l'allèle mineur par rapport aux individus non porteurs.

Les études d'association consistent également en la comparaison de la moyenne d'un phénotype (par exemple, le dosage d'une constante biologique ou un paramètre anthropométrique) entre les individus présentant les différents génotypes. Pour cela, l'approche statistique la plus fréquente est celle d'une analyse de variance (ANOVA) comparant les moyennes du phénotype étudié entre groupes de génotypes ou d'une analyse de covariance (ANCOVA) si l'analyse est ajustée sur les facteurs de confusion.

En général, ces tests sont considérés comme statistiquement significatifs lorsque la valeur de p calculée est $\leq 0,05$. Cette valeur correspond à un risque α, ou risque de première espèce, de 5% qui

représente la probabilité de conclure à tort à une association. Notons qu'il existe aussi un risque β, ou risque de deuxième espèce, qui représente la probabilité d'exclure à tort une association. Aujourd'hui, avec la multiplication des études d'association comportant un très grand nombre de SNPs, une correction pour tests multiples est souvent requise. En effet, le fait d'augmenter le nombre de SNPs étudiés augmente le nombre de tests effectués et ainsi la probabilité de mettre en évidence un résultat significatif par hasard. Concrètement, si on effectue 100 tests indépendants avec un seuil de significativité à 0,05, statistiquement 5 tests apparaîtront comme significatifs par le seul fait du hasard (faux positifs). Une correction pour tests multiples consiste alors à modifier (ou corriger) le seuil de significativité pour considérer l'association comme significative. La correction pour test multiple la plus souvent utilisée est celle de Bonferroni qui consiste à diviser le seuil de significativité généralement admis à 0,05 par le nombre de tests effectués (116). Bien que cette correction soit connue pour être trop stricte et souvent inadaptée aux études de polymorphismes génétiques (117) (une correction trop stricte peut en effet entraîner le risque de rejeter une association alors qu'elle est réelle), elle est malgré tout souvent employée.

Facteurs de confusion et interactions

Dans une étude d'association, la relation statistique observée entre un polymorphisme et un phénotype peut, en réalité, être en tout ou partie, expliquée par un facteur confondant (consommation de tabac par exemple…). Pour être potentiellement confondante, une variable doit être associée à l'exposition (mutation par exemple), être associée à la maladie indépendamment de l'exposition et, donc, ne pas être un relais (étape intermédiaire) dans le processus physiopathologique entre l'exposition et la maladie. Les analyses stratifiées constituent une méthode permettant de contrôler la confusion, en évaluant l'association entre le facteur d'exposition et la maladie dans les catégories ou classes de la variable potentiellement confondante. Malheureusement, en posant rapidement le problème de la puissance statistique,

l'analyse stratifiée n'est pas une méthode pratique pour contrôler simultanément plusieurs facteurs confondants. Une solution alternative consiste à recourir à l'analyse multivariée.

L'interaction, ou modification d'effet, qui se distingue de la confusion, constitue une information très intéressante. Certains facteurs de risque génétiques peuvent n'avoir d'effets que dans des contextes physiologiques (âge, sexe…), environnementaux (consommation de tabac, consommation d'alcool…) ou pathologiques (hypertension artérielle, dyslipidémies…) qu'il est intéressant de caractériser par des recherches d'interactions statistiques. Ces analyses d'interaction permettent, ainsi, d'identifier des sous-groupes à plus haut risque, avec des implications potentielles en terme de santé publique. Le terme d'interaction est souvent source d'ambiguïté, l'interaction statistique se différenciant de l'interaction biologique, ou causale (118). En terme statistique, il existe une interaction gène-environnement (ou gène-gène) lorsque l'effet de la mutation sur la maladie dépend de l'exposition à un facteur environnemental (ou de la présence d'une autre mutation génétique). Autrement dit, le taux d'incidence de la pathologie en présence des deux facteurs (gène/environnement ou gène/gène) diffère du taux d'incidence attendu résultant de leur effet individuel. Lorsque l'effet est supérieur à celui attendu, on parle d'interaction positive ou synergique tandis que lorsqu'il est plus faible on parle d'interaction négative ou antagoniste.

Étude d'association des facteurs génétiques prédictifs de l'histoire naturelle post-opératoire de la maladie de Crohn

Les objectifs de notre travail

La prescription d'un traitement prophylactique post-opératoire repose actuellement sur un faisceau d'arguments cliniques. Un ciblage génétique des individus à forte probabilité de RPO permettrait de limiter la prescription de ce traitement préventif à une population ciblée à haut risque de RPO et donc d'en diminuer son coût et sa toxicité potentielle. Par ailleurs, cela permettrait d'adapter à chaque patient le rythme et les modalités de la surveillance post-opératoire.

Par ailleurs, chaque exérèse chirurgicale pouvant être à l'origine de complications post-opératoires qui vont altérer la qualité de vie du patient, il est essentiel de déterminer des outils utilisables en pratique courante permettant de cibler la population à haut risque chirurgical afin d'adapter les modalités pratiques de la chirurgie chez ces patients.

Ainsi nous avons voulu conduire 2 études d'association génétique sur notre population de patients atteints par la MC et issus de la « Nancy IBD cohort ». La première étude avait pour but de rechercher des facteurs génétiques prédisposant à la RPO, la seconde étude avait pour objectif de rechercher des facteurs génétiques prédictifs des complications post-opératoires de la chirurgie de la MC.

Etude N°2 : Un variant génétique de *CARD8* est un facteur de risque de récidive chirurgicale de la maladie de Crohn

CARD8 gene variant is a risk factor for recurrent surgery in patients with Crohn's disease

Adeline Germain, Rosa-Maria Guéant, Mathias Chamaillard, Laurent Bresler, Jean-Louis Guéant, Laurent Peyrin-Biroulet. Dig Liver Dis. 2015 Jul 29. pii: S1590-8658(15)00419-3. doi: 10.1016/j.dld.2015.07.013.

Résumé

La MC est une maladie chronique invalidante et évolutive caractérisée par une alternance de poussées et de rémissions conduisant à une résection intestinale chez environ 30% des patients. La chirurgie n'est cependant pas un traitement curatif et la récidive est presque inéluctable chez les patients atteints par la MC, en faisant un problème de santé publique. Plus de 70% des patients vont nécessiter une seconde exérèse chirurgicale dans les 10 ans qui suivent l'intervention initiale. Les avancées dans le domaine de la génétique ont permis d'identifier de nombreux gènes de susceptibilité aux MICI. L'association du polymorphisme de *NOD2/CARD15* avec une prédisposition pour la MC a été décrite pour la première fois en 2001 (17,18). Une méta-analyse récente a conclu que les données actuelles restaient insuffisantes pour affirmer le caractère prédicitif de *NOD2/CARD15* dans la survenue d'une récidive chirurgicale, mais sans exclure tout de même un rôle de celui-ci (119). Alors que, Fowler et al. a montré qu'un variant du gène codant pour la protéine SMAD3 était un facteur de risque de récidive chirurgicale (120), l'influence des gènes de susceptibilité aux MICI sur la récidive chirurgicale reste encore peu étudiée. Dans son étude, Sehgal et al. a décrit que les patients atteints d'une MC et porteurs l'allèle à risque pour le

gène IRGM (rs4958847) avaient une histoire naturelle de leur maladie plus péjorative avec un nombre plus élevé d'exérèses intestinales par rapport aux sujets témoins (121). Bien que de nombreux SNPs associés aux MICI ont été décrits, aucune n'étude n'a étudié l'influence de 200 SNPs sur le risque de récidive chirurgicale, comme nous l'avons fait dans notre étude.

Objectif

L'objectif de ce travail était d'identifier des facteurs de risque génétiques associés à la récidive chirurgicale dans la MC qui permettraient de cibler les patients qui doivent bénéficier rapidement d'un traitement médical "agressif" et/ou d'un traitement prophylactique post-opératoire; mais aussi d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Population et méthodes

Au cours de ce travail de thèse, nous avons travaillé sur une population de patients atteints d'une MC issue de la « Nancy IBD cohort » (87). Il s'agit d'une large cohorte observationnelle avec des informations cliniques sur 1173 patients atteints par une MICI (857 MC et 316 RCH) et suivis au CHU de Nancy. En ce qui concerne le recueil d'échantillons biologiques, une phlébotomie était réalisée à jeûn et le sang était collecté dans un tube EDTA, au moment de l'inclusion dans la cohorte. Tous les patients inclus dans la cohorte ont signé un consentement spécifique pour l'analyse génétique.

La définition de la RPO : Dans la littérature, la très grande disparité de valeurs dans les taux de RPO (de l'ordre de 25 à 60% à 10 ans (16,105)) est essentiellement due au fait que la plupart des auteurs ne distinguent pas la récidive clinique de la récidive chirurgicale, endoscopique ou radiologique (12). Nous avons donc voulu choisir un critère de récidive objectif, à savoir la récidive chirurgicale c'est-à-dire nécessitant une nouvelle exérèse chirurgicale pour MC pour réaliser notre étude. Pour cela l'ensemble des dossiers médicaux des 280 patients a été analysé, ainsi que tous les comptes-rendus opératoires de l'intervention initiale et de la seconde

intervention en cas de récidive, tous les comptes-rendus de scanner et d'imagerie par résonnance magnétique (IRM), tous les comptes-rendus d'endoscopie. Etant considérés comme en récidive chirurgicale tous les patients ayant bénéficié d'une seconde exérèse intestinale pour localisation de la MC.

Le choix des gènes et des SNPs : Les patients génotypés sont les 280 premiers patients atteints d'une MC de la cohorte et qui ont été inclus dans un consortium international. Le choix des 200 SNPs est basé sur les données publiées antérieurement dans une étude d'association génome entier (GWAS) (122).

Le génotypage moléculaire : L'ADN génomique de 280 patients issus de la "Nancy IBD cohort" a été isolé à partir des échantillons de sang en utilisant un kit Qiagen (Qiagen-France, Courtaboeuf cedex France). Le génotypage des polymorphismes étudiés a été réalisé en utilisant la technologie SNPlex (Applied Biosystems). Le génotypage était considéré comme réussi si le taux global de succès pour le SNP était supérieur à 80% et si l'équilibre de Hardy-Weinberg ne différait pas significativement de la distribution attendue (Test de Chi2 avec $p>0,05$ entre les valeurs attendues et les valeurs actuelles).

Résultats

Cent trente-sept patients de la "Nancy IBD cohort" ont nécessité une résection intestinale pour MC. Parmi ces patients, 38 patients (28%) ont nécessité une seconde chirurgie pour une récidive de la MC au cours de leur suivi.

En analyse multivariée, l'homozygotie pour l'allèle à risque de CARD8 (OR 7,56, 95% CI 1,13–50,37, p=0,04) était indépendamment et statistiquement associé à la récidive chirurgicale. L'homozygotie pour l'allèle à risque de NAT2 n'était pas indépendamment et statistiquement associé à la récidive chirurgicale.

Conclusion

Notre série est la première à avoir étudié l'influence de 200 SNPs associés à la MC sur la récidive chirurgicale, dans une cohorte bien définie appelée la "Nancy IBD cohort", avec une durée moyenne de suivi de 13,5 ans. Nous avons étudié la récidive chirurgicale, ce qui est un point de mesure objectif.

Nous avons identifié une association entre les allèles à risque de CARD8 et le risque augmenté de récidive chirurgicale. L'identification de CARD8 comme un facteur de risque génétique de risque de récidive chirurgicale est d'un intérêt particulier puisqu'il pourrait devenir une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de la MC dans la période post-opératoire.

Résultats scientifiques

Abstract

Background and aims: Post-operative recurrence is frequent in Crohn's disease. Genetic factors associated with post-operative recurrence remain poorly understood. Identification of genetic variants associated with repeat surgery would allow risk stratification of patients who may benefit from early aggressive therapy and/or post-operative prophylactic treatment.

Methods: Crohn's disease patients who had at least one bowel resection were retrospectively identified from the "Nancy IBD cohort". Covariates and potential interactions were assessed using the Cox proportional hazard model. Kaplan–Meier curves for time to surgical recurrence were developed for 200 genetic variants and analyzed with the log-rank test.

Results: 137 patients had at least 1 resection in our cohort: 38 had a surgical recurrence (28%). In multivariate analysis, current smoker status (OR 6.97, 95% CI 1.85–26.22, p=0.004), post-operative complications after prior surgery (OR 2.72, 95% CI 1.02–7.22, p = 0.044), and Caspase recruitment domain-containing protein 8 (CARD8) homozygosity for the risk allele (OR 7.56, 95% CI 1.13–50.37, p=0.036) remained significantly and independently associated with surgical recurrence.

Conclusion: Current smoker status was associated with increased risk of surgical recurrence. A novel association between CARD8 and increased risk of surgical recurrence in Crohn's disease was observed. CARD8 could be a new marker for risk stratification and prevention of recurrent surgery.

Introduction

Crohn's disease (CD) is a chronic disabling and progressive condition characterized by a relapsing-remitting disease course leading to bowel resection in approximately 80% of CD patients (123,124). However, surgery is not a cure and surgical recurrence is common in patients with CD. Notably, up to 70% of patients require a second surgery in the 10 years following their initial surgery (125). Post-operative recurrence is thought to result from a combination between genetic, environmental, bacterial and immune risk factors (87). Several studies have investigated the risk factors for surgical recurrence in CD. Smoking status, prior intestinal resection, penetrating behavior, perianal disease and extensive bowel disease (>50 cm) are well-established risk factors (14).

Advances in the field of genetics have led to the identification of numerous susceptibility genes for inflammatory bowel disease (IBD). The association of NOD2/CARD15 polymorphism with predisposition to CD was first reported in 2001 (17,18). A recent metaanalysis concluded that there are insufficient data to support a role for NOD2/CARD15 in predicting surgical recurrence, but did not exclude a role for it (119). While Fowler et al. found that variant in the SMAD3-encoding gene was a risk factor for recurrent surgery (120), the influence of the aforementioned IBD risk alleles on the postsurgical recurrence of CD remains poorly investigated. In their study, Sehgal et al. described that CD patients carrying an "at risk" allele for IRGM (rs4958847) had an overall more severe disease course with a greater number of surgeries in comparison with those who were "wild-type" (121). The identification of genetic risk factors associated with the surgical recurrence in CD could allow risk stratification of patients who may benefit from early aggressive therapy and/or post-operative prophylactic treatment and may also identify novel therapeutic targets. We herein report a genetic association study on CD surgical recurrence using a well-defined cohort of 857 CD patients, namely the "Nancy IBD cohort" (87).

Methods

Study subjects

As previously described, the "Nancy IBD cohort" is a large observational cohort of patients with IBD with detailed clinical information on 1173 patients with IBD (857 CD, 316 ulcerative colitis) (87). Patients were followed prospectively according to standard of care. Information about the "Nancy IBD cohort" is reported to the Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (no. 1404720), which supervises the implementation of the act regarding data processing, data files, and individual liberties that came into effect on January 6th 1978, and was amended on August 6th 2004 to protect the personal data of individuals. Available information retrospectively collected includes age at diagnosis, gender, disease duration, disease location and behavior according to the Montreal classification (30), extra-intestinal manifestations, smoking status, date, type and indication of surgery, and date of recurrence. Smoking status was defined as non-smoker or current smoker at time of surgery. Surgery for early complications of first surgery, for perianal disease, fistulotomy and/or faecal diversion were excluded.

Genotyping

Genomic DNA was isolated from blood samples taken from the first 280 consecutive adult CD patients from the "Nancy IBD Cohort". 200 CD-associated SNPs from previous studies were analyzed (49) (Annexe 4). In this study, 31 new distinct susceptibility loci for CD were identified and data from three studies were combined (a total of 3230 cases and 4829 controls) and the authors performed replication in 3664 independent cases (49). All patients signed a consent form for genetic analysis. SNPs were genotyped using the Applied Biosystems (Foster City, CA) SNPlex technology, which is based on the Oligonucleotide Ligation Assay combined with multiplex PCR amplification. Experimental methods were as per the manufacturer's instructions. Genotype assignment was performed by capillary electrophoresis analysis using an ABI 3730xl

DNA Analyzer and ABI GeneMapper v3.7 soft ware. Genotyping was considered to be successful if the overall success rate for the SNP was >80% and the Hardy–Weinberg equilibrium did not depart significantly from the expected distribution ($p > 0.05$ for Chi2-test between expected and actual values).

Statistical analysis

Our primary outcome measure was repeat CD-related Bowel resection. Continuous variables were summarized using means and standard deviations. Polymorphisms were tested for Hardy–Weinberg equilibrium before using the Fisher exact test (or Chi2 test) to compare allelic and genotype frequencies. Categorical variables were expressed as proportions. The t test was used to compare continuous variables while the chi-square test (or Fisher's exact test) was used for categorical variables. Cox proportional hazards models were constructed to examine the effect of the various genetic polymorphisms adjusting for potential confounders. Time from first surgery to surgical recurrence (or to end of follow-up if one single surgery) was used as the time variable in the Cox proportional hazards model. Variables reaching a p value of ≤ 0.10 in the univariate analysis were entered into the multivariate analysis where a p-value <0.05 indicated independent statistical significance. Kaplan–Meier curves for time to repeat surgery were developed for each genetic variant and compared using the log-rank test.

Results

Study population

One hundred and thirty-seven patients of the "Nancy IBD cohort" required a CD-related bowel resection. Mean age at diagnosis was 23 years (range, 3–82), with a mean disease duration of 5 years (range, 0–32). One hundred eight patients were males (39%), 84 had ileitis (30%), 57 had colitis (20%), 131 had ileo-colonic disease (47%), 8 had upper gastrointestinal involvement (3%);

103 patients had purely inflammatory disease (37%), 95 had stricturing disease (34%), and 82 had penetrating disease according to the Montreal classification (29%). The mean duration of follow-up was 13.5 years (range 0–34). Indication for first surgery is shown in Figure 10.

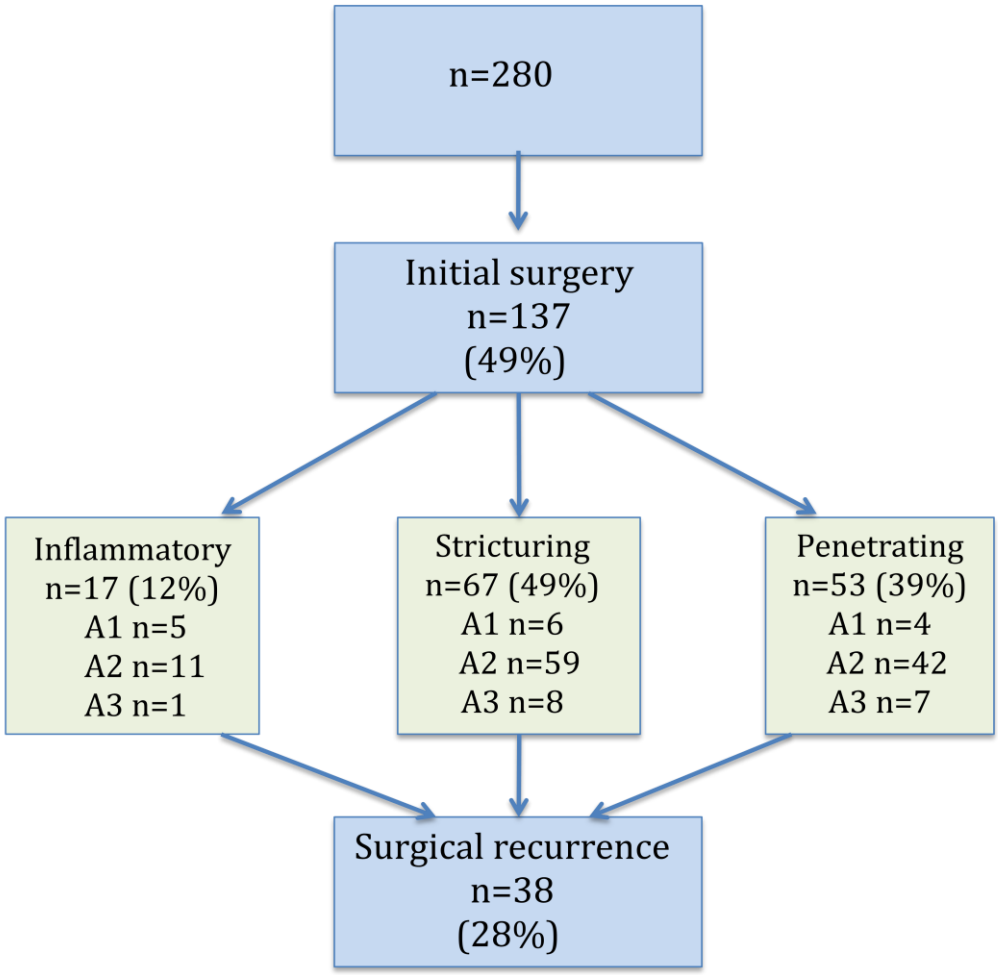


Figure 10 Indication for first surgery in 280 genotyped Crohn's disease patients.

Factors associated with surgical recurrence

Of 137 patients requiring an intestinal resection, 38 patients (28%) required a second surgery during follow-up. Clinical characteristics of CD patients according to surgical recurrence are shown in Table 7.

	No surgical recurrence (n=99)	Surgical recurrence (n=38)	p-value
Female gender	65 (65.6)	17 (44.7)	0.02
Mean age at diagnosis (years ± SD)	23 ± 13	21 ± 9	0.92
Mean disease duration to first surgery (years ± SD)	7 ± 7	4 ± 3	0.05
Mean time to second surgery (years ± SD)	NA	9.2 ± 1.0	
Mean duration of follow-up (years ± SD)	14.1 ± 0.8	15.3 ± 0.6	0.11
Location (n, (%))			0.65
Ileal	53 (53.5)	17 (44.7)	
Colonic	17 (17.1)	8 (21.1)	
Ileocolonic	29 (29.2)	13 (34.2)	
Upper gastrointestinal	5 (0.5)	2 (0.5)	0.96
Behavior (n, (%))			0.13
Inflammatory	21 (21.2)	5 (13.1)	
Stricturing	46 (46.5)	25(65.8)	
Penetrating	32(32.3)	8(21.1)	
Type of surgery (n, (%))			0.07
Ileocaecal resection	59 (59.6)	19 (50.0)	
Small bowel resection	5 (5.0)	7 (18.4)	
Colonic resection	29 (29.3)	11 (28.9)	
Small bowell and colic resection	5 (5.0)	0	
Defunctioning loop stoma	1 (0.1)	1 (2.6)	
Perianal	49 (49.5)	15 (39.5)	0.29
Current smoker (n, (%))	54 (54.5)	34 (89.5)	0.001
Post-operative complications (n, (%))	18 (18.2)	16 (42.1)	0.004

Table 7 Clinical characteristics of CD patients according to surgical recurrence. (NA= Not Applicable)

At univariate analysis, variables associated with surgical recurrence were female gender (p=0.02), preoperative disease duration (p=0.05), current smoker status (p=0.001), and post-operative complications after prior surgery (p=0.004). There was no association between surgical recurrence and other clinical variables such as disease location and behavior (p = 0.65 and p = 0.13 respectively). Genetic variables associated with surgical recurrence on univariate analysis were Caspase recruitment domain-containing protein 8 (CARD8) (rs2043211) homozygosity for the risk allele (p=0.0007) and N-acetyltransferase 2 (NAT2) (rs1799930) homozygosity for the risk allele (p = 0.001). No other genetics variants were associated with recurrent surgery (Table 7). These two SNPs were in Hardy–Weinberg equilibrium (Table 8).

SNP	Wild type allele (homozygote)	Heterozygote	Risk allele (homozygote)	Minor allele frequency	p*
CARD8 (rs2043211)	124 (AA)	127 (AT)	20 (TT)	0.31	0.1
NAT2 (rs1799930)	128 (GG)	114 (AG)	18 (AA)	0.28	0.2

*Pearson's chi-squared test for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium

Table 8 *CARD8 and NAT2* allele frequency distribution.

All variables reaching a p value of ≤0.10 in the univariate analysis were entered into the multivariate analysis. In the multivariate analysis, current smoker status (OR 6.97, 95% CI 1.85–26.22, p = 0.004), post-operative complications after prior surgery (OR 2.72, 95% CI 1.02–7.22, p= 0.04), and CARD8 homozygosity for the risk allele (OR 7.56, 95% CI 1.13–50.37, p = 0.04) remained significantly and independently associated with surgical recurrence (Table 9). Disease

duration at first surgery, female gender and NAT2 homozygosity for the risk allele were no longer statistically significant.

	Odds Ratio	95% Confidence Interval	P Value
Current smoker status	6.97	1.85–26.22	0.004
Post-operative complications after prior surgery	2.72	1.02-7.22	0.04
*CARD8** homozygosity for the risk allele	7.56	1.13–50.37	0.04

* *Caspase recruitment domain-containing protein 8*

Table 9 Multivariable logistic regression analysis of risk of surgical récurrence

The Kaplan–Meier survival curves for repeat surgery according to CARD8 risk allele status is depicted on Figure 11. No other genetic variants were associated with recurrent surgery.

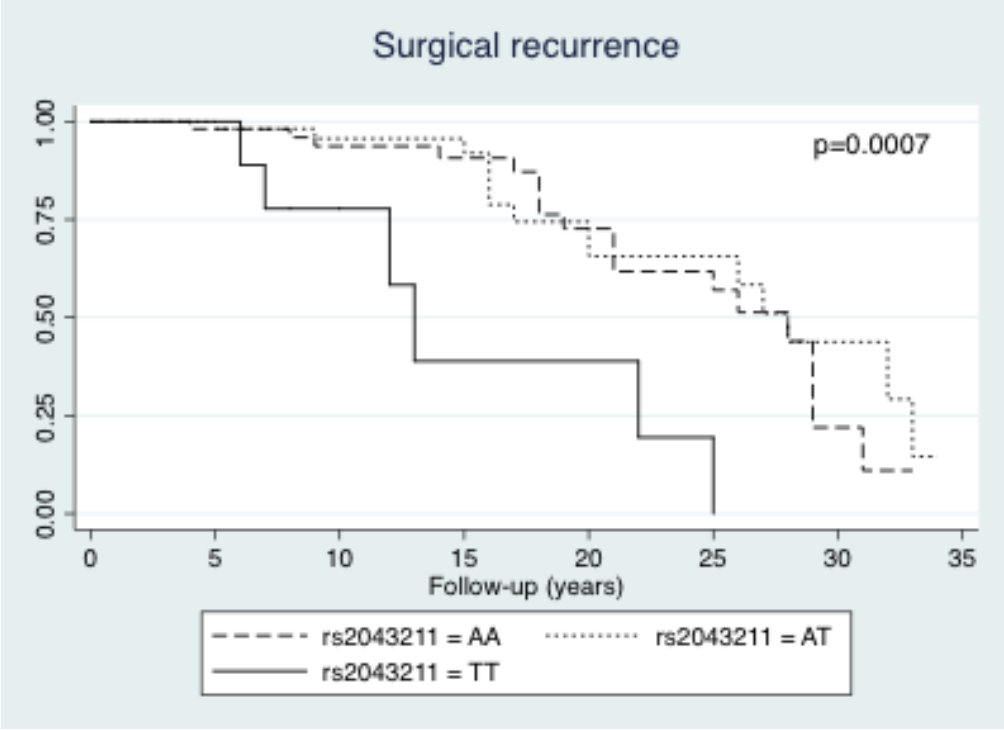


Figure 11 Survival curve for time to surgical recurrence according to *Caspase recruitment domain-containing protein 8* genotype.

Discussion

Numerous studies have focused on the identification of genetic determinants on CD progression, but very few have focused on the impact of genetic factors on the risk of surgical recurrence (119,120,126–130). Our series is the first one that studied the influence of 200 CD-associated SNPs on surgical recurrence in CD, in a well-defined cohort namely the "Nancy IBD cohort" with a mean follow-up of 13.5 years. We reported the association of CARD8 and NAT2 genes with the risk of surgical recurrence in CD. A correlation between genotype and clinical phenotype shall allow us to envisage some substantial improvements in CD management by identifying patients at high risk of surgical recurrence. This may lead to the development of targeted strategies aim at changing the natural course of CD.

The role of genetics factors in surgical recurrence has not been clearly defined. To date, 7 studies have examined the association between genetic variants and surgical recurrence. Six of these series have focused on NOD2/CARD15 variants (127–132). A meta-analysis concluded that there are insufficient data to support a role for NOD2/CARD15 in predicting surgical recurrence, but did not exclude a role for it (119). In our study population, the predictive value for surgical recurrence of 200 SNPs, including NOD2/CARD15, along with other clinical characteristics was studied. While NOD2/CARD15 variants were not predictor of surgical recurrence in our population, we herein described that homozygosity for the CARD8 and the NAT2 risk alleles were associated with increased risk of recurrent surgery in CD in univariate analysis.

We found that CD patients carrying the CARD8 allele risk (rs2043211) were positively and independently associated with surgical recurrence in CD. The CARD8 gene, which is highly expressed in both monocytes and the gut epithelium, is a potential candidate risk gene for IBD, based on gene location (in the IBD6 locus) and biological function (133–136). CARD8 is a negative regulator of nuclear factor-kappa B (NF-KB) and is a suppressor of apoptosis. Recent

studies found that CARD8 interacts with NLRP3-coupled inflammasome and members of the NOD-like receptor family thus implying a role for CARD8 in the regulation of innate and adaptative immunity (133–136). Activation of NLRP3 by a diverse panel of ligands leads to the formation of an inflammasome complex consisting of caspase-1 and ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), which mediates the production and secretion of IL-1ß in response to microbial challenge. Recently attention has focused on the inflammasome and its role in maintaining gut homeostasis and mediating host immune defenses against pathogenic bacteria and stress signals. The dysregulation of the inflammasome complex is thought to contribute to chronic inflammation (137). We could speculate that the high level risk of surgical recurrence may result from the failure of homozygous patients for the CARD8 allele risk to finely tuned NF-KB activation. It may be explained by the presence of a dysfunctional NLRP3 inflammasome caused by the expression of mutated forms of NLRP3 in combination with a CARD8, not being able to act as a suppressor of NF-KB activation.

CARD8 was an independent predictor of the risk of surgical recurrence. Indeed the association was not influenced by other factors known to increase the risk such as smoking. Among them, postoperative complications could have a detrimental influence on the long-term outcome following intestinal resections, leading to increased number of repeat resection surgery. Our study confirms a high rate of repeat resection with 27.7% of patients requiring a second surgery (138,139). In our series, there was a significant difference regarding surgical recurrence rate between smokers and non-smokers ($p = 0.001$). Smoking is known to be associated with a more aggressive disease course and increased postoperative recurrence (126). Recently, a meta-analysis described a 2.5-fold increase in the risk of second surgery in smokers compared with non-smokers (140). Unfortunately, the potential confounding effect of smoking could not be analyzed as only 11.5% of patients were non-smokers ($n = 4$) among patients with surgical recurrence. Patients with post-operative complications were more likely to require repeat surgical intervention for CD

recurrence. Two studies described surgical complications as an independent predictor for surgical recurrence (141,142). In line with our report, the aforementioned studies showed that development of postoperative complications is a risk factor for early recurrence in CD. Postoperative complications may have a detrimental influence on the long-term outcome following intestinal resections, leading to repeated resection surgeries.

Our results need to be confirmed in a replication cohort, which a clear limitation of our study. If this association can be confirmed, it would allow for early risk classification of patients who may benefit from pre- and post-operative aggressive treatment. In our retrospective study it was not possible to account for the effects of all IBD-related medications.

Our study is the first to have studied the influence of 200 CD-associated SNPs on surgical recurrence in CD, in a well-defined cohort namely the "Nancy IBD cohort" and with a mean follow-up of 13.5 years. We evaluated surgical recurrence, which is an objective outcome measure. We had too missing data for evaluating the association between genetic factors and endoscopic recurrence. Also, due to the retrospective nature of the study, there were missing data regarding the use of postoperative medications and this parameter could not be analyzed. It is noteworthy that the patients enrolled in the present study were included in the international IBD genetics consortium (49); it is the reason why the entire Nancy IBD cohort could not be genotyped.

In conclusion, an independent association between CARD8 risk alleles and increased risk of surgical recurrence in CD was identified. In addition, current smoker status and post-operative complications were confirmed as two main clinical predictors for surgical recurrence. The identification of CARD8 as a risk allele for surgical recurrence is of particular interest as it may be a new marker for the treatment of CD in the post-operative setting.

Etude N°3 : Un variant génétique de *NOD2* est un facteur de risque de complication post-opératoire de la maladie de Crohn (manuscrit soumis)

NOD2 gene variant is a risk factor for post-operative complications in patients with Crohn's disease: a genetic association study

Adeline Germain, Rosa-Maria Guéant, Mathias Chamaillard, Patrick B. Allen, Laurent Bresler, Jean-Louis Guéant, Laurent Peyrin-Biroulet. Soumis.

Résumé

Contexte de notre étude

Malgré l'avènement des anti-TNFα dans la prise en charge des MICI et en particulier dans la MC, une large proportion des patients nécessite toujours une résection intestinale. Cette chirurgie est associée à un taux de morbidité post-opératoire élevé. Peyrin-Biroulet et al, ont rapporté un taux de mortalité post-opératoire de 2% et un taux global de complications compris entre 11 et 14% (143). Les CIIP comprennent les fistules anastomotiques et les abcès intra-abdominaux et surviennent chez environ 10% des patients (143). Plusieurs facteurs de risque cliniques de CIIP ont été décrits tels que le tabagisme actif, la prise de corticoïdes en pré-opératoire et les traitements anti-TNFα (10,15,86,140). Des avancées dans le domaine de la génétique ont permis d'identifier de nombreux gènes de prédisposition à la MC, en particulier NOD2/CARD15 (17,18). Cependant, aucune étude n'a à l'heure actuelle évalué l'association entre NOD2 et le risque de complications post-opératoires.

Objectif de notre étude

Le but de notre étude était d'évaluer le risque global et spécifique de morbidité post-opératoire en fonction de l'influence de 203 SNPs. Nous avons émis l'hypothèse que les variants de NOD2 pourraient être associés au risque de complications post-opératoires chez les patients atteints d'une MC.

Population et méthodes

Au cours de ce travail de thèse, nous avons travaillé sur une population de patients atteints d'une MC issue de la « Nancy IBD cohort ». Il s'agit d'une large cohorte observationnelle avec des informations cliniques sur 1173 patients atteints par une MICI (857 MC et 316 RCH) et suivis au CHU de Nancy. En ce qui concerne le recueil d'échantillons biologiques, une phlébotomie était réalisée à jeûn et le sang était collecté dans un tube EDTA, au moment de l'inclusion dans la cohorte. Tous les patients inclus dans la cohorte ont signé un consentement spécifique pour l'analyse génétique.

Le choix des gènes et des SNPs : Les patients génotypés sont les 280 premiers patients atteints d'une MC de la cohorte et qui ont été inclus dans un consortium international. Le choix des 203 SNPs est basé sur les données publiées antérieurement dans une étude d'association génome entier (GWAS).

Le génotypage moléculaire : L'ADN génomique de 280 patients issus de la "Nancy IBD cohort" a été isolé à partir des échantillons de sang en utilisant un kit Qiagen (Qiagen-France, Courtaboeuf cedex France). Le génotypage des polymorphismes étudiés a été réalisé en utilisant la technologie SNPlex (Applied Biosystems). Le génotypage était considéré comme réussi si le taux global de succès pour le SNP était supérieur à 80% et si l'équilibre de Hardy-Weinberg ne différait pas significativement de la distribution attendue (Test de Chi2 avec $p>0,05$ entre les valeurs attendues et les valeurs actuelles).

Résultats

Cent trente-sept patients de la "Nancy IBD cohort" ont nécessité une résection intestinale pour MC. Parmi les 137 patients ayant nécessité une chirurgie, 34 patients (24,8%) ont présenté une complication post-opératoire. La mortalité était nulle dans ce groupe. Une CIIP est survenue chez 18 patients patients (13.1%), une complication non intra-abdominale a été observée chez 16 patients (11,7%).

En analyse multivariée, le tabagisme actif (OR 2,71, 95% CI 1,18-6,21, p = 0,02) et l'homozygotie pour l'allèle à risque de NOD2 (OR 2,07, 95% CI 1,15-3,72, p = 0,01) étaient indépendamment et statistiquement associés à la survenue d'une complication post-opératoire. Dans notre population, la distribution des fréquences alléliques de NOD2 respectait l'équilibre de Hardy-Weinberg.

Quand les CIIP étaient analysées seules, on retrouvait une association indépendante avec le tabagisme actif (OR 4,27, 95% CI 1,42-12,79, p=0,009) et l'homozygotie pour l'allèle à risque de NOD2 (OR 2,13, 95% CI 1,05-4,33, p=0,03) (figure 13). Quand les complications non intra-abdominales étaient analysées seules, on ne retrouvait aucune association avec les différentes variables cliniques et génétiques étudiées.

L'analyse stratifiée montrait que le tabagisme actif ne modifiait pas l'effet et n'était pas un facteur confondant de l'association entre les polymorphismes étudiés et la survenue de CIIP (ORs 2,05 chez les non-fumeurs et ORs 2,08 chez les fumeurs).

Conclusion

Il s'agit de la première étude qui décrit l'influence de 203 SNPs associés à la MC sur les complications post-opératoires, dans une cohorte bien définie avec un suivi moyen de 13,5 ans. Nous avons identifié une association indépendante entre l'allèle à risque de NOD2 et l'augmentation du risque de CIIP dans la MC. De plus, nous avons identifié le tabagisme actif comme un facteur de risque essentiel prédictif des CIIP dans la chirurgie de la MC. L'identification de NOD2 comme un gène à risque pour la survenue de CIIP est d'un intérêt

particulier puisqu'elle pourrait permettre d'établir une stratification précoce des patients à haut risque de CIIP chez qui la chirurgie devra être planifiée et prédire les patients à haut risque de CIIP.

Résultats scientifiques

Abstract

Background: Post-operative complications are relatively frequent in Crohn's disease and several risk factors have been identified however the influence of genetic factors is unknown.

Methods: Crohn's disease patients who had a Crohn's disease-related bowel resection were identified from the «Nancy IBD cohort ». Post-operative complications were defined as intra-abdominal infectious complications and non intra-abdominal infectious complications occurring within 90 days after surgery. The influence of 203 single-nucleotide polymorphisms on post-operative complication rates was analyzed.

Results: 137 patients (48.9%) had undergone a Crohn's disease-related bowel resection in our cohort : post-operative complications occurred in 34 cases (24.8%), post-operative intra-abdominal infectious occurred in 18 cases (13.1%) : 12 had anastomotic leakage and 6 had intra-abdominal abscesses. In multivariate analysis, current smoker status (OR 2.71, 95% CI 1.18-6.21, p = 0.02) and Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2 (rs5743289) homozygosity for the risk allele (OR 2.07, 95% CI 1.15-3.72, p = 0.01) were independant risk factors of post-operative intra-abdominal infectious complications. Current smoker status and Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2 (rs5743289) homozygosity for the risk allele were not associated with non intra-abdominal infectious complications.

Conclusion: Current smoker status was associated with increased risk of post-operative intra-abdominal infectious complications. A novel association between Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2 and increased risk of post-operative intra-abdominal infectious complications was observed in this study which may be important for future operative management in Crohn's disease.

Introduction

Despite the advent of anti-tumour necrosis factor alpha (anti-TNF-α) agents in the management of Inflammatory Bowel Diseases (IBD) and in particular Crohn's disease (CD), a large proportion of patients still require a surgical resection (87). Unfortunately surgical resection for CD is associated with a high rate of operative morbidity. Peyrin-Biroulet et al, previously reported a post-operative mortality of 2% and an overall complication rate between 11-14% (143). Post-operative intra-abdominal infectious complications (PIIC) which includes anastomotic fistulas, and intra-abdominal abscesses occur in approximately 10% of patients. Several clinical risk factors for PIIC have been reported such as: current smoker status, pre-operative steroids, and anti-TNF α treatments (10,86,142,144).

Further advances in the field of genetics have led to the identification of numerous susceptibility genes for CD. In 2001, two groups identified the gene Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2 (NOD2) as the first susceptibility gene for CD (17,18). The actual function(s) of the NOD2 protein however has not been fully established and the pathogenic mechanisms leading to the development of CD remains to be defined. A recent meta-analysis reported that in patients with CD with a NOD2 polymorphism, there was no associated increase in risk of surgical recurrence compared with patients without the variant (119). No previous studies have evaluated the association between genetic variants such as NOD2 and the risk of postoperative complications. More recently, genome-wide association studies (GWAS) have identified many single-nucleotide polymorphisms (SNPs) to be associated with inflammatory bowel disease (IBD) (62,122,145,146).

The aim of this study was to evaluate the risk of global and specific postoperative morbidity according to the influence of 203 SNPs (122) using a well-defined cohort of 857 CD patients, namely the "Nancy IBD cohort" between 2000 and 2011 (87).

We hypothesized that NOD2 gene variants may be associated with complications in postoperative Crohns disease patients.

Methods

Study subjects and demographics

As previously described, the "Nancy IBD cohort" is a large monocentric observational cohort of IBD patients with detailed clinical information on 1173 patients with IBD (857 CD, 316 ulcerative colitis) (87). Patients were followed prospectively according to standard of care. Information about the Nancy IBD cohort is reported to the Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés, France (no. 1404720), which supervises the implementation of the act regarding data processing, data files, and individual liberties that came into effect on January 6th 1978, and was amended on August 6th 2004 to protect the personal data of individuals.

The diagnosis of CD in these patients was based on histological criteria. Clinical information that was collected included; age at diagnosis; gender; disease duration; disease location and behaviour (according to the Montreal classification (30)); extra-intestinal manifestations; smoking status; and date, type and indication of surgery. Smoking status was defined as 'non-smoker' or 'current smoker' at the time of surgery. The primary outcome was the occurrence of postoperative complications, including PIIC-related (abscesses, anastomotic leakage and enterocutaneous fistula) and non-PIIC-related (pulmonary embolism, postoperative ileus, pulmonary infections and wound infections).

Genotyping

All patients were identified from the Nancy IBD Cohort and signed a consent form for genetic analysis. Genomic DNA was isolated from blood samples taken from patients with CD who had a surgical resection. Genotyping was performed using the SNPlex technology (SNPlex® Applied

Biosystems, Foster City, CA) which is based on the Oligonucleotide Ligation Assay combined with multiplex PCR amplification. SNPs with more than 10% of missing data were removed. In total 203 CD-associated SNPs identified from previous studies were analyzed (Annexe 4).

Genotype assignment was performed by capillary electrophoresis analysis using an ABI 3730xl DNA Analyzer and ABI GeneMapper® v3.7 software. Genotyping was considered to be sufficient if the overall success rate for the SNP was greater than 80% and the Hardy–Weinberg equilibrium did not deviate significantly from the expected distribution ($p > 0.05$ for Chi2-test between expected and actual values).

Statistical analysis

Continuous variables were summarized using means and standard deviations. Polymorphisms were tested for the Hardy–Weinberg equilibrium before using the Fisher exact test to compare allelic and genotype frequencies.

As a quality control step, the dataset was filtered to exclude SNPs with a Hardy–Weinberg $p< 0.001$ and a call rate greater than 95%. Individuals with less than 80% genotyping were excluded. Categorical variables were expressed as proportions. The Student t-test was used to compare continuous variables while the chi-square test (or Fisher exact test) was used for categorical variables. Variables reaching a p-value of ≤ 0.10 in the univariate analysis were entered into the multivariate analysis where a p-value < 0.05 indicated independent statistical significance. To analyze the effects of potential confounding factors on the main association, we performed a stratified analysis using estimated ORs with 99% confidence intervals; Mantel-Haenszel adjusted ORs and the Mantel-Haenszel chi-square test. Statistical analysis was performed using Stata statistical software version 12.1 for Mac (StataCorp©, Texas 77845, USA).

Results

Study population

In this study one hundred and thirty-seven patients (48.9%) of the Nancy IBD cohort required a CD-related bowel resection and were included in the analysis. Mean age at diagnosis was 23 years (range: 3-82 years), with a mean of disease duration of 5 years (range: 0 – 32 years). In this cohort of 137 patients, 82 patients were males (59%). Regarding disease location, seventy patients (51%) had ileitis, 25 (18%) had colitis, and 42 (31%) had ileo-colonic disease and eight patients (3%) had upper gastrointestinal involvement. Regarding disease behaviour, twenty-six patients (19%) had purely inflammatory disease, 71 (52%) had stricturing disease, and 40 (29%) had penetrating disease according to the Montreal classification. The primary indication for surgery was refractory to medications in 17 patients (12%), stricturing in 67 patients (49%), and penetrating disease in 53 patients (39%) (Figure 12). The mean duration of follow-up was 13.5 years (range 0 – 34 years).

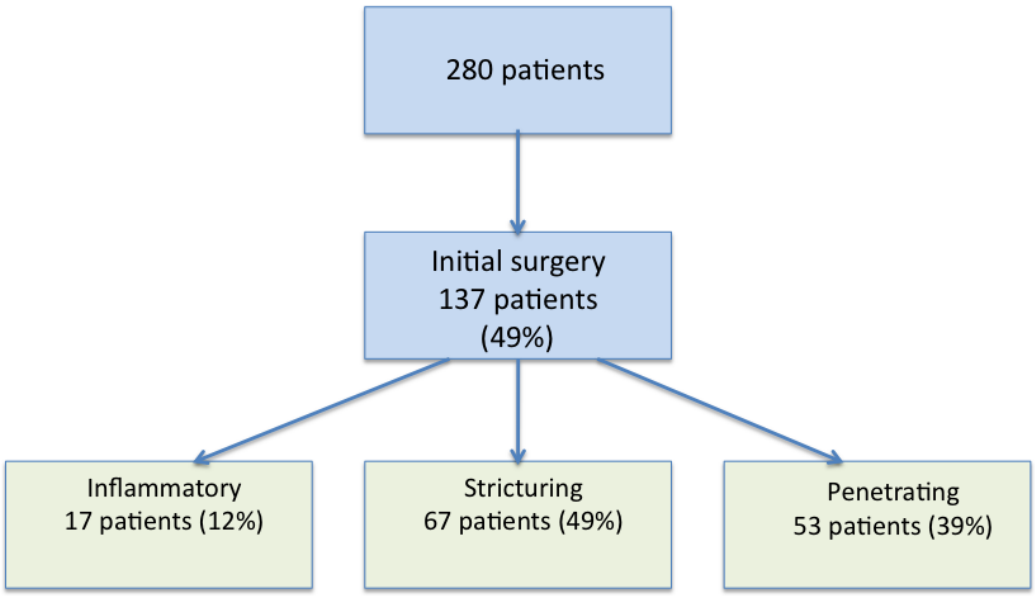


Figure 12 - Indications for first surgery.

Regarding surgical procedures, ileocaecal resection was performed in 78 patients (57%), small bowel resection in 12 patients (8.8%), colonic resection in 40 patients (29.2%), both small bowel and colonic resections in 5 patients (3.6%), and a defunctioning loop stoma in 2 patients (1.4%).

Post operative complications - (intra-abdominal infectious - and non-intra-abdominal infectious complications)

Of the 137 CD patients requiring an initial surgical operation, 34 patients (24.8%) experienced post-operative complications. There were no deaths reported in this group. Post-operative intra-abdominal infectious complications (PIIC) were observed in a total of 18 patients (13.1%): of these 7 patients had an intra-abdominal abscess (5.1%), of whom 4 had percutaneous drainage or

repeat operation; 11 patients had an anastomotic leakage (8%), 4 patients experienced peritonitis requiring surgery and a temporary stoma. Non intra-abdominal infectious complications (Non-PIIC) were observed in 16 patients (11.7%): including wound infections in 7 patients, paralytic ileus in 5 patients, pulmonary embolism in 2 patients and pulmonary infection in 2 patients. Clinical characteristics of CD patients according to overall post-operative complications are shown in Table 10.

	No post-operative complications (n=103)	Post-operative complications (n=34)	p-value
Male gender	62 (60.2%)	20 (58.8%)	0.88
Mean age at diagnosis (years +/- SD, range)	22.8 (+/- 12.7)	21.9 (+/- 10.2)	0.39
Mean preoperative disease duration (years +/- SD, range)	5.3 (+/- 6.5)	4.4 (+/- 5.2)	0.70
Location (n, (%))			0.48
Ileal	52 (50.5%)	18 (53%)	
Colonic	17 (16.5%)	8 (23.5%)	
Ileocolonic	34 (33.0%)	8 (23.5%)	
Behavior (n, (%))			0.86
Inflammatory	20 (19.4%)	6 (17.6%)	
Stricturing	52 (50.5%)	19 (55.0%)	
Penetrating	31 (30.1%)	9 (26.4%)	
Perianal	47 (45.6%)	17 (50%)	0.66
Current smoker (n, (%))	38 (36.9%)	20 (58.8%)	0.02
Type of surgery (n, (%))			0.90
Ileocaecal resection	60 (58.2%)	18 (52.9%)	
Small bowel resection	9 (8.7%)	3 (8.8%)	
Colonic resection	29 (28.2%)	11 (32.3%)	
Small bowell and colic resection	4 (3.9%)	1 (2.9%)	
Defunctioning loop stoma	1 (1%)	1 (2.9%)	

Table 10 Clinical characteristics of CD patients according to post-operative complications.

Genetic factors associated with post-operative complications

On univariate analysis, current smoker status (p=0.02) and Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2 (NOD2) (rs5743289) homozygosity for the risk allele (p=0.01) were significantly associated with the occurrence of overall post-operative complications. No other clinical or genetic factors were associated with post-operative complications.

All variables reaching a p value of ≤0.10 in the univariate analysis were entered into the multivariate analysis. On multivariate analysis, current smoker status (OR 2.71, 95% CI 1.18-6.21, p = 0.02) and NOD2 (rs5743289) homozygosity for the risk allele (OR 2.07, 95% CI 1.15-3.72, p = 0.01) were independently associated with the development of post-operative complications. In our population, NOD2 allele frequency distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium (Table 11).

SNP	Wild type allele (homozygote)	Heterozygote	Risk allele (homozygote)	Minor allele frequency	p*
NOD2 (rs5743289)	61 (CC)	59 (CT)	18 (TT)	0.34	0.4

*Pearson's chi-squared test for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium

Table 11 NOD2 allele frequency distribution.

When PIIC were considered alone, there was an independent association with smoking status (OR 4.27, 95% CI 1.42-12.79, p=0.009) and NOD2 (rs5743289) homozygosity for the risk allele (OR 2.13, 95% CI 1.05-4.33, p=0.03) (figure 13). When non-PIIC were considered alone, there was no association with any of the clinical and genetic variables.

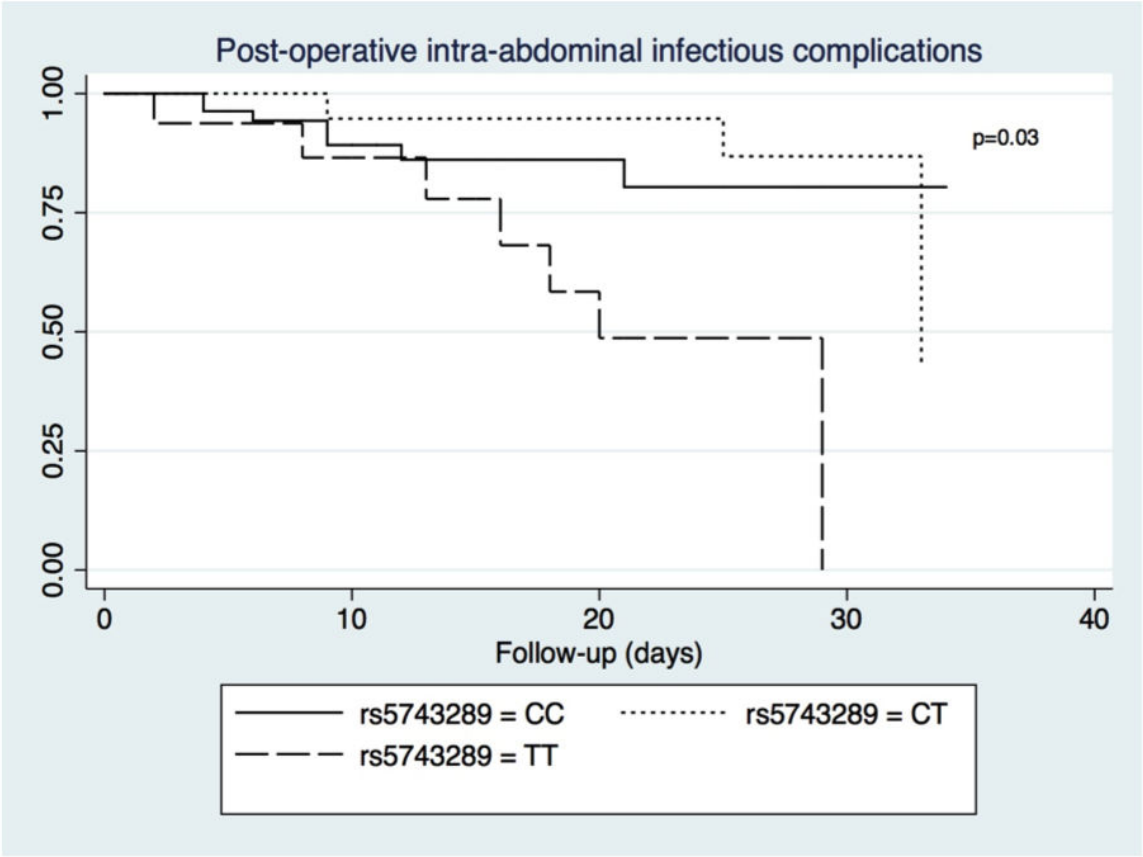


Figure 13 Kaplan Meier curve for post-operative intra-abdominal infectious complications according to *NOD2* genotype.

The stratified analysis demonstrated that smoking status did not appear to modify the effect or confound the association between the studied polymorphisms and PIIC (ORs 2.05 in the non-smokers and 2.08 in the smokers group).

Discussion

Numerous studies have focused on the identification of genetic determinants on CD progression, but no previous study has focused on the impact of genetic factors on the risk of post-operative intra-abdominal infectious complications (PIIC). A correlation between specific genotypes and clinical phenotypes may permit more accurate pre-operative risk stratification in CD patients by identifying patients at high risk of PIIC. This may lead to the development of predictive gene signatures that could possibly be used to predict PIIC and thus aid in preoperative surgical decision making.

In our series, in total the PIIC rate (13%) is similar to that previously reported (10,86,88,109). Smoking is known to be associated with a high rate of morbidity after all types of colorectal surgery (147), but the mechanism of smoking on postoperative complications after colorectal surgery has not been well defined. Smoking status maybe a potential confounding factor in studies in patients with CD, this is the reason why we stratified our analysis by smoking status. There was a significant difference in terms of PIIC rate between smokers and non-smokers (p=0.02). This study demonstrated that smokers undergoing a bowel resection had an estimated increased risk of developing PIIC three times higher than non-smoking patients. The association between NOD2 polymorphism and rates of PIIC still remained statistically significant, independent from the smoking status of the patient.

The role of genetics factors in post-operative complications in CD surgery is unknown. The NOD2 gene on chromosome 16 was first reported to be associated with CD in 2001 (17,18). NOD2 mutations have been described in 40% of European CD patients. NOD2 encodes a protein functioning as a general sensor of both Gram-negative and Gram-positive peptidoglycans (148). Moreover, activation of this protein leads to an increase in Nuclear Factor kB (NK-kB) and Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) signaling pathways, which play roles in the

inflammatory and immune response by regulating genes involved in producing several pro-inflammatory cytokines such as Interleukin- 6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) (149).

This study is the first to report the association of the NOD2 gene with the risk of PIIC in CD. We demonstrated that NOD2 (rs5743289) homozygosity for the risk allele was an independent risk factor in the development of PIIC (p=0.03). A possible mechanism to explain the association between NOD2 variants and a higher rate of PIIC may be related to an altered regulation of the inflammatory response in patients carrying these gene variants. This alteration may contribute to abnormal repair at the site of surgical intervention and consequently to PIIC, irrespective of the type of surgery. Henckaerts et al, have reported that the presence of at least one NOD2 polymorphism is associated with a higher risk of bacteremia and a poor outcome in critical ill patients in an intensive care unit (68). Bruns et al, have reported that NOD2 variants increase the risk for culture-positive ascitic fluid infections in cirrhosis and may affect survival (69). These results suggest an excessive permeability of the intestinal wall in cases of NOD2 polymorphisms; this phenomenon may explain a higher risk of PIIC in this CD surgical population. Thus patients carrying a NOD2 polymorphism may have a defect in their innate immunity and their intestinal barrier function with a subsequent higher risk for bacterial translocation. These mechanisms may explain why, in contrast, NOD2 polymorphism was not associated with non-infectious post-operative complications.

This is the first series that has reported the influence of 203 CD-associated SNPs on post-operative complications in CD surgery, in a well-defined IBD cohort with a mean follow-up of 13.5 years. One important bias of our studies is a relatively small sample size and the absence of a replication cohort. This study has suggested an association between PIIC in adult CD patients and NOD2 (rs5743289). In 2013, Jakobsen et al. also found an association between CD and NOD2 (rs5743289) (OR = 1.4 [1.1–1.9], p = 0.009) in a pediatric cohort (150).

CD medical therapies are known to influence the risk of post-operative complications in surgery in CD. Unfortunately, due to the retrospective study design, it was not possible to account for the effects of IBD-related medications. Indeed, variables such as the type of medication, time of medication use, and effect of medications on CD course, were not found in all medical records. Further prospective studies which include all medication use prior to surgery and post-operatively may answer this important question.

In conclusion, we identified an independent association between NOD2 risk allele and increased risk of post-operative intra-abdominal infectious complications (PIIC) in CD. In addition, we identified current smoker status as a main clinical predictor for PIIC in CD surgery. The identification of NOD2 as a risk allele for PIIC in CD is of particular interest as it may allow for early risk stratification of high-risk patients in whom surgery would be carefully managed and planned and predict patients at higher risk of post-operative complications.

Discussion générale et perspectives

Les MICI font partie de ces maladies complexes. Actuellement, aucun traitement curatif, qu'il soit médical ou chirurgical n'est disponible. En cas de forme compliquée ou réfractaire au traitement médical de MC, la chirurgie reste l'option à privilégier. Bien qu'une nette amélioration clinique soit mise en évidence à l'issue de la chirurgie, le taux de récidive chirurgicale est de l'ordre de 25 à 60% à 10 ans, incitant à rechercher les facteurs déterminant la RPO. D'autre part, la chirurgie comporte ses propres risques de complications et la détermination d'éléments prédictifs de celles-ci permettraient d'adapter la prise en charge de la MC à chaque individu.

Ce travail s'est donc orienté vers 2 aspects de la MC susceptibles d'être influencés par des facteurs génétiques :

- la survenue d'une RPO,
- la prédisposition à la survenue de complications post-opératoires.

Les études réalisées nous ont permis d'apporter de nouvelles informations dans ces domaines.

L'effet du traitement immunosuppresseur sur l'infection de site opératoire après une résection pour maladie de Crohn

Le risque de survenue de CIIP est variable d'un patient à un autre. Les conditions pré-opératoires influencent en grande partie le risque de CIIP. Il a été clairement établi que les thiopurines n'augmentent pas ce risque. Devant l'utilisation de plus en plus fréquente des anti-TNF alpha, il était important d'évaluer le risque spécifique de CIIP en fonction de leur utilisation en pré-opératoire. Nous avons mis en évidence, une augmentation du risque de CIIP en cas de prise combinée de corticoïdes et d'anti-TNF alpha. Se pose la question de la durée d'arrêt nécessaire de ces traitements par rapport à l'intervention chirurgicale qui permettrait de diminuer ce sur-risque. Nous avons étudié le risque de CIIP après 8 semaines d'arrêt de traitement et après 12 semaines d'arrêt de traitement et nous n'avons pas constaté de diminution significative du taux de CIIP. La réalisation d'une étude prospective randomisée semble être nécessaire pour pouvoir répondre entièrement à cette question. Le caractère rétrospectif de cette étude est à l'origine d'une absence d'exhaustivité des données recueillies notamment en terme d'activité et de sévérité de la MC.

Afin de pouvoir établir un arbre de décision objectif, il reste à déterminer de façon précise le délai nécessaire d'arrêt de prise de traitement par anti-TNF alpha avant la chirurgie pour rejoindre le risque de CIIP d'une population de MC non exposée à ces traitements. Cela permettrait de réaliser une médecine personnalisée en adaptant les critères de rétablissement de la continuité digestive à chaque patient.

Un variant génétique de *CARD8* est un facteur de risque de récidive chirurgicale de la maladie de Crohn

L'histoire post-opératoire de la MC est variable d'un patient à un autre, et est difficilement prévisible au moment du diagnostic. Idéalement, une corrélation entre génotype et phénotype clinique permettrait une classification plus précise des patients atteints d'une MICI, au-delà du type et de la localisation de la maladie inflammatoire. Par exemple, certains profils génétiques permettraient d'identifier les patients à haut risque de risque de RPO. Ces informations aideraient les cliniciens et les patients à établir des stratégies adaptées à l'individu concernant le traitement à instaurer au moment du diagnostic et/ou en post-opératoire immédiat. La recherche d'association avec la récidive chirurgicale pour des polymorphismes de gènes déjà confirmés dans d'autres populations a permis d'établir, dans notre cohorte, une association entre l'allèle à risque de *CARD8* (rs2043211) et le risque de récidive chirurgicale.

Le gène caspase recruitment domain-containing protein 8 (CARD8), qui est aussi appelé tumor-upregulated CARD-containing antagonist of caspase 9 (TUCAN), est situé sur la région de liaison IBD6 sur le chromosome 19, et est exprimé fortement dans les monocytes et l'épithélium intestinal. Le gène CARD8 représente un nouveau membre de la famille CARD qui supprime électivement l'activation de NF-kappaB et l'apoptose induite par l'activation de caspase . CARD8 est un composant de l'immunité innée et entraine la suppression de la réponse immunitaire et des activités inflammatoires. Le SNP rs2043211 sur l'exon 5 du gène CARD8 possède un changement d'un résidu cystéine sur le codon 10 en codon stop. Il y a régulièrement des données conflictuelles dans la littérature sur l'association entre le rs2043211 et les MICI. Ce SNP a déjà été décrit comme associé aux MICI (146), alors que d'autres séries n'ont pas retrouvé d'association entre CARD8 et MICI (145,151,152). L'association semble être population-dépendante. Une étude combinée de patients atteints d'une MICI allemands et norvégiens n'a pas retrouvé d'association

entre le rs2043211 et la MC ou la RCH (145), une autre étude basée sur 3 cohortes indépendantes européennes a montré que le rs20143211 n'est pas lié à une prédisposition aux MICI (151) ; alors qu'une étude récente coréenne a montré que le rs2043211 était significativement associé à la RCH (153). Une méta-analyse récente a montré que le génotype dominant AA + AT et le génotype homozygote AA de CARD8 (rs2043211) pourrait être associé à la MC et cette association semble être population-dépendante (154). Cependant, le mécanisme exact de l'influence du polymorphisme de CARD8 sur la susceptibilité aux MICI reste à déterminer. Des études réalisées sur des cohortes plus importantes et des études cas-témoins réalisées sur des populations différentes vont devoir être conduites afin d'étudier les mécanismes exacts.

Nous n'avons identifié aucune autre étude sur le rôle de CARD8 dans la récidive chirurgicale et très peu d'études se sont intéressées à l'identification des déterminants génétiques de la récidive chirurgicale. Ceci est probablement dû à la difficulté de réaliser ce type de travail car il s'intéresse à un sous-groupe de patients (patients ayant bénéficié d'au moins 2 résections intestinales), ce qui diminue considérablement le nombre de sujets à étudier et donc la puissance des tests statistiques, et d'autre part, cela impose un suivi à très long terme des patients génotypes. En effet dans notre étude, la durée moyenne de suivi est de 13,5 ans. Le même travail pourrait être réalisé sur les patients présentant une récidive endoscopique, ce qui augmenterait le nombre de patients à étudier, cependant nous n'avons pas à notre disposition les données de suivi endoscopique pour l'ensemble des patients de la cohorte.

Nous aurions souhaité étudier également l'influence des traitements médicamenteux sur la récidive chirurgicale, mais en raison de données manquantes, nous n'avons pu étudier cette donnée. Des études réalisées sur des populations plus importantes et provenant d'origine différentes vont devoir être réalisées afin de confirmer l'influence du polymorphisme de CARD8 sur la récidive chirurgicale.

Un variant génétique de *NOD2* est un facteur de risque de complication post-opératoire de la maladie de Crohn

La gestion et l'anticipation des complications post-opératoires sont un élément essentiel de la prise en charge chirurgicale de la MC. La survenue de CIIP est un élément capital dans l'histoire du patient avec un impact sur sa qualité de vie.

Actuellement, seuls des facteurs de risque cliniques sont établis et pris en compte dans le raisonnement chirurgical et notamment dans la décision de rétablir ou non dans le même temps la continuité digestive. Ces facteurs de risque sont le tabagisme actif, la présence d'un abcès, la dénutrition, la prise au long cours de corticoïdes, la chirurgie en urgence. Lorsqu'au moins 3 de ces facteurs sont présents, il est recommandé de réaliser une stomie temporaire (10,86,144). Cependant, la stomie ne rend pas le risque de CIIP nul chez ces patients, laissant imaginer que des facteurs de risque non cliniques et notamment génétiques doivent être pris en compte.

Partant de cela, nous avons décidé de mener une analyse d'association génétique afin de déterminer si il existait un polymorphisme génétique prédictif de la survenue de CIIP dans la chirurgie de la MC. La recherche d'association avec les complications post-opératoires pour des polymorphismes de gènes déjà confirmés dans d'autres populations a permis d'établir, dans notre cohorte, une association entre l'allèle à risque de *NOD2* (rs5743289) et le risque de CIIP.

Nous n'avons retrouvé dans la littérature aucune étude à propos du rôle des facteurs génétiques dans la survenue des CIIP au décours de la chirurgie de la MC. Actuellement leur rôle dans la survenue de ces complications est inconnu. Un des mécanismes qui pourraient expliquer nos résultats serait un déficit de l'immunité innée et de la fonction de la barrière intestinale chez les patients présentant un polymorphisme de NOD2 avec pour conséquence une augmentation du

risque de translocation bactérienne. Ces mécanismes pourraient expliquer pourquoi, au contraire, le polymorphisme de NOD2 n'était pas associé avec une augmentation des complications non intra-abdominales dans notre étude.

Conclusion

La MC, comme d'autres pathologies complexes, est aujourd'hui le sujet de très nombreuses recherches génétiques. Les progrès récents en génétique et bioinformatique ont permis des avancées significatives ces dernières années. Cependant, les retombées cliniques de ces recherches restent à l'heure actuelle limitée, ne permettant pas leur utilisation en pratique courante. Il va donc être nécessaire de confirmer ces résultats au sein de cohorte de réplication puis de les intégrer au sein de modèles prédictifs tenant compte des facteurs génétiques et environnementaux. Actuellement, la faisabilité et le coût par rapport au bénéfice d'un screening multigénique des patients à risque n'est pas possible mais devrait l'être dans les années à venir. Cela permettra de proposer, soit un suivi adapté, soit des mesures de médecine préventive aux sujets porteurs d'allèles de prédisposition. L'objectif actuel est de faire ces mêmes analyses d'association génétique sur des cohortes de réplication afin de valider nos résultats et espérer qu'ils puissent être bénéfiques pour les patients atteints par la MC dans les années à venir.

Références

1. Kappelman MD, Rifas-Shiman SL, Kleinman K, Ollendorf D, Bousvaros A, Grand RJ, et al. The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States. Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc. 2007 Dec;5(12):1424–9.

2. Loftus CG, Loftus EV, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Tremaine WJ, Melton LJ, et al. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. Inflamm Bowel Dis. 2007 Mar;13(3):254–61.

3. Sonnenberg A, Chang J. Time trends of physician visits for Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States, 1960-2006. Inflamm Bowel Dis. 2008 Feb;14(2):249–52.

4. Nguyen GC, Tuskey A, Dassopoulos T, Harris ML, Brant SR. Rising hospitalization rates for inflammatory bowel disease in the United States between 1998 and 2004. Inflamm Bowel Dis. 2007 Dec;13(12):1529–35.

5. Bernstein CN, Nabalamba A. Hospitalization, surgery, and readmission rates of IBD in Canada: a population-based study. Am J Gastroenterol. 2006 Jan;101(1):110–8.

6. Faubion WA, Loftus EV, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. Gastroenterology. 2001 Aug;121(2):255–60.

7. Peyrin-Biroulet L, Cieza A, Sandborn WJ, Coenen M, Chowers Y, Hibi T, et al. Development of the first disability index for inflammatory bowel disease based on the international classification of functioning, disability and health. Gut. 2012 Feb;61(2):241–7.

8. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. Gastroenterology. 2011 May;140(6):1785–94.

9. Peyrin-Biroulet L, Loftus EV, Colombel J-F, Sandborn WJ. Long-term complications, extraintestinal manifestations, and mortality in adult Crohn's disease in population-based cohorts. Inflamm Bowel Dis. 2011 Jan;17(1):471–8.

10. Yamamoto T, Allan RN, Keighley MR. Risk factors for intra-abdominal sepsis after surgery in Crohn's disease. Dis Colon Rectum. 2000 Aug;43(8):1141–5.

11. Billioud V, Ford AC, Tedesco ED, Colombel J-F, Roblin X, Peyrin-Biroulet L. Preoperative use of anti-TNF therapy and postoperative complications in inflammatory bowel diseases: a meta-analysis. J Crohns Colitis. 2013 Dec;7(11):853–67.

12. Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Beyls J, Kerremans R, Hiele M. Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. Gastroenterology. 1990 Oct;99(4):956–63.

13. Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Kerremans R, Coenegrachts JL, Coremans G. Natural history of recurrent Crohn's disease at the ileocolonic anastomosis after curative surgery. Gut. 1984 Jun;25(6):665–72.

14. Buisson A, Chevaux J-B, Allen PB, Bommelaer G, Peyrin-Biroulet L. Review article: the natural history of postoperative Crohn's disease recurrence. Aliment Pharmacol Ther. 2012 Mar;35(6):625–33.

15. Michelassi F, Balestracci T, Chappell R, Block GE. Primary and recurrent Crohn's disease. Experience with 1379 patients. Ann Surg. 1991 Sep;214(3):230–8; discussion 238–40.

16. Trnka YM, Glotzer DJ, Kasdon EJ, Goldman H, Steer ML, Goldman LD. The long-term outcome of restorative operation in Crohn's disease: influence of location, prognostic factors and surgical guidelines. Ann Surg. 1982 Sep;196(3):345–55.

17. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature. 2001 May 31;411(6837):599–603.

18. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. Nature. 2001 May 31;411(6837):603–6.

19. Ng SC, Bernstein CN, Vatn MH, Lakatos PL, Loftus EV, Tysk C, et al. Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. Gut. 2013 Apr;62(4):630–49.

20. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. Gastroenterology. 2012 Jan;142(1):46–54.e42; quiz e30.

21. Gower-Rousseau C, Vasseur F, Fumery M, Savoye G, Salleron J, Dauchet L, et al. Epidemiology of inflammatory bowel diseases: new insights from a French population-based registry (EPIMAD). Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver. 2013 Feb;45(2):89–94.

22. Thia KT, Sandborn WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Loftus EV. Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort. Gastroenterology. 2010 Oct;139(4):1147–55.

23. Schwartz DA, Loftus EV, Tremaine WJ, Panaccione R, Harmsen WS, Zinsmeister AR, et al. The natural history of fistulizing Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota. Gastroenterology. 2002 Apr;122(4):875–80.

24. Lapidus A. Crohn's disease in Stockholm County during 1990-2001: an epidemiological update. World J Gastroenterol WJG. 2006 Jan 7;12(1):75–81.

25. Jess T, Gamborg M, Matzen P, Munkholm P, Sørensen TIA. Increased risk of intestinal cancer in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based cohort studies. Am J Gastroenterol. 2005 Dec;100(12):2724–9.

26. Jess T, Riis L, Vind I, Winther KV, Borg S, Binder V, et al. Changes in clinical characteristics, course, and prognosis of inflammatory bowel disease during the last 5 decades: a population-based study from Copenhagen, Denmark. Inflamm Bowel Dis. 2007 Apr;13(4):481–9.

27. Von Roon AC, Reese G, Teare J, Constantinides V, Darzi AW, Tekkis PP. The risk of cancer in patients with Crohn's disease. Dis Colon Rectum. 2007 Jun;50(6):839–55.

28. Canavan C, Abrams KR, Mayberry JF. Meta-analysis: mortality in Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther. 2007 Apr 15;25(8):861–70.

29. Duricova D, Pedersen N, Elkjaer M, Gamborg M, Munkholm P, Jess T. Overall and cause-specific mortality in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based studies. Inflamm Bowel Dis. 2010 Feb;16(2):347–53.

30. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott IDR, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. Can J Gastroenterol J Can Gastroenterol. 2005 Sep;19 Suppl A:5A – 36A.

31. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. Annu Rev Immunol. 2010;28:573–621.

32. Russel MG, Volovics A, Schoon EJ, van Wijlick EH, Logan RF, Shivananda S, et al. Inflammatory bowel disease: is there any relation between smoking status and disease presentation? European Collaborative IBD Study Group. Inflamm Bowel Dis. 1998 Aug;4(3):182–6.

33. Cosnes J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2004 Jun;18(3):481–96.

34. Cosnes J. What is the link between the use of tobacco and IBD? Inflamm Bowel Dis. 2008 Oct;14 Suppl 2:S14–5.

35. Cosnes J, Carbonnel F, Carrat F, Beaugerie L, Cattan S, Gendre J. Effects of current and former cigarette smoking on the clinical course of Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther. 1999 Nov;13(11):1403–11.

36. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. Mayo Clin Proc. 2006 Nov;81(11):1462–71.

37. Bergeron V, Grondin V, Rajca S, Maubert M-A, Pigneur B, Thomas G, et al. Current smoking differentially affects blood mononuclear cells from patients with Crohn's disease and ulcerative colitis: relevance to its adverse role in the disease. Inflamm Bowel Dis. 2012 Jun;18(6):1101–11.

38. Kaplan GG, Jackson T, Sands BE, Frisch M, Andersson RE, Korzenik J. The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a meta-analysis. Am J Gastroenterol. 2008 Nov;103(11):2925–31.

39. García Rodríguez LA, González-Pérez A, Johansson S, Wallander M-A. Risk factors for inflammatory bowel disease in the general population. Aliment Pharmacol Ther. 2005 Aug 15;22(4):309–15.

40. Klement E, Lysy J, Hoshen M, Avitan M, Goldin E, Israeli E. Childhood hygiene is associated with the risk for inflammatory bowel disease: a population-based study. Am J Gastroenterol. 2008 Jul;103(7):1775–82.

41. Amre DK, D'Souza S, Morgan K, Seidman G, Lambrette P, Grimard G, et al. Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's disease in children. Am J Gastroenterol. 2007 Sep;102(9):2016–25.

42. Hou JK, Abraham B, El-Serag H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. Am J Gastroenterol. 2011 Apr;106(4):563–73.

43. Lesage S, Zouali H, Cézard J-P, Colombel J-F, Belaiche J, Almer S, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. Am J Hum Genet. 2002 Apr;70(4):845–57.

44. Rosenstiel P, Fantini M, Bräutigam K, Kühbacher T, Waetzig GH, Seegert D, et al. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. Gastroenterology. 2003 Apr;124(4):1001–9.

45. Pierik M, Joossens S, Van Steen K, Van Schuerbeek N, Vlietinck R, Rutgeerts P, et al. Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. Inflamm Bowel Dis. 2006 Jan;12(1):1–8.

46. Wehkamp J, Schmid M, Fellermann K, Stange EF. Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease. J Leukoc Biol. 2005 Apr;77(4):460–5.

47. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature. 2007 Jul 26;448(7152):427–34.

48. Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. Annu Rev Immunol. 2007;25:221–42.

49. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. Nat Genet. 2008 Aug;40(8):955–62.

50. Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. J Clin Invest. 2006 May;116(5):1310–6.

51. Orholm M, Binder V, Sørensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. Scand J Gastroenterol. 2000 Oct;35(10):1075–81.

52. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. BMJ. 1996 Jan 13;312(7023):95–6.

53. Russel MG, Pastoor CJ, Janssen KM, van Deursen CT, Muris JW, van Wijlick EH, et al. Familial aggregation of inflammatory bowel disease: a population-based study in South Limburg, The Netherlands. The South Limburg IBD Study Group. Scand J Gastroenterol Suppl. 1997;223:88–91.

54. Monsén U, Bernell O, Johansson C, Hellers G. Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with Crohn's disease. Scand J Gastroenterol. 1991 Mar;26(3):302–6.

55. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. Nature. 2012 Nov 1;491(7422):119–24.

56. Franke A, McGovern DPB, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. Nat Genet. 2010 Dec;42(12):1118–25.

57. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nuñez G, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. Science. 2005 Feb 4;307(5710):731–4.

58. Abraham C, Cho JH. Functional consequences of NOD2 (CARD15) mutations. Inflamm Bowel Dis. 2006 Jul;12(7):641–50.

59. Yamamoto-Furusho JK, Barnich N, Xavier R, Hisamatsu T, Podolsky DK. Centaurin beta1 down-regulates nucleotide-binding oligomerization domains 1- and 2-dependent NF-kappaB activation. J Biol Chem. 2006 Nov 24;281(47):36060–70.

60. Peyrin-Biroulet L, Vignal C, Dessein R, Simonet M, Desreumaux P, Chamaillard M. NODs in defence: from vulnerable antimicrobial peptides to chronic inflammation. Trends Microbiol. 2006 Oct;14(10):432–8.

61. Naser SA, Arce M, Khaja A, Fernandez M, Naser N, Elwasila S, et al. Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis. World J Gastroenterol WJG. 2012 Feb 7;18(5):412–24.

62. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. Nat Genet. 2007 May;39(5):596–604.

63. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. Nat Genet. 2007 Jul;39(7):830–2.

64. Singh SB, Davis AS, Taylor GA, Deretic V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. Science. 2006 Sep 8;313(5792):1438–41.

65. Plowey ED, Cherra SJ, Liu Y-J, Chu CT. Role of autophagy in G2019S-LRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells. J Neurochem. 2008 May;105(3):1048–56.

66. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. Science. 2006 Dec 1;314(5804):1461–3.

67. Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, et al. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. J Immunol Baltim Md 1950. 2002 Jun 1;168(11):5699–708.

68. Henckaerts L, Nielsen KR, Steffensen R, Van Steen K, Mathieu C, Giulietti A, et al. Polymorphisms in innate immunity genes predispose to bacteremia and death in the medical intensive care unit. Crit Care Med. 2009 Jan;37(1):192–201, e1–3.

69. Bruns T, Peter J, Reuken PA, Grabe DH, Schuldes SR, Brenmoehl J, et al. NOD2 gene variants are a risk factor for culture-positive spontaneous bacterial peritonitis and monomicrobial bacterascites in cirrhosis. Liver Int Off J Int Assoc Study Liver. 2012 Feb;32(2):223–30.

70. Cosnes J, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Afchain P, Tiret E, Gendre J-P. Impact of the increasing use of immunosuppressants in Crohn's disease on the need for intestinal surgery. Gut. 2005 Feb;54(2):237–41.

71. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. J Crohns Colitis. 2010 Feb;4(1):28–62.

72. Fazio VW, Marchetti F, Church M, Goldblum JR, Lavery C, Hull TL, et al. Effect of resection margins on the recurrence of Crohn's disease in the small bowel. A randomized controlled trial. Ann Surg. 1996 Oct;224(4):563–71; discussion 571–3.

73. Van Assche G, Dignass A, Reinisch W, van der Woude CJ, Sturm A, De Vos M, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Special situations. J Crohns Colitis. 2010 Feb;4(1):63–101.

74. Yamamoto T, Fazio VW, Tekkis PP. Safety and efficacy of strictureplasty for Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. Dis Colon Rectum. 2007 Nov;50(11):1968–86.

75. Caprilli R, Gassull MA, Escher JC, Moser G, Munkholm P, Forbes A, et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: special situations. Gut. 2006 Mar;55 Suppl 1:i36–58.

76. Young-Fadok TM, Wolff BG, Meagher A, Benn PL, Dozois RR. Surgical management of ileosigmoid fistulas in Crohn's disease. Dis Colon Rectum. 1997 May;40(5):558–61.

77. Solem CA, Loftus EV, Tremaine WJ, Pemberton JH, Wolff BG, Sandborn WJ. Fistulas to the urinary system in Crohn's disease: clinical features and outcomes. Am J Gastroenterol. 2002 Sep;97(9):2300–5.

78. Kiran RP, Nisar PJ, Church JM, Fazio VW. The role of primary surgical procedure in maintaining intestinal continuity for patients with Crohn's colitis. Ann Surg. 2011 Jun;253(6):1130–5.

79. Tekkis PP, Purkayastha S, Lanitis S, Athanasiou T, Heriot AG, Orchard TR, et al. A comparison of segmental vs subtotal/total colectomy for colonic Crohn's disease: a meta-analysis. Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel. 2006 Feb;8(2):82–90.

80. Panis Y, Poupard B, Nemeth J, Lavergne A, Hautefeuille P, Valleur P. Ileal pouch/anal anastomosis for Crohn's disease. Lancet Lond Engl. 1996 Mar 30;347(9005):854–7.

81. Prudhomme M, Dehni N, Dozois RR, Tiret E, Parc R. Causes and outcomes of pouch excision after restorative proctocolectomy. Br J Surg. 2006 Jan;93(1):82–6.

82. Regimbeau JM, Panis Y, Pocard M, Bouhnik Y, Lavergne-Slove A, Rufat P, et al. Long-term results of ileal pouch-anal anastomosis for colorectal Crohn's disease. Dis Colon Rectum. 2001 Jun;44(6):769–78.

83. Reese GE, Lovegrove RE, Tilney HS, Yamamoto T, Heriot AG, Fazio VW, et al. The effect of Crohn's disease on outcomes after restorative proctocolectomy. Dis Colon Rectum. 2007 Feb;50(2):239–50.

84. De Oca J, Sánchez-Santos R, Ragué JM, Biondo S, Parés D, Osorio A, et al. Long-term results of ileal pouch-anal anastomosis in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 2003 May;9(3):171–5.

85. Champault A, Benoist S, Alvès A, Panis Y. [Surgical therapy for Crohn's disease of the colon and rectum]. Gastroentérologie Clin Biol. 2004 Oct;28(10 Pt 1):882–92.

86. Alves A, Panis Y, Bouhnik Y, Pocard M, Vicaut E, Valleur P. Risk factors for intra-abdominal septic complications after a first ileocecal resection for Crohn's disease: a multivariate analysis in 161 consecutive patients. Dis Colon Rectum. 2007 Mar;50(3):331–6.

87. Peyrin-Biroulet L, Oussalah A, Williet N, Pillot C, Bresler L, Bigard M-A. Impact of azathioprine and tumour necrosis factor antagonists on the need for surgery in newly diagnosed Crohn's disease. Gut. 2011 Jul;60(7):930–6.

88. Post S, Betzler M, von Ditfurth B, Schürmann G, Küppers P, Herfarth C. Risks of intestinal anastomoses in Crohn's disease. Ann Surg. 1991 Jan;213(1):37–42.

89. Bouguen G, Peyrin-Biroulet L. Surgery for adult Crohn's disease: what is the actual risk? Gut. 2011 Sep;60(9):1178–81.

90. Yang Z, Wu Q, Wu K, Fan D. Meta-analysis: pre-operative infliximab treatment and short-term post-operative complications in patients with ulcerative colitis. Aliment Pharmacol Ther. 2010 Feb 15;31(4):486–92.

91. Kopylov U, Ben-Horin S, Zmora O, Eliakim R, Katz LH. Anti-tumor necrosis factor and postoperative complications in Crohn's disease: systematic review and meta-analysis. Inflamm Bowel Dis. 2012 Dec;18(12):2404–13.

92. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol Suppl. 1989;170:2–6; discussion 16–9.

93. Sandborn WJ, Hanauer SB. Antitumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease: a review of agents, pharmacology, clinical results, and safety. Inflamm Bowel Dis. 1999 May;5(2):119–33.

94. Zerbib P, Koriche D, Truant S, Bouras AF, Vernier-Massouille G, Seguy D, et al. Pre-operative management is associated with low rate of post-operative morbidity in penetrating Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther. 2010 Aug;32(3):459–65.

95. Tay GS, Binion DG, Eastwood D, Otterson MF. Multivariate analysis suggests improved perioperative outcome in Crohn's disease patients receiving immunomodulator therapy after segmental resection and/or strictureplasty. Surgery. 2003 Oct;134(4):565–72; discussion 572–3.

96. Appau KA, Fazio VW, Shen B, Church JM, Lashner B, Remzi F, et al. Use of infliximab within 3 months of ileocolonic resection is associated with adverse postoperative outcomes in Crohn's patients. J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract. 2008 Oct;12(10):1738–44.

97. Colombel JF, Loftus EV, Tremaine WJ, Pemberton JH, Wolff BG, Young-Fadok T, et al. Early postoperative complications are not increased in patients with Crohn's disease treated perioperatively with infliximab or immunosuppressive therapy. Am J Gastroenterol. 2004 May;99(5):878–83.

98. Mahadevan U, Loftus EV, Tremaine WJ, Pemberton JH, Harmsen WS, Schleck CD, et al. Azathioprine or 6-mercaptopurine before colectomy for ulcerative colitis is not associated with increased postoperative complications. Inflamm Bowel Dis. 2002 Sep;8(5):311–6.

99. Subramanian V, Saxena S, Kang J-Y, Pollok RCG. Preoperative steroid use and risk of postoperative complications in patients with inflammatory bowel disease undergoing abdominal surgery. Am J Gastroenterol. 2008 Sep;103(9):2373–81.

100. Aberra FN, Lewis JD, Hass D, Rombeau JL, Osborne B, Lichtenstein GR. Corticosteroids and immunomodulators: postoperative infectious complication risk in inflammatory bowel disease patients. Gastroenterology. 2003 Aug;125(2):320–7.

101. Burger D, Travis S. Conventional medical management of inflammatory bowel disease. Gastroenterology. 2011 May;140(6):1827–37.e2.

102. Nasir BS, Dozois EJ, Cima RR, Pemberton JH, Wolff BG, Sandborn WJ, et al. Perioperative anti-tumor necrosis factor therapy does not increase the rate of early postoperative complications in Crohn's disease. J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract. 2010 Dec;14(12):1859–65; discussion 1865–6.

103. Lee RH, Efron DT, Tantry U, Stuelten C, Moldawer LL, Abouhamze A, et al. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha attenuates wound breaking strength in rats. Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc. 2000 Dec;8(6):547–53.

104. Marchal L, D'Haens G, Van Assche G, Vermeire S, Noman M, Ferrante M, et al. The risk of post-operative complications associated with infliximab therapy for Crohn's disease: a controlled cohort study. Aliment Pharmacol Ther. 2004 Apr 1;19(7):749–54.

105. Agrez MV, Valente RM, Pierce W, Melton LJ, van Heerden JA, Beart RW. Surgical history of Crohn's disease in a well-defined population. Mayo Clin Proc. 1982 Dec;57(12):747–52.

106. Sutherland LR, Ramcharan S, Bryant H, Fick G. Effect of cigarette smoking on recurrence of Crohn's disease. Gastroenterology. 1990 May;98(5 Pt 1):1123–8.

107. Cottone M, Rosselli M, Orlando A, Oliva L, Puleo A, Cappello M, et al. Smoking habits and recurrence in Crohn's disease. Gastroenterology. 1994 Mar;106(3):643–8.

108. Sachar DB, Lemmer E, Ibrahim C, Edden Y, Ullman T, Ciardulo J, et al. Recurrence patterns after first resection for stricturing or penetrating Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 2009 Jul;15(7):1071–5.

109. Bernell O, Lapidus A, Hellers G. Risk factors for surgery and recurrence in 907 patients with primary ileocaecal Crohn's disease. Br J Surg. 2000 Dec;87(12):1697–701.

110. Parente F, Sampietro GM, Molteni M, Greco S, Anderloni A, Sposito C, et al. Behaviour of the bowel wall during the first year after surgery is a strong predictor of symptomatic recurrence of Crohn's disease: a prospective study. Aliment Pharmacol Ther. 2004 Nov 1;20(9):959–68.

111. Bressenot A, Chevaux J-B, Williet N, Oussalah A, Germain A, Gauchotte G, et al. Submucosal plexitis as a predictor of postoperative surgical recurrence in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 2013 Jul;19(8):1654–61.

112. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. Genome Res. 1998 Dec;8(12):1229–31.

113. Anwar N, Lovestone S, Cheetham ME, Levy R, Powell JF. Apolipoprotein E-epsilon 4 allele and Alzheimer's disease. Lancet. 1993 Nov 20;342(8882):1308–9.

114. Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, Turner MJ, Knight BA, Hitman G, et al. Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. Diabetes. 2003 Feb;52(2):568–72.

115. Kavvoura FK, Akamizu T, Awata T, Ban Y, Chistiakov DA, Frydecka I, et al. Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 gene polymorphisms and autoimmune thyroid disease: a meta-analysis. J Clin Endocrinol Metab. 2007 Aug;92(8):3162–70.

116. Bland JM, Altman DG. Multiple significance tests: the Bonferroni method. BMJ. 1995 Jan 21;310(6973):170.

117. Rice TK, Schork NJ, Rao DC. Methods for handling multiple testing. Adv Genet. 2008;60:293–308.

118. Clayton D, McKeigue PM. Epidemiological methods for studying genes and environmental factors in complex diseases. Lancet Lond Engl. 2001 Oct 20;358(9290):1356–60.

119. Solon JG, Burke JP, Walsh SR, Coffey JC. The effect of NOD2 polymorphism on postsurgical recurrence in Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis of available literature. Inflamm Bowel Dis. 2013 Apr;19(5):1099–105.

120. Fowler SA, Ananthakrishnan AN, Gardet A, Stevens CR, Korzenik JR, Sands BE, et al. SMAD3 gene variant is a risk factor for recurrent surgery in patients with Crohn's disease. J Crohns Colitis. 2014 Aug 1;8(8):845–51.

121. Sehgal R, Berg A, Polinski JI, Hegarty JP, Lin Z, McKenna KJ, et al. Mutations in IRGM are associated with more frequent need for surgery in patients with ileocolonic Crohn's disease. Dis Colon Rectum. 2012 Feb;55(2):115–21.

122. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. Nat Genet. 2011 Mar;43(3):246–52.

123. Sachar DB. The problem of postoperative recurrence of Crohn's disease. Med Clin North Am. 1990 Jan;74(1):183–8.

124. Sachar DB. Recurrence rates in Crohn's disease: predicting the future and predicting the past. Gut. 2006 Aug;55(8):1069–70.

125. Landsend E, Johnson E, Johannessen H-O, Carlsen E. Long-term outcome after intestinal resection for Crohn's disease. Scand J Gastroenterol. 2006 Oct;41(10):1204–8.

126. Ahmed T, Rieder F, Fiocchi C, Achkar J-P. Pathogenesis of postoperative recurrence in Crohn's disease. Gut. 2011 Apr;60(4):553–62.

127. Alvarez-Lobos M, Arostegui JI, Sans M, Tassies D, Plaza S, Delgado S, et al. Crohn's disease patients carrying Nod2/CARD15 gene variants have an increased and early need for first surgery due to stricturing disease and higher rate of surgical recurrence. Ann Surg. 2005 Nov;242(5):693–700.

128. Büning C, Genschel J, Bühner S, Krüger S, Kling K, Dignass A, et al. Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Crohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. Aliment Pharmacol Ther. 2004 May 15;19(10):1073–8.

129. Maconi G, Colombo E, Sampietro GM, Lamboglia F, D'Incà R, Daperno M, et al. CARD15 gene variants and risk of reoperation in Crohn's disease patients. Am J Gastroenterol. 2009 Oct;104(10):2483–91.

130. Renda MC, Orlando A, Civitavecchia G, Criscuoli V, Maggio A, Mocciaro F, et al. The role of CARD15 mutations and smoking in the course of Crohn's disease in a Mediterranean area. Am J Gastroenterol. 2008 Mar;103(3):649–55.

131. Onnie CM, Fisher SA, Prescott NJ, Mirza MM, Green P, Sanderson J, et al. Diverse effects of the CARD15 and IBD5 loci on clinical phenotype in 630 patients with Crohn's disease. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2008 Jan;20(1):37–45.

132. Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, et al. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. Gastroenterology. 2002 Apr;122(4):854–66.

133. Razmara M, Srinivasula SM, Wang L, Poyet J-L, Geddes BJ, DiStefano PS, et al. CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis. J Biol Chem. 2002 Apr 19;277(16):13952–8.

134. Bouchier-Hayes L, Conroy H, Egan H, Adrain C, Creagh EM, MacFarlane M, et al. CARDINAL, a novel caspase recruitment domain protein, is an inhibitor of multiple NF-kappa B activation pathways. J Biol Chem. 2001 Nov 23;276(47):44069–77.

135. Yamamoto M, Torigoe T, Kamiguchi K, Hirohashi Y, Nakanishi K, Nabeta C, et al. A novel isoform of TUCAN is overexpressed in human cancer tissues and suppresses both caspase-8- and caspase-9-mediated apoptosis. Cancer Res. 2005 Oct 1;65(19):8706–14.

136. Pathan N, Marusawa H, Krajewska M, Matsuzawa S, Kim H, Okada K, et al. TUCAN, an antiapoptotic caspase-associated recruitment domain family protein overexpressed in cancer. J Biol Chem. 2001 Aug 24;276(34):32220–9.

137. Chen GY, Núñez G. Inflammasomes in intestinal inflammation and cancer. Gastroenterology. 2011 Dec;141(6):1986–99.

138. Bernell O, Lapidus A, Hellers G. Risk factors for surgery and postoperative recurrence in Crohn's disease. Ann Surg. 2000 Jan;231(1):38–45.

139. Sachar DB. Patterns of postoperative recurrence in Crohn's disease. Scand J Gastroenterol Suppl. 1990;172:35–8.

140. Reese GE, Nanidis T, Borysiewicz C, Yamamoto T, Orchard T, Tekkis PP. The effect of smoking after surgery for Crohn's disease: a meta-analysis of observational studies. Int J Colorectal Dis. 2008 Dec;23(12):1213–21.

141. Holzheimer RG, Molloy RG, Wittmann DH. Postoperative complications predict recurrence of Crohn's disease. Eur J Surg Acta Chir. 1995 Feb;161(2):129–35.

142. Iesalnieks I, Kilger A, Glass H, Müller-Wille R, Klebl F, Ott C, et al. Intraabdominal septic complications following bowel resection for Crohn's disease: detrimental influence on long-term outcome. Int J Colorectal Dis. 2008 Dec;23(12):1167–74.

143. Peyrin-Biroulet L, Loftus EV, Colombel J-F, Sandborn WJ. The Natural History of Adult Crohn's Disease in Population-Based Cohorts. Am J Gastroenterol. 2009 Oct 27;105(2):289–97.

144. Serradori T, Germain A, Scherrer ML, Ayav C, Perez M, Romain B, et al. The effect of immune therapy on surgical site infection following Crohn's Disease resection. Br J Surg. 2013 Jul;100(8):1089–93.

145. Franke A, Rosenstiel P, Balschun T, Von Kampen O, Schreiber S, Sina C, et al. No Association Between the TUCAN (CARD8) Cys10Stop Mutation and Inflammatory Bowel Disease in a Large Retrospective German and a Clinically Well-Characterized Norwegian Sample. Gastroenterology. 2007 May;132(5):2080–1.

146. McGovern DPB, Butler H, Ahmad T, Paolucci M, van Heel DA, Negoro K, et al. TUCAN (CARD8) Genetic Variants and Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterology. 2006 Oct;131(4):1190–6.

147. Sharma A, Deeb A-P, Iannuzzi JC, Rickles AS, Monson JRT, Fleming FJ. Tobacco smoking and postoperative outcomes after colorectal surgery. Ann Surg. 2013 Aug;258(2):296–300.

148. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. J Biol Chem. 2003 Mar 14;278(11):8869–72.

149. Spehlmann ME, Eckmann L. Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. Curr Opin Gastroenterol. 2009 Mar;25(2):92–9.

150. Jakobsen C, Cleynen I, Andersen PS, Vermeire S, Munkholm P, Paerregaard A, et al. Genetic susceptibility and genotype-phenotype association in 588 Danish children with inflammatory bowel disease. J Crohns Colitis. 2014 Jul;8(7):678–85.

151. Büning C, Schmidt HH-J, Molnár T, Drenth JP, Fiedler T, Gentz E, et al. No association of the CARD8 (TUCAN) c.30T>A (p.C10X) variant with Crohn's disease: a study in 3 independent European cohorts. Inflamm Bowel Dis. 2008 Mar;14(3):332–7.

152. Fisher SA, Mirza MM, Onnie CM, Soars D, Lewis CM, Prescott NJ, et al. Combined Evidence From Three Large British Association Studies Rejects TUCAN/CARD8 as an IBD Susceptibility Gene. Gastroenterology. 2007 May;132(5):2078–80.

153. Yang S-K, Kim H, Hong M, Lim J, Choi E, Ye BD, et al. Association of CARD8 with inflammatory bowel disease in Koreans. J Hum Genet. 2011 Mar;56(3):217–23.

154. Liu J, Liu Y-Y, Liu J, Li B-Z, Cen H, Xu W-D, et al. Association between CARD8 rs2043211 polymorphism and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. Immunol Invest. 2015;44(3):253–64.

Annexes

Annexe 1 – The effect of immune therapy on surgical site infection following Crohn's Disease resection.

Thomas Serradori, **Adeline Germain**, ML Scherrer, C Ayav, M Perez, B Romain, JP Palot, S Rohr, L Peyrin-Biroulet, L Bresler. Br J Surg. 2013 Jul;100(8):1089–93.

Original article

The effect of immune therapy on surgical site infection following Crohn's disease resection

T. Serradori[1,4], A. Germain[1], M. L. Scherrer[1], C. Ayav[2], M. Perez[4], B. Romain[5], J. P. Palot[6], S. Rohr[5], L. Peyrin-Biroulet[3] and L. Bresler[1]

[1]Department of Digestive Surgery, University Hospital of Nancy-Brabois, Departments of [2]Epidemiology and Clinical Evaluation and [3]Hepatogastroenterology, University Hospital of Nancy, and [4]Department of Emergency and General Surgery, Central Hospital, University Hospital of Nancy, Nancy, [5]Department of General and Digestive Surgery, University Hospital of Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg, and [6]Department of General and Digestive Surgery, University Hospital of Reims, Hôpital Robert-Debré, Reims, France

Correspondence to: Dr T. Serradori, Service de Chirurgie Générale et Digestive, Hôpital Brabois, Centre Hospitalier Universitaire Nancy, 5 Rue du Morvan, 54511 Vandoeuvre les Nancy Cedex, France (e-mail: t.serradori@chu-nancy.fr)

Background: Patients with Crohn's disease are increasingly receiving antitumour necrosis factor α (anti-TNF-α) therapy. Whether anti-TNF-α therapy increases the risk of postoperative infectious complications in Crohn's disease is a matter of debate.

Methods: This was a retrospective study of three referral centres. The charts of patients who underwent ileocaecal or ileocolonic resection for Crohn's disease between 2000 and 2011 were reviewed. The impact of baseline characteristics and Crohn's disease-related medications on the risk of postoperative intra-abdominal infectious complications was investigated by univariable and multivariable analysis.

Results: A total of 217 patients were included in the study. Median age at the time of surgery was 36·8 (range 15–78) years. A postoperative intra-abdominal infection occurred in 24 (11·1 per cent) of 217 patients. No deaths were reported. On univariable analysis, age less than 25 years ($P = 0·023$), steroid use ($P = 0·017$), anti-TNF-α therapy ($P = 0·043$) and anti-TNF-α treatment in combination with steroids ($P = 0·004$) were associated with an increased risk of postoperative intra-abdominal infectious complications. On multivariable analysis, only anti-TNF-α therapy in combination with steroids significantly increased this risk (odds ratio 8·03, 95 per cent confidence interval 1·93 to 33·43; $P = 0·035$).

Conclusion: Combined use of steroids and anti-TNF-α therapy was associated with an increased risk of postoperative intra-abdominal infectious complications.

Paper accepted 21 March 2013

Published online 3 May 2013 in Wiley Online Library (www.bjs.co.uk). **DOI:** 10.1002/bjs.9152

Introduction

The advent of antitumour necrosis factor α (anti-TNF-α) agents changed the treatment for Crohn's disease, but surgery is still often required[1]. In a French referral centre cohort, the cumulative risk of major abdominal surgery in patients with Crohn's disease was 26 per cent after 5 years[2]. Although the risk of postoperative complications associated with corticosteroids is well established[3,4], it remains uncertain whether anti-TNF-α therapy increases this risk. In ulcerative colitis, a recent meta-analysis demonstrated that preoperative anti-TNF-α use increased the risk of short-term postoperative complications[5]. Although data for patients with Crohn's disease have been conflicting, a meta-analysis found that preoperative anti-TNF-α treatment was associated with more postoperative infectious complications[6]. The aim of this study was to evaluate the impact of Crohn's disease-related medications on the risk of specific postoperative morbidity.

Methods

All adult patients (aged more than 16 years) who underwent ileocaecal or ileocolonic resection for Crohn's disease in three French referral centres (Visceral Surgery Department and Emergency Surgery Department of University Hospital of Nancy (centre 1), Visceral Surgery Department of University Hospital of Strasbourg (centre 2) and Visceral Surgery Department of University of Reims (centre 3) between January 2000 and December

© 2013 British Journal of Surgery Society Ltd
Published by John Wiley & Sons Ltd

2010 were included in this retrospective study. The terms 'Crohn disease', 'ileocaecal resection', 'ileo-colonic resection' and 'right colectomy' were used to identify eligible patients using the database of the Department of Medical Information. Retrospective studies do not require any ethical approval in France.

The charts of all included patients with an established diagnosis of Crohn's disease, according to Lennard-Jones criteria[7], were reviewed. Patients with a temporary stoma were excluded from the analysis as the aim of the study was to evaluate the risk of postoperative intra-abdominal infectious complications (PIICs; abscess, anastomotic leakage and enterocutaneous fistula). The following data were retrieved for each patient included in the analysis: demographic data, Montreal classification[8], weight loss, smoking status, nutritional support, history of Crohn's disease-related surgery, urgency of surgery (emergency or elective), indication for surgery (ileal stenosis, abscess and/or fistula) and American Society of Anesthesiologists (ASA) fitness grade.

Information regarding Crohn's disease-related medications was collecting, including: use of budesonide and systemic (oral and intravenous) steroids, dose of systemic steroids, use of anti-TNF-α therapy (infliximab, adalimumab), use of immunomodulators (thiopurine, methotrexate). Only steroid or immunomodulator use at the time of surgery was included in the analysis. For infliximab and adalimumab, the last infusion had to be administered within 12 weeks before surgery to be included in the analysis, based on the pharmacokinetics infliximab[9].

Information on bowel preparation with electrolyte solution before surgery, surgical antibiotic prophylaxis, and the type of surgical approach (laparotomy and/or laparoscopic procedure) was analysed. Mean operating time was calculated. The type of anastomosis (handsewn, stapled, end-to-end, end-to-side or side-to-side) was noted. The duration of intra-abdominal drainage, if needed, was recorded.

Statistical analysis

Patients were divided into two groups according to the occurrence of PIICs. These groups were first compared by univariable analysis using the χ^2 test for qualitative variables and Wilcoxon test for continuous data. Variables with $P < 0{\cdot}200$ between the two groups were then included in a multivariable logistic regression model to identify independent predictors of PIIC using a forward variable selection method. Statistical significance was set at $P \leq 0{\cdot}050$. Statistical analysis was carried out using SAS® software version 9·2 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA).

Results

A total of 217 patients were included over a 10-year period, including 126 women (58·1 per cent). Some 42 patients with Crohn's disease were excluded (Strasbourg 15, Nancy 7, Reims 20) because the chart review indicated that the type of surgery had been misclassified. A further 41 patients with Crohn's disease (Strasbourg 4, Nancy 21, Reims 16) had a temporary stoma and were also excluded. The median age of included patients at the time of surgery was 36·8 (range 15–78) years and the mean(s.d.) duration of disease was 8·6(8·1) (range 0–36) years. PIICs were recorded in 24 patients (11·1 per cent). Twelve patients had an intra-abdominal abscess, of whom ten had radiological drainage and reoperation. Ten patients had

Table 1 Comparison of baseline data between groups with and without infection

	No PIIC ($n = 193$)	PIIC ($n = 24$)	P‡
Age (years)			0·023
< 25	29 (15·0)	9 (38)	
25–45	104 (53·9)	10 (42)	
> 45	60 (31·1)	5 (21)	
Mean(s.d.)	39·2(13·9)	32·2(11·6)	0·022§
Sex ratio (M : F)	84 : 109	7 : 17	0·178
Active smoker	90 (47·6) ($n = 189$)	12 (50)	0·825
ASA grade			0·954
I	70 (37·8)	9 (41)	
II	105 (56·8)	12 (55)	
III	10 (5·4)	1 (5)	
Montreal classification A			0·135
A1	14 (7·3)	2 (8)	
A2	138 (71·5)	21 (88)	
A3	41 (21·2)	1 (4)	
Montreal classification B			0·540
B2	133 (68·9)	18 (75)	
B3	60 (31·1)	6 (25)	
Montreal classification L			0·939
L1	168 (87·0)	21 (88)	
L2	1 (0·5)	0 (0)	
L3	24 (12·4)	3 (13)	
Perianal disease	18 (9·3)	4 (17)	0·261
Duration of disease (years)*	8·6(8·1) ($n = 192$)	8·3(8·0)	0·310§
5-Aminosalicylic acid	17 (8·8)	2 (8)	0·938
Weight loss (kg)*†	5·2(6·1) ($n = 166$)	4·8(3·7) ($n = 19$)	0·930§
Body mass index (kg/m^2)*	22·1(3·8) ($n = 183$)	20·7(2·7)	0·656§
Preop. nutritional support	21 (10·9)	0 (0)	0·088

Values in parentheses are percentages unless indicated otherwise; *values are mean(s.d.). †In relation to healthy weight. PIIC, postoperative intra-abdominal infectious complication; ASA, American Society of Anesthesiologists. ‡χ^2 test, except §Wilcoxon test.

© 2013 British Journal of Surgery Society Ltd
Published by John Wiley & Sons Ltd

Table 2 Comparison of perioperative data between groups with and without infection

	No PIIC ($n = 193$)	PIIC ($n = 24$)	P†
Abscess at time of surgery	28 (14·5)	2 (8)	0·409
Occlusion at time of surgery	17 (8·8)	3 (13)	0·556
Fistula at time of surgery	4 (2·1)	1 (4)	0·520
Peritonitis at time of surgery	1 (0·5)	1 (4)	0·078
Stenosis at time of surgery	166 (86·0)	19 (79)	0·373
Surgery in an emergency setting	21 (10·9)	2 (8)	0·702
First ileocaecal resection	135 (69·9)	16 (67)	0·741
Laparoscopic approach	89 (46·1)	11 (46)	0·979
Epidural analgesia	4 (2·2) ($n = 186$)	0 (0)	0·487
Bowel preparation	100 (51·8)	11 (46)	0·580
Peroperative antibiotics	174 (92·6) ($n = 188$)	20 (91) ($n = 22$)	0·783
Duration of operation (min)*	133·2(57·3) ($n = 191$)	128·3(47·7) ($n = 23$)	0·469‡
Histological analysis			
No inflammatory lesions	70 (38·0)	8 (35)	
Inflammatory lesions	114 (62·0)	15 (65)	
Type of anastomosis			
End-to-end	20 (10·4)	0 (0)	0·097
End-to-side	86 (44·6)	9 (38)	0·510
Side-to-side	87 (45·1)	15 (63)	0·107
Handsewn	115 (59·6)	12 (50)	0·368
Stapled	78 (40·4)	12 (50)	0·368
Peroperative abdominal drainage	112 (58·0)	16 (67)	
Duration of hospital stay (days)*	9·3(5·4)	24·0(12·7)	< 0·001‡

Values in parentheses are percentages unless indicated otherwise; *values are mean(s.d.). PIIC, postoperative intra-abdominal infectious complication; †χ^2 test, except ‡Wilcoxon test.

Table 3 Comparison of specific treatments and centres between groups with and without infection

	No PIIC ($n = 193$)	PIIC ($n = 24$)	P†
Steroids	72 (37·3)	15 (63)	0·017
Steroid dose (mg)*	23·4(16·1) ($n = 70$)	29·0(13·1) ($n = 15$)	0·293‡
Anti-TNF-α (8-week washout period)	26 (13·5)	7 (29)	0·043
Anti-TNF-α (12-week washout period)	33 (17·1)	9 (38)	0·026
Steroids and/or anti-TNF-α (8-week washout for biologicals)			0·004
None	103 (53·4)	7 (29)	
Steroids only	64 (33·2)	10 (42)	
Anti-TNF-α only	18(9·3)	2 (8)	
Steroids + anti-TNF-α	8 (4·1)	5 (21)	
Steroids and/or anti-TNF-α (12-week washout period for biologicals)			0·005
None	98 (50·8)	6 (25)	
Steroids only	62 (32·1)	9 (38)	
Anti-TNF-α only	23 (11·9)	3 (13)	
Steroids + anti-TNF-α	10 (5·2)	6 (25)	
Budesonide	22 (11·4)	3 (13)	0·873
Azathioprine	48 (24·9)	5 (21)	0·664
5-Aminosalicylic acid	17 (8·8)	2 (8)	0·938
Centre			0·453
1	120 (62·2)	18 (75)	
2	9 (4·7)	1 (4)	
3	64 (33·2)	5 (21)	

Values in parentheses are percentages unless indicated otherwise; *values are mean(s.d.). PIIC, postoperative intra-abdominal infectious complication; TNF, tumour necrosis factor. †χ^2 test, except ‡Wilcoxon test.

an anastomotic leak with peritonitis requiring reoperation and stoma. Two patients developed enterocutaneous fistula and both required surgery. The median time to onset of first PIIC was 10 (range 2–30) days. There were no deaths.

A comparison of the baseline characteristics of patients with PIICs and those without is presented in *Table 1*. Patients who developed PIICs were younger, but there were no differences between the two groups regarding sex ratio, ASA grade or Montreal classification. Nor were there any differences in indication for surgery, bowel preparation, histological findings and type of anastomosis (*Table 2*). Preoperative specific treatments are summarized in *Table 3*. In univariable analysis, age less than 25 years, steroid use, exposure to anti-TNF-α therapy, and the use of biologicals in combination with steroids were associated with an increased risk of developing a PIIC (*Tables 1* and *3*).

In multivariable logistic regression, only anti-TNF-α therapy in combination with steroids was independently associated with the risk of developing a PIIC; this combined treatment, with an 8-week washout period for biologicals, was associated with an eightfold increase in the risk of PIICs (*Table 4*). Of note, increasing the washout period for biologicals to 12 weeks did not modify the results.

Discussion

The PIIC rate in the present study is similar to that reported by others[6]. The risk of postoperative complications remains high in patients who have received a

© 2013 British Journal of Surgery Society Ltd
Published by John Wiley & Sons Ltd

Table 4 Multivariable logistic regression analysis of risk of postoperative intra-abdominal infections in patients with Crohn's disease

	Washout period for biologicals			
	8 weeks		12 weeks	
	Odds ratio	*P*	Odds ratio	*P*
Age (years)		0·052		0·046
< 25	1·00		1·00	
25–45	0·26 (0·09, 0·77)		0·25 (0·09, 0·75)	
> 45	0·46 (0·11, 1·87)		0·46 (0·12, 1·87)	
Montreal classification A		0·227		0·215
A1	1·00		1·00	
A2	2·15 (0·41, 11·19)		2·06 (0·39, 10·75)	
A3	0·40 (0·02, 6·58)		0·36 (0·02, 5·83)	
Steroids and/or anti-TNF-α		0·035		0·013
None	1·00		1·00	
Steroids only	2·25 (0·79, 6·37)		2·29 (0·76, 6·94)	
Anti-TNF-α only	1·29 (0·23, 7·15)		1·88 (0·42, 8·45)	
Steroids + anti-TNF-α	8·03 (1·93, 33·43)		9·76 (2·47, 38·55)	

Values in parentheses are 95 per cent confidence intervals. The analysis was based on 217 patients. Only factors with $P < 0·200$ in the univariable model were included in the multivariable model and forward selection of variables was used. TNF, tumour necrosis factor.

biological therapy despite improvements such as preoperative nutritional therapy[10]. The types of PIIC included anastomotic leak, intra-abdominal abscess and fistula, as described in most published studies[11–13].

In agreement with previous studies[14–16], the use of immunomodulators, mainly azathioprine, was not a risk factor for PIIC in the present analysis. Steroids still represent the first-line treatment during outbreaks of the disease or the inaugural phase[17]. Furthermore, some patients become corticodependent and require continuation of steroid therapy, despite the introduction of other therapies including biologicals. Several studies have demonstrated that steroid use is associated with an increased risk of postoperative complications[3,4,11,14–16,18]. Univariable analysis here confirmed that steroid use is associated with an increased risk of PIIC, although a dose-dependent effect could not be demonstrated.

A large retrospective study concluded that the use of anti-TNF-α therapy was not associated with an increase in overall or infectious complications in patients undergoing surgery for Crohn's disease[19]. In a recent meta-analysis including eight studies and 1641 patients, preoperative infliximab treatment was associated with an increased risk of postoperative infectious complications (odds ratio 1·50, 95 per cent confidence interval 1·08 to 2·08)[6]. Interestingly, the largest study, which included a total of 389 patients who underwent ileocolonic resection, found that infliximab increased postoperative sepsis, abscess and readmissions in patients with Crohn's disease[12]. The underlying mechanisms remain poorly understood, although delayed wound healing, possibly promoting the occurrence of PIIC, has been demonstrated in a mouse model[20]. An increasing number of patients are coming to surgery receiving both steroids and anti-TNF-α therapy, with the proportion ranging from 7 to 31 per cent[12,13,21]. This combination represents a particularly high risk for perioperative complications.

The present analysis has limitations. Because the study was retrospective, some data, such as disease activity and severity, could not be collected, and there was no standardized postoperative follow-up. In addition, the number of patients receiving both steroids and biological agents was relatively small.

Disclosure

The authors declare no conflict of interest.

References

1 Bouguen G, Peyrin-Biroulet L. Surgery for adult Crohn's disease: what is the actual risk? *Gut* 2011; **60**: 1178–1181.
2 Peyrin-Biroulet L, Oussalah A, Williet N, Pillot C, Bresler L, Bigard MA. Impact of azathioprine and tumour necrosis factor antagonists on the need for surgery in newly diagnosed Crohn's disease. *Gut* 2011; **60**: 930–936.
3 Alves A, Panis Y, Bouhnik Y, Pocard M, Vicaut E, Valleur P. Risk factors for intra-abdominal septic complications after a first ileocecal resection for Crohn's disease: a multivariate analysis in 161 consecutive patients. *Dis Colon Rectum* 2007; **50**: 331–336.
4 Post S, Betzler M, von Difurth B, Schürmann G, Küppers P, Herfath C. Risks of intestinal anastomoses in Crohn's disease. *Ann Surg* 1991; **213**: 37–42.
5 Yang Z, Wu Q, Wu K, Fan D. Meta-analysis: pre-operative infliximab treatment and short-term post-operative complications in patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; **31**: 486–492.
6 Kopylov U, Ben-Horin S, Zmora O, Eliakim R, Katz LH. Anti-tumor necrosis factor and postoperative complications in Crohn's disease: systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* 2012; **18**: 2404–2413.
7 Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1989; **24** (Suppl): 2–6.
8 Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel, JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006; **55**: 749–753.
9 Sandborn WJ, Hanauer SB. Antitumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease: a review of agents,

© 2013 British Journal of Surgery Society Ltd
Published by John Wiley & Sons Ltd

pharmacology, clinical results, and safety. *Inflamm Bowel Dis* 1999; **5**: 119–133.
10 Zerbib P, Koriche D, Truant S, Bouras AF, Vernier-Massouille G, Serguy D *et al.* Pre-operative management is associated with low rate of post-operative morbidity in penetrating Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; **32**: 459–465.
11 Tay GS, Binion DG, Eastwood D, Otterson MF. Multivariate analysis suggests improved perioperative outcome in Crohn's disease patients receiving immunomodulator therapy after segmental resection and/or strictureplasty. *Surgery* 2003; **134**: 565–572.
12 Appau KA, Fazio VW, Shen B, Church JM, Lashner B, Remzi F *et al.* Use of infliximab within 3 months of ileocolonic resection is associated with adverse postoperative outcomes in Crohn's patients. *J Gastrointest Surg* 2008; **12**: 1738–1744.
13 Colombel JF, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Pemberton JH, Wolff BG, Young-Fadok T *et al.* Early postoperative complications are not increased in patients with Crohn's disease treated perioperatively with infliximab or immunosuppressive therapy. *Am J Gastroenterol* 2004; **99**: 878–883.
14 Mahadevan U, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Pemberton JH, Harmsen WS, Schleck CD *et al.* Azathioprine or 6-mercaptopurine before colectomy for ulcerative colitis is not associated with increased postoperative complications. *Inflamm Bowel Dis* 2002; **8**: 311–316.
15 Subramanian V, Saxena S, Kang JY, Pollok RC. Preoperative steroid use and risk of postoperative complications in patients with inflammatory bowel disease undergoing abdominal surgery. *Am J Gastroenterol* 2008; **103**: 2373–2381.
16 Aberra FN, Lewis JD, Hass D, Rombeau JL, Osborne B, Lichtenstein GR. Corticosteroids and immunomodulators: postoperative infectious complication risk in inflammatory bowel disease patients. *Gastroenterology* 2003; **125**: 320–327.
17 Burger D, Travis S. Conventional medical management of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2011; **140**: 1827–1837.
18 Yamamoto T, Allan RN, Keighley MR. Risk factors for intra-abdominal sepsis after surgery in Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 2000; **43**: 1141–1145.
19 Nasir BS, Dozois EJ, Clima RR, Pemberton JH, Wolff BG, Sandborn WJ *et al.* Perioperative anti-tumor necrosis factor therapy does not increase the rate of early postoperative complications in Crohn's disease. *J Gastrointest Surg* 2010; **14**: 1859–1865.
20 Lee RH, Efron DT, Tranty U, Stuelten C, Moldawer LL, Abouhamze A *et al.* Inhibition of tumor necrosis factor-alpha attenuates wound breaking strength in rats. *Wound Repair Regen* 2000; **8**: 547–553.
21 Marchal L, D'Haens G, Van Assche G, Vermeire S, Noman M, Ferrante M *et al.* The risk of post-operative complications associated with infliximab therapy for Crohn's disease: a controlled cohort study. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; **19**: 749–754.

© 2013 British Journal of Surgery Society Ltd
Published by John Wiley & Sons Ltd

Annexe 2 – CARD8 gene variant is a risk factor for recurrent surgery in patients with Crohn's disease.

Adeline Germain, Rosa-Maria Guéant, Mathias Chamaillard, Laurent Bresler, Jean-Louis Guéant, Laurent Peyrin-Biroulet. Dig Liver Dis. 2015 Jul 29. pii: S1590-8658(15)00419-3. doi: 10.1016/j.dld.2015.07.013.

G Model
YDLD-2934; No. of Pages 5
ARTICLE IN PRESS

Digestive and Liver Disease xxx (2015) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Digestive and Liver Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dld

Alimentary Tract

CARD8 gene variant is a risk factor for recurrent surgery in patients with Crohn's disease

Adeline Germain[a,b,*], Rosa-Maria Guéant[b], Mathias Chamaillard[c,d], Laurent Bresler[a], Jean-Louis Guéant[b], Laurent Peyrin-Biroulet[b,e]

[a] Department of Digestive Surgery, University Hospital of Nancy-Brabois, Vandoeuvre-les-Nancy, France
[b] INSERM U954, Nutrition-Génétique et Exposition aux risques environnementaux, Faculté de Médecine, Université de Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, France
[c] Institut Pasteur de Lille, Center for infection and immunity of Lille, Lille, France
[d] INSERM U1019, Team 7, Equipe FRM, Lille, France
[e] Department of Gastroenterology, University Hospital of Nancy-Brabois, Vandoeuvre-les-Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 May 2015
Accepted 20 July 2015
Available online xxx

Keywords:
CARD8
Crohn's disease
Surgical recurrence

ABSTRACT

Background and aims: Post-operative recurrence is frequent in Crohn's disease. Genetic factors associated with post-operative recurrence remain poorly understood. Identification of genetic variants associated with repeat surgery would allow risk stratification of patients who may benefit from early aggressive therapy and/or post-operative prophylactic treatment.
Methods: Crohn's disease patients who had at least one bowel resection were retrospectively identified from the "Nancy IBD cohort". Covariates and potential interactions were assessed using the Cox proportional hazard model. Kaplan–Meier curves for time to surgical recurrence were developed for 200 genetic variants and analyzed with the log-rank test.
Results: 137 patients had at least 1 resection in our cohort: 38 had a surgical recurrence (28%). In multivariate analysis, current smoker status (OR 6.97, 95% CI 1.85–26.22, $p = 0.004$), post-operative complications after prior surgery (OR 2.72, 95% CI 1.02–7.22, $p = 0.044$), and Caspase recruitment domain-containing protein 8 (CARD8) homozygosity for the risk allele (OR 7.56, 95% CI 1.13–50.37, $p = 0.036$) remained significantly and independently associated with surgical recurrence.
Conclusion: Current smoker status was associated with increased risk of surgical recurrence. A novel association between CARD8 and increased risk of surgical recurrence in Crohn's disease was observed. CARD8 could be a new marker for risk stratification and prevention of recurrent surgery.
© 2015 Editrice Gastroenterologica Italiana S.r.l. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Crohn's disease (CD) is a chronic disabling and progressive condition characterized by a relapsing-remitting disease course leading to bowel resection in approximately 80% of CD patients [1,2]. However, surgery is not a cure and surgical recurrence is common in patients with CD. Notably, up to 70% of patients require a second surgery in the 10 years following their initial surgery [3]. Post-operative recurrence is thought to result from a combination between genetic, environmental, bacterial and immune risk factors [4]. Several studies have investigated the risk factors for surgical recurrence in CD. Smoking status, prior intestinal resection, penetrating behaviour, perianal disease and extensive bowel disease (>50 cm) are well-established risk factors [5].

Advances in the field of genetics have led to the identification of numerous susceptibility genes for inflammatory bowel disease (IBD). The association of *NOD2/CARD15* polymorphism with predisposition to CD was first reported in 2001 [6,7]. A recent meta-analysis concluded that there are insufficient data to support a role for *NOD2/CARD15* in predicting surgical recurrence, but did not exclude a role for it [8]. While Fowler et al. found that variant in the SMAD3-encoding gene was a risk factor for recurrent surgery [9], the influence of the aforementioned IBD risk alleles on the postsurgical recurrence of CD remains poorly investigated. In their study, Sehgal et al. described that CD patients carrying an "at risk" allele for IRGM (rs4958847) had an overall more severe disease course

* Corresponding author at: Department of Digestive Surgery, University Hospital of Nancy-Brabois, Vandoeuvre-les-Nancy, France. Tel.: +33 83153120; fax: +33 83153119.
E-mail address: a.germain@chu-nancy.fr (A. Germain).

http://dx.doi.org/10.1016/j.dld.2015.07.013
1590-8658/© 2015 Editrice Gastroenterologica Italiana S.r.l. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Germain A, et al. CARD8 gene variant is a risk factor for recurrent surgery in patients with Crohn's disease. Dig Liver Dis (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.dld.2015.07.013

with a greater number of surgeries in comparison with those who were "wild-type" [10].

The identification of genetic risk factors associated with the surgical recurrence in CD could allow risk stratification of patients who may benefit from early aggressive therapy and/or post-operative prophylactic treatment and may also identify novel therapeutic targets. We herein report a genetic association study on CD surgical recurrence using a well-defined cohort of 857 CD patients, namely the "Nancy IBD cohort" [4].

2. Methods

2.1. Study subjects

As previously described, the "Nancy IBD cohort" is a large observational cohort of patients with IBD with detailed clinical information on 1173 patients with IBD (857 CD, 316 ulcerative colitis) [4]. Patients were followed prospectively according to standard of care. Information about the "Nancy IBD cohort" is reported to the *Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés* (no. 1404720), which supervises the implementation of the act regarding data processing, data files, and individual liberties that came into effect on January 6th 1978, and was amended on August 6th 2004 to protect the personal data of individuals. Available information retrospectively collected includes age at diagnosis, gender, disease duration, disease location and behaviour according to the Montreal classification [11], extra-intestinal manifestations, smoking status, date, type and indication of surgery, and date of recurrence. Smoking status was defined as non-smoker or current smoker at time of surgery. Surgery for early complications of first surgery, for perianal disease, fistulotomy and/or faecal diversion were excluded.

2.2. Genotyping

Genomic DNA was isolated from blood samples taken from the first 280 consecutive adult CD patients from the "Nancy IBD Cohort". 200 CD-associated single nucleotide polymorphisms (SNPs) from previous studies were analyzed [12] (Supplementary Table S1). In this study, 31 new distinct susceptibility loci for CD were identified and data from three studies were combined (a total of 3230 cases and 4829 controls) and the authors performed replication in 3664 independent cases [12]. All patients signed a consent form for genetic analysis. SNPs were genotyped using the Applied Biosystems (Foster City, CA) SNPlex technology, which is based on the Oligonucleotide Ligation Assay combined with multiplex PCR amplification. Experimental methods were as per the manufacturer's instructions. Genotype assignment was performed by capillary electrophoresis analysis using an ABI 3730xl DNA Analyzer and ABI GeneMapper v3.7 software. Genotyping was considered to be successful if the overall success rate for the SNP was >80% and the Hardy–Weinberg equilibrium did not depart significantly from the expected distribution ($p > 0.05$ for Chi^2-test between expected and actual values).

2.3. Statistical analysis

Our primary outcome measure was repeat CD-related bowel resection. Continuous variables were summarized using means and standard deviations. Polymorphisms were tested for Hardy–Weinberg equilibrium before using the Fisher exact test (or χ^2 test) to compare allelic and genotype frequencies. Categorical variables were expressed as proportions. The t test was used to compare continuous variables while the chi-square test (or Fisher's exact test) was used for categorical variables. Cox proportional hazards models were constructed to examine the effect of the various genetic polymorphisms adjusting for potential confounders. Time from first surgery to surgical recurrence (or to end of follow-up if one single surgery) was used as the time variable in the Cox proportional hazards model. Variables reaching a p-value of ≤ 0.10 in the univariate analysis were entered into the multivariate analysis where a p-value <0.05 indicated independent statistical significance. Kaplan–Meier curves for time to repeat surgery were developed for each genetic variant and compared using the log-rank test.

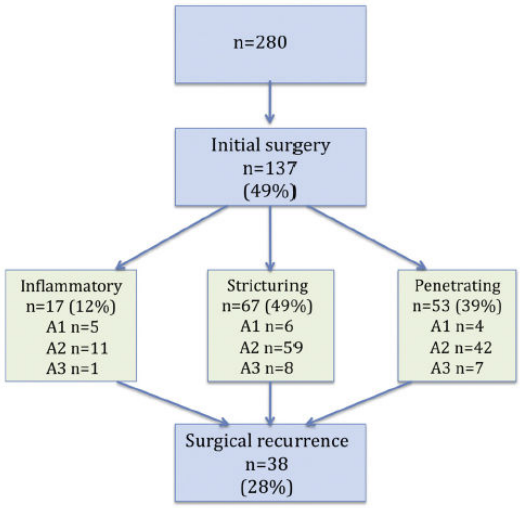


Fig. 1. Indication for first surgery in 280 genotyped Crohn's disease patients.

3. Results

3.1. Study population

One hundred and thirty-seven patients of the "Nancy IBD cohort" required a CD-related bowel resection. Mean age at diagnosis was 23 years (range, 3–82), with a mean disease duration of 5 years (range, 0–32).

One hundred eight patients were males (39%), 84 had ileitis (30%), 57 had colitis (20%), 131 had ileo-colonic disease (47%), 8 had upper gastrointestinal involvement (3%); 103 patients had purely inflammatory disease (37%), 95 had stricturing disease (34%), and 82 had penetrating disease according to the Montreal classification (29%). The mean duration of follow-up was 13.5 years (range 0–34).

Indication for first surgery is shown in Fig. 1.

3.2. Factors associated with surgical recurrence

Of 137 patients requiring an intestinal resection, 38 patients (28%) required a second surgery during follow-up. Clinical characteristics of CD patients according to surgical recurrence are shown in Table 1.

At univariate analysis, variables associated with surgical recurrence were female gender ($p = 0.02$), preoperative disease duration ($p = 0.05$), current smoker status ($p = 0.001$), and post-operative complications after prior surgery ($p = 0.004$). There was no association between surgical recurrence and other clinical variables such as disease location and behaviour ($p = 0.65$ and $p = 0.13$ respectively). Genetic variables associated with surgical recurrence on univariate analysis were Caspase recruitment domain-containing protein 8 (CARD8) (rs2043211) homozygosity

Please cite this article in press as: Germain A, et al. CARD8 gene variant is a risk factor for recurrent surgery in patients with Crohn's disease. Dig Liver Dis (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.dld.2015.07.013

Table 1
Clinical characteristics of Crohn's disease patients according to surgical recurrence.

	No surgical recurrence *N* (%)	Surgical recurrence *N* (%)	*p*-value
N	99	38	
Female gender	65 (65.6)	17 (44.7)	0.02
Mean age at diagnosis (years)	23 ± 13	21 ± 9	0.92
Mean disease duration to first surgery (years)	7 ± 7	4 ± 3	0.05
Mean time to second surgery (years)	NA	9.2 ± 1.0	
Mean duration of follow-up (years)	14.1 ± 0.8	15.3 ± 0.6	0.11
Location			0.65
Ileal	53 (53.5)	17 (44.7)	
Colonic	17 (17.1)	8 (21.1)	
Ileocolonic	29 (29.2)	13 (34.2)	
Upper gastrointestinal	5 (0.5)	2 (0.5)	0.96
Behaviour			
Inflammatory	21 (21.2)	5 (13.1)	0.13
Stricturing	46 (46.5)	25 (65.8)	
Penetrating	32 (32.3)	8 (21.1)	
Type of surgery (*n*, (%))			
Ileocaecal resection	59 (59.6)	19 (50.0)	0.07
Small bowel resection	5 (5.0)	7 (18.4)	
Colonic resection	29 (29.3)	11 (28.9)	
Small bowell and colic resection	5 (5.0)	0	
Defunctioning loop stoma	1 (0.1)	1 (2.6)	
Perianal	49 (49.5)	15 (39.5)	0.29
Current smoker	54 (54.5)	34 (89.5)	0.001
Post-operative complications	18 (18.2)	16 (42.1)	0.004

NA, not applicable.

Table 2
CARD8 and NAT2 allele frequency distribution.

SNP	Wild type allele (homozygote)	Heterozygote	Risk allele (homozygote)	Minor allele frequency	*p*[*]
CARD8 (rs2043211)	124 (AA)	127 (AT)	20 (TT)	0.31	0.1
NAT2 (rs1799930)	128 (GG)	114 (AG)	18 (AA)	0.28	0.2

[*] Pearson's chi-squared test for deviation from Hardy–Weinberg equilibrium.

for the risk allele ($p = 0.0007$) and N-acetyltransferase 2 (NAT2) (rs1799930) homozygosity for the risk allele ($p = 0.001$). No other genetics variants were associated with recurrent surgery (Table 1). These two SNPs were in Hardy–Weinberg equilibrium (Table 2).

All variables reaching a *p*-value of ≤0.10 in the univariate analysis were entered into the multivariate analysis. In the multivariate analysis, current smoker status (OR 6.97, 95% CI 1.85–26.22, $p = 0.004$), post-operative complications after prior surgery (OR 2.72, 95% CI 1.02–7.22, $p = 0.04$), and CARD8 homozygosity for the risk allele (OR 7.56, 95% CI 1.13–50.37, $p = 0.04$) remained significantly and independently associated with surgical recurrence (Table 3). Disease duration at first surgery, female gender and *NAT2* homozygosity for the risk allele were no longer statistically significant. The Kaplan–Meier survival curves for repeat surgery according to CARD8 risk allele status is depicted on Fig. 2 No other genetic variants were associated with recurrent surgery.

Table 3
Multivariable logistic regression analysis of risk of surgical recurrence.

	Odds ratio	95% Confidence interval	*p*-value
Current smoker status	6.97	1.85–26.22	0.004
Post-operative complications after prior surgery	2.72	1.02–7.22	0.04
CARD8[a] homozygosity for the risk allele	7.56	1.13–50.37	0.04

[a] Caspase recruitment domain-containing protein 8.

4. Discussion

Numerous studies have focused on the identification of genetic determinants on CD progression, but very few have focused on the impact of genetic factors on the risk of surgical recurrence [8,9,13–17]. Our series is the first one that studied the influence of 200 CD-associated SNPs on surgical recurrence in CD, in a well-defined cohort namely the "Nancy IBD cohort" with a mean follow-up of 13.5 years. We reported the association of CARD8 and NAT2 genes with the risk of surgical recurrence in CD. A correlation between genotype and clinical phenotype shall allow us to envisage some substantial improvements in CD management by

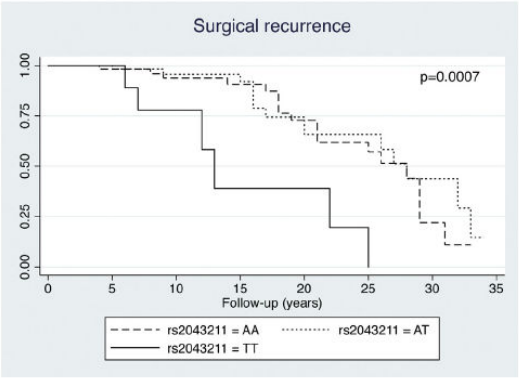


Fig. 2. Survival curve for time to surgical recurrence according to CARD8 genotype.

Please cite this article in press as: Germain A, et al. CARD8 gene variant is a risk factor for recurrent surgery in patients with Crohn's disease. Dig Liver Dis (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.dld.2015.07.013

identifying patients at high risk of surgical recurrence. This may lead to the development of targeted strategies aim at changing the natural course of CD.

The role of genetics factors in surgical recurrence has not been clearly defined. To date, 7 studies have examined the association between genetic variants and surgical recurrence. Six of these series have focused on *NOD2/CARD15* variants [14–19]. A meta-analysis concluded that there are insufficient data to support a role for NOD2/CARD15 in predicting surgical recurrence, but did not exclude a role for it [8]. In our study population, the predictive value for surgical recurrence of 200 SNPs, including NOD2/CARD15, along with other clinical characteristics was studied. While NOD2/CARD15 variants were not predictor of surgical recurrence in our population, we herein described that homozygosity for the CARD8 and the NAT2 risk alleles were associated with increased risk of recurrent surgery in CD in univariate analysis.

We found that CD patients carrying the CARD8 allele risk (rs2043211) were positively and independently associated with surgical recurrence in CD. The CARD8 gene, which is highly expressed in both monocytes and the gut epithelium, is a potential candidate risk gene for IBD, based on gene location (in the IBD6 locus) and biological function [20–23]. CARD8 is a negative regulator of nuclear factor-kappa B (NF-κB) and is a suppressor of apoptosis. Recent studies found that CARD8 interacts with NLRP3-coupled inflammasome and members of the NOD-like receptor family thus implying a role for CARD8 in the regulation of innate and adaptative immunity [20–23]. Activation of NLRP3 by a diverse panel of ligands leads to the formation of an inflammasome complex consisting of caspase-1 and ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), which mediates the production and secretion of IL-1β in response to microbial challenge. Recently attention has focused on the inflammasome and its role in maintaining gut homeostasis and mediating host immune defenses against pathogenic bacteria and stress signals. The dysregulation of the inflammasome complex is thought to contribute to chronic inflammation [24]. We could speculate that the high level risk of surgical recurrence may result from the failure of homozygous patients for the CARD8 allele risk to finely tuned NF-κB activation. It may be explained by the presence of a dysfunctional NLRP3 inflammasome caused by the expression of mutated forms of NLRP3 in combination with a CARD8, not being able to act as a suppressor of NF-κB activation.

CARD8 was an independent predictor of the risk of surgical recurrence. Indeed the association was not influenced by other factors known to increase the risk such as smoking. Among them, postoperative complications could have a detrimental influence on the long-term outcome following intestinal resections, leading to increased number of repeat resection surgery. Our study confirms a high rate of repeat resection with 27.7% of patients requiring a second surgery [25,26]. In our series, there was a significant difference regarding surgical recurrence rate between smokers and non-smokers ($p = 0.001$). Smoking is known to be associated with a more aggressive disease course and increased postoperative recurrence [13]. Recently, a meta-analysis described a 2.5-fold increase in the risk of second surgery in smokers compared with non-smokers [27]. Unfortunately, the potential confounding effect of smoking could not be analyzed as only 11.5% of patients were non-smokers ($n = 4$) among patients with surgical recurrence. Patients with postoperative complications were more likely to require repeat surgical intervention for CD recurrence. Two studies described surgical complications as an independent predictor for surgical recurrence [28,29]. In line with our report, the aforementioned studies showed that development of postoperative complications is a risk factor for early recurrence in CD. Postoperative complications may have a detrimental influence on the long-term outcome following intestinal resections, leading to repeated resection surgeries.

Our results need to be confirmed in a replication cohort, which a clear limitation of our study. If this association can be confirmed, it would allow for early risk classification of patients who may benefit from pre- and post-operative aggressive treatment. In our retrospective study it was not possible to account for the effects of all IBD-related medications.

Our study is the first to have studied the influence of 200 CD-associated SNPs on surgical recurrence in CD, in a well-defined cohort namely the "Nancy IBD cohort" and with a mean follow-up of 13.5 years. We evaluated surgical recurrence, which is an objective outcome measure. We had too missing data for evaluating the association between genetic factors and endoscopic recurrence. Also, due to the retrospective nature of the study, there were missing data regarding the use of postoperative medications and this parameter could not be analyzed. It is noteworthy that the patients enrolled in the present study were included in the international IBD genetics consortium [12]; it is the reason why the entire Nancy IBD cohort could not be genotyped.

In conclusion, an independent association between CARD8 risk alleles and increased risk of surgical recurrence in CD was identified. In addition, current smoker status and post-operative complications were confirmed as two main clinical predictors for surgical recurrence. The identification of CARD8 as a risk allele for surgical recurrence is of particular interest as it may be a new marker for the treatment of CD in the postoperative setting.

Conflict of interest

None declared.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.dld.2015.07.013

References

[1] Sachar DB. The problem of postoperative recurrence of Crohn's disease. Medical Clinics of North America 1990;74:183–8.
[2] Sachar DB. Recurrence rates in Crohn's disease: predicting the future and predicting the past. Gut 2006;55:1069–70.
[3] Landsend E, Johnson E, Johannessen H-O, et al. Long-term outcome after intestinal resection for Crohn's disease. Scandinavian Journal of Gastroenterology 2006;41:1204–8.
[4] Peyrin-Biroulet L, Oussalah A, Williet N, et al. Impact of azathioprine and tumour necrosis factor antagonists on the need for surgery in newly diagnosed Crohn's disease. Gut 2011;60:930–6.
[5] Buisson A, Chevaux J-B, Allen PB, et al. Review article: the natural history of postoperative Crohn's disease recurrence. Alimentary Pharmacology and Therapeutics 2012;35:625–33.
[6] Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001;411:599–603.
[7] Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001;411:603–6.
[8] Solon JG, Burke JP, Walsh SR, et al. The effect of NOD2 polymorphism on post-surgical recurrence in Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis of available literature. Inflammatory Bowel Diseases 2013;19:1099–105.
[9] Fowler SA, Ananthakrishnan AN, Gardet A, et al. SMAD3 gene variant is a risk factor for recurrent surgery in patients with Crohn's disease. Journal of Crohn's and Colitis 2014;8:845–51.
[10] Sehgal R, Berg A, Polinski JI, et al. Mutations in IRGM are associated with more frequent need for surgery in patients with ileocolonic Crohn's disease. Diseases of the Colon and Rectum 2012;55:115–21.
[11] Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. Canadian Journal of Gastroenterology 2005;19(Suppl. A):5A–36A.
[12] Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. Nature Genetics 2008;40:955–62.
[13] Ahmed T, Rieder F, Fiocchi C, et al. Pathogenesis of postoperative recurrence in Crohn's disease. Gut 2011;60:553–62.

Please cite this article in press as: Germain A, et al. CARD8 gene variant is a risk factor for recurrent surgery in patients with Crohn's disease. Dig Liver Dis (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.dld.2015.07.013

[14] Alvarez-Lobos M, Arostegui JI, Sans M, et al. Crohn's disease patients carrying Nod2/CARD15 gene variants have an increased and early need for first surgery due to stricturing disease and higher rate of surgical recurrence. Annals of Surgery 2005;242:693–700.
[15] Büning C, Genschel J, Bühner S, et al. Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Crohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. Alimentary Pharmacology and Therapeutics 2004;19:1073–8.
[16] Maconi G, Colombo E, Sampietro GM, et al. CARD15 gene variants and risk of reoperation in Crohn's disease patients. American Journal of Gastroenterology 2009;104:2483–91.
[17] Renda MC, Orlando A, Civitavecchia G, et al. The role of CARD15 mutations and smoking in the course of Crohn's disease in a Mediterranean area. American Journal of Gastroenterology 2008;103:649–55.
[18] Onnie CM, Fisher SA, Prescott NJ, et al. Diverse effects of the CARD15 and IBD5 loci on clinical phenotype in 630 patients with Crohn's disease. European Journal of Gastroenterology and Hepatology 2008;20:37–45.
[19] Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, et al. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. Gastroenterology 2002;122:854–66.
[20] Razmara M, Srinivasula SM, Wang L, et al. CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis. Journal of Biological Chemistry 2002;277:13952–8.
[21] Bouchier-Hayes L, Conroy H, Egan H, et al. CARDINAL, a novel caspase recruitment domain protein, is an inhibitor of multiple NF-kappa B activation pathways. Journal of Biological Chemistry 2001;276:44069–77.
[22] Yamamoto M, Torigoe T, Kamiguchi K, et al. A novel isoform of TUCAN is overexpressed in human cancer tissues and suppresses both caspase-8- and caspase-9-mediated apoptosis. Cancer Research 2005;65:8706–14.
[23] Pathan N, Marusawa H, Krajewska M, et al. TUCAN, an antiapoptotic caspase-associated recruitment domain family protein overexpressed in cancer. Journal of Biological Chemistry 2001;276:32220–9.
[24] Chen GY, Núñez G. Inflammasomes in intestinal inflammation and cancer. Gastroenterology 2011;141:1986–99.
[25] Bernell O, Lapidus A, Hellers G. Risk factors for surgery and postoperative recurrence in Crohn's disease. Annals of Surgery 2000;231:38–45.
[26] Sachar DB. Patterns of postoperative recurrence in Crohn's disease. Scandinavian Journal of Gastroenterology Supplement 1990;172:35–8.
[27] Reese GE, Nanidis T, Borysiewicz C, et al. The effect of smoking after surgery for Crohn's disease: a meta-analysis of observational studies. International Journal of Colorectal Disease 2008;23:1213–21.
[28] Holzheimer RG, Molloy RG, Wittmann DH. Postoperative complications predict recurrence of Crohn's disease. European Journal of Surgery = Acta Chirurgica 1995;161:129–35.
[29] Iesalnieks I, Kilger A, Glass H, et al. Intraabdominal septic complications following bowel resection for Crohn's disease: detrimental influence on long-term outcome. International Journal of Colorectal Disease 2008;23:1167–74.

Please cite this article in press as: Germain A, et al. CARD8 gene variant is a risk factor for recurrent surgery in patients with Crohn's disease. Dig Liver Dis (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.dld.2015.07.013

Annexe 3 - NOD2 gene variant is a risk factor for post-operative complications in patients with Crohn's disease: a genetic association study

Adeline Germain, Rosa-Maria Guéant, Mathias Chamaillard, Patrick B. Allen, Laurent Bresler, Jean-Louis Guéant, Laurent Peyrin-Biroulet. Soumis.

*Manuscript
Click here to view linked References

NOD2 gene variant is a risk factor for post-operative complications in patients with Crohn's disease: a genetic association study

Authors : Adeline Germain, MD (1,2), Rosa-Maria Guéant, MD, PhD (2), Mathias Chamaillard, PhD (3,4), Patrick B. Allen, MD (5) Laurent Bresler, MD (1), Jean-Louis Guéant, MD, PhD (2), Laurent Peyrin-Biroulet, MD, PhD (2,6)

(1) Department of Digestive Surgery, University Hospital of Nancy-Brabois, Vandoeuvre-les-Nancy, France.

(2) INSERM U954, Nutrition-Génétique et Exposition aux risques environnementaux, Faculté de Médecine, Université de Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, France.

(3) Institut Pasteur de Lille, Center for infection and immunity of Lille, Lille, France.

(4) INSERM U1019, Team 7, Equipe FRM, Lille, France.

(5) Division of Gastroenterology, Ulster Hospital, Belfast. Northern Ireland, BT16 1RH, UK.

(6) Department of Hepatogastroenterology, University Hospital of Nancy-Brabois, Vandoeuvre-les-Nancy ; France.

CORRESPONDENCE TO :

Adeline Germain, a.germain@chu-nancy.fr, Department of Digestive Surgery, University Hospital of Nancy-Brabois, Vandoeuvre-les-Nancy ; INSERM U954, Nutrition-Génétique et Exposition aux risques environnementaux, Faculté de Médecine, Université de Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy ; France. Fax number: +3383153119, Telephone number: +3383153120.

ABSTRACT

Background: Post-operative complications are relatively frequent in Crohn's disease and several risk factors have been identified however the influence of genetic factors is unknown.

Methods: Crohn's disease patients who had a Crohn's disease-related bowel resection were identified from the «Nancy IBD cohort ». Post-operative complications were defined as intra-abdominal infectious complications and non intra-abdominal infectious complications occurring within 90 days after surgery. The influence of 203 single-nucleotide polymorphisms on post-operative complication rates was analyzed.

Results: 137 patients (48.9%) had undergone a Crohn's disease-related bowel resection in our cohort : post-operative complications occurred in 34 cases (24.8%), post-operative intra-abdominal infectious occurred in 18 cases (13.1%) : 12 had anastomotic leakage and 6 had intra-abdominal abscesses. In multivariate analysis, current smoker status (OR 2.71, 95% CI 1.18-6.21, p = 0.02) and Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2 (rs5743289) homozygosity for the risk allele (OR 2.07, 95% CI 1.15-3.72, p = 0.01) were independant risk factors of post-operative intra-abdominal infectious complications. Current smoker status and Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2 (rs5743289) homozygosity for the risk allele were not associated with non intra-abdominal infectious complications.

Conclusion: Current smoker status was associated with increased risk of post-operative intra-abdominal infectious complications. A novel association between Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2 and increased risk of post-operative intra-

abdominal infectious complications was observed in this study which may be important for future operative management in Crohn's disease.

INTRODUCTION

Despite the advent of anti-tumour necrosis factor alpha (anti-TNF-α) agents in the management of Inflammatory Bowel Diseases (IBD) and in particular Crohn's disease (CD), a large proportion of patients still require a surgical resection[1]. Unfortunately surgical resection for CD is associated with a high rate of operative morbidity. Peyrin-Biroulet et al, previously reported a post-operative mortality of 2% and an overall complication rate between 11-14%[2]. Post-operative intra-abdominal infectious complications (PIIC) which includes anastomotic fistulas, and intra-abdominal abscesses occur in approximately 10% of patients. Several clinical risk factors for PIIC have been reported such as: current smoker status, pre-operative steroids, and anti-TNF α treatments[3-7].

Further advances in the field of genetics have led to the identification of numerous susceptibility genes for CD. In 2001, two groups identified the gene Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2 (*NOD2)* as the first susceptibility gene for CD[8-9]. The actual function(s) of the *NOD2* protein however has not been fully established and the pathogenic mechanisms leading to the development of CD remains to be defined. A recent meta-analysis reported that in patients with CD with a *NOD2* polymorphism, there was no associated increase in risk of surgical recurrence compared with patients without the variant[10]. No previous studies have evaluated the association between genetic variants such as NOD2 and the risk of postoperative complications. More recently, genome-wide association studies (GWAS) have identified many single-nucleotide polymorphisms (SNPs) to be associated with inflammatory bowel disease (IBD)[11-14].

The aim of this study was to evaluate the risk of global and specific postoperative morbidity according to the influence of 203 SNPs[11] using a well-defined cohort of 857 CD patients, namely the *"Nancy IBD cohort"* between 2000 and 2011[1].

We hypothesized that NOD2 gene variants may be associated with complications in postoperative Crohns disease patients.

METHODS

Study subjects and demographics

As previously described, the "Nancy IBD cohort" is a large monocentric observational cohort of IBD patients with detailed clinical information on 1173 patients with IBD (857 CD, 316 ulcerative colitis)[1]. Patients were followed prospectively according to standard of care. Information about the Nancy IBD cohort is reported to the *Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés*, France (no. 1404720), which supervises the implementation of the act regarding data processing, data files, and individual liberties that came into effect on January 6th 1978, and was amended on August 6th 2004 to protect the personal data of individuals.

The diagnosis of CD in these patients was based on histological criteria. Clinical information that was collected included; age at diagnosis; gender; disease duration; disease location and behaviour (according to the Montreal classification[15]); extra-intestinal manifestations; smoking status; and date, type and indication of surgery. Smoking status was defined as 'non-smoker' or 'current smoker' at the time of surgery. The primary outcome was the occurrence of postoperative complications, including PIIC-related (abscesses, anastomotic leakage and enterocutaneous fistula) and non-PIIC-related (pulmonary embolism, postoperative ileus, pulmonary infections and wound infections).

Genotyping

All patients were identified from the Nancy IBD Cohort and signed a consent form for genetic analysis. Genomic DNA was isolated from blood samples taken from patients with CD who had a surgical resection. Genotyping was performed using the SNPlex technology

(SNPlex® Applied Biosystems, Foster City, CA) which is based on the Oligonucleotide Ligation Assay combined with multiplex PCR amplification. SNPs with more than 10% of *missing data* were removed. In total 203 CD-associated SNPs identified from previous studies were analyzed (Web Table 1).

Genotype assignment was performed by capillary electrophoresis analysis using an ABI 3730xl DNA Analyzer and ABI GeneMapper® v3.7 software. Genotyping was considered to be sufficient if the overall success rate for the SNP was greater than 80% and the Hardy–Weinberg equilibrium did not deviate significantly from the expected distribution ($p > 0.05$ for Chi2-test between expected and actual values).

Statistical analysis

Continuous variables were summarized using means and standard deviations. Polymorphisms were tested for the Hardy–Weinberg equilibrium before using the Fisher exact test to compare allelic and genotype frequencies.

As a Quality control step, the dataset was filtered to exclude SNPs with a Hardy–Weinberg $p< 0.001$ and a call rate greater than 95%. Individuals with less than 80% genotyping were excluded. Categorical variables were expressed as proportions. The Student t-test was used to compare continuous variables while the chi-square test (or Fisher exact test) was used for categorical variables. Variables reaching a p-value of ≤0.10 in the univariate analysis were entered into the multivariate analysis where a p-value < 0.05 indicated independent statistical significance. To analyze the effects of potential confounding factors on the main association, we performed a stratified analysis using estimated ORs with 99% confidence intervals; Mantel-Haenszel adjusted ORs and the Mantel-Haenszel chi-square test. Statistical

analysis was performed using Stata statistical software version 12.1 for Mac (StataCorp©, Texas 77845, USA).

RESULTS

Study population

In this study one hundred and thirty-seven patients (48.9%) of the Nancy IBD cohort required a CD-related bowel resection and were included in the analysis. Mean age at diagnosis was 23 years (range: 3-82 years), with a mean of disease duration of 5 years (range: 0 – 32 years). In this cohort of 137 patients, 82 patients were males (59%). Regarding disease location, seventy patients (51%) had ileitis, 25 (18%) had colitis, and 42 (31%) had ileo-colonic disease and eight patients (3%) had upper gastrointestinal involvement. Regarding disease behaviour, twenty-six patients (19%) had purely inflammatory disease, 71 (52%) had stricturing disease, and 40 (29%) had penetrating disease according to the Montreal classification. The primary indication for surgery was refractory to medications in 17 patients (12%), stricturing in 67 patients (49%), and penetrating disease in 53 patients (39%) (Figure 1). The mean duration of follow-up was 13.5 years (range 0 – 34 years).

Regarding surgical procedures, ileocaecal resection was performed in 78 patients (57%), small bowel resection in 12 patients (8.8%), colonic resection in 40 patients (29.2%), both small bowel and colonic resections in 5 patients (3.6%), and a defunctioning loop stoma in 2 patients (1.4%).

Post operative complications- [intra-abdominal infectious - and non-intra-abdominal infectious complications]

Of the 137 CD patients requiring an initial surgical operation, 34 patients (24.8%) experienced post-operative complications. There were no deaths reported in this group. Post-operative intra-abdominal infectious complications (PIIC) were observed in a total of 18

patients (13.1%): of these 7 patients had an intra-abdominal abscess (5.1%), of whom 4 had percutaneous drainage or repeat operation; 11 patients had an anastomotic leakage (8%), 4 patients experienced peritonitis requiring surgery and a temporary stoma. Non intra-abdominal infectious complications (Non-PIIC) were observed in 16 patients (11.7%): including wound infections in 7 patients, paralytic ileus in 5 patients, pulmonary embolism in 2 patients and pulmonary infection in 2 patients. Clinical characteristics of CD patients according to overall post-operative complications are shown in Table 1.

Genetic factors associated with post-operative complications

On univariate analysis, current smoker status (p=0.02) and Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2 (*NOD2)* (rs5743289) homozygosity for the risk allele (p=0.01) were significantly associated with the occurrence of overall post-operative complications. No other clinical or genetic factors were associated with post-operative complications.

All variables reaching a p value of ≤0.10 in the univariate analysis were entered into the multivariate analysis. On multivariate analysis, current smoker status (OR 2.71, 95% CI 1.18-6.21, p = 0.02) and *NOD2* (rs5743289) homozygosity for the risk allele (OR 2.07, 95% CI 1.15-3.72, p = 0.01) were independently associated with the development of post-operative complications. In our population, NOD2 allele frequency distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium (Table 2). When PIIC were considered alone, there was an independent association with smoking status (OR 4.27, 95% CI 1.42-12.79, p=0.009) and *NOD2* (rs5743289) homozygosity for the risk allele (OR 2.13, 95% CI 1.05-4.33, p=0.03) (figure 2). When non-PIIC were considered alone, there was no association with any of the clinical and genetic variables.

The stratified analysis demonstrated that smoking status did not appear to modify the effect or confound the association between the studied polymorphisms and PIIC (ORs 2.05 in the non-smokers and 2.08 in the smokers group).

DISCUSSION

Numerous studies have focused on the identification of genetic determinants on CD progression, but no previous study has focused on the impact of genetic factors on the risk of post-operative intra-abdominal infectious complications (PIIC). A correlation between specific genotypes and clinical phenotypes may permit more accurate pre-operative risk stratification in CD patients by identifying patients at high risk of PIIC. This may lead to the development of *predictive gene signatures* that could possibly be used to predict PIIC and thus aid in preoperative surgical decision making.

In our series, in total the PIIC rate (13%) is similar to that previously reported[3,6,16,17]. Smoking is known to be associated with a high rate of morbidity after all types of colorectal surgery[18], but the mechanism of smoking on postoperative complications after colorectal surgery has not been well defined. Smoking status maybe a potential confounding factor in studies in patients with CD, this is the reason why we stratified our analysis by smoking status. There was a significant difference in terms of PIIC rate between smokers and non-smokers (p=0.02). This study demonstrated that smokers undergoing a bowel resection had an estimated increased risk of developing PIIC three times higher than non-smoking patients. The association between *NOD2* polymorphism and rates of PIIC still remained statistically significant, independent from the smoking status of the patient.

The role of genetics factors in post-operative complications in CD surgery is unknown. The *NOD2* gene on chromosome 16 was first reported to be associated with CD in 2001[8,9]. *NOD2* mutations have been described in 40% of European CD patients. *NOD2* encodes a protein functioning as a general sensor of both Gram-negative and Gram-positive peptidoglycans[19]. Moreover, activation of this protein leads to an increase in Nuclear Factor kB (NK-kB) and

Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) signaling pathways, which play roles in the inflammatory and immune response by regulating genes involved in producing several pro-inflammatory cytokines such as Interleukin- 6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)[20].

This study is the first to report the association of the *NOD2* gene with the risk of PIIC in CD. We demonstrated that *NOD2* (rs5743289) homozygosity for the risk allele was an independent risk factor in the development of PIIC (p=0.03). A possible mechanism to explain the association between *NOD2* variants and a higher rate of PIIC may be related to an altered regulation of the inflammatory response in patients carrying these gene variants. This alteration may contribute to abnormal repair at the site of surgical intervention and consequently to PIIC, irrespective of the type of surgery. Henckaerts et al, have reported that the presence of at least one *NOD2* polymorphism is associated with a higher risk of bacteremia and a poor outcome in critical ill patients in an intensive care unit[21]. Bruns et al, have reported that *NOD2* variants increase the risk for culture-positive ascitic fluid infections in cirrhosis and may affect survival[22]. These results suggest an excessive permeability of the intestinal wall in cases of *NOD2* polymorphisms; this phenomenon may explain a higher risk of PIIC in this CD surgical population. Thus patients carrying a *NOD2* polymorphism may have a defect in their innate immunity and their intestinal barrier function with a subsequent higher risk for bacterial translocation. These mechanisms may explain why, in contrast, *NOD2* polymorphism was not associated with non-infectious post-operative complications.

This is the first series that has reported the influence of 203 CD-associated SNPs on post-operative complications in CD surgery, in a well-defined IBD cohort with a mean follow-up of 13.5 years. One important bias of our studies is a relatively small sample size and the

absence of a replication cohort. This study has suggested an association between PIIC in adult CD patients and *NOD2* (rs5743289). In 2013, Jakobsen et al. also found an association between CD and *NOD2* (rs5743289) (OR = 1.4 [1.1–1.9], p = 0.009) in a pediatric cohort[23].

CD medical therapies are known to influence the risk of post-operative complications in surgery in CD. Unfortunately, due to the retrospective study design, it was not possible to account for the effects of IBD-related medications. Indeed, variables such as the type of medication, time of medication use, and effect of medications on CD course, were not found in all medical records. Further prospective studies which include all medication use prior to surgery and post-operatively may answer this important question.

In conclusion, we identified an independent association between *NOD2* risk allele and increased risk of post-operative intra-abdominal infectious complications (PIIC) in CD. In addition, we identified current smoker status as a main clinical predictor for PIIC in CD surgery. The identification of *NOD2* as a risk allele for PIIC in CD is of particular interest as it may allow for early risk stratification of high-risk patients in whom surgery would be carefully managed and planned and predict patients at higher risk of post-operative complications.

REFERENCES

1. Peyrin-Biroulet L, Oussalah A, Williet N, Pillot C, Bresler L, Bigard M-A. Impact of azathioprine and tumour necrosis factor antagonists on the need for surgery in newly diagnosed Crohn's disease. Gut. 2011 Jul;60(7):930–6.

2. Peyrin-Biroulet L, Loftus EV, Colombel J-F, Sandborn WJ. The Natural History of Adult Crohn's Disease in Population-Based Cohorts. Am J Gastroenterol. 2009 Oct 27;105(2):289–97.

3. Alves A, Panis Y, Bouhnik Y, Pocard M, Vicaut E, Valleur P. Risk factors for intra-abdominal septic complications after a first ileocecal resection for Crohn's disease: a multivariate analysis in 161 consecutive patients. Dis Colon Rectum. 2007 Mar;50(3):331–6.

4. Iesalnieks I, Kilger A, Glass H, Müller-Wille R, Klebl F, Ott C, et al. Intraabdominal septic complications following bowel resection for Crohn's disease: detrimental influence on long-term outcome. Int J Colorectal Dis. 2008 Dec;23(12):1167–74.

5. Myrelid P, Olaison G, Sjödahl R, Nyström P-O, Almer S, Andersson P. Thiopurine therapy is associated with postoperative intra-abdominal septic complications in abdominal surgery for Crohn's disease. Dis Colon Rectum. 2009 Aug;52(8):1387–94.

6. Yamamoto T, Allan RN, Keighley MR. Risk factors for intra-abdominal sepsis after surgery in Crohn's disease. Dis Colon Rectum. 2000 Aug;43(8):1141–5.

7. Serradori T, Germain A, Scherrer ML, Ayav C, Perez M, Romain B, et al. The effect of immune therapy on surgical site infection following Crohn's Disease resection. Br J Surg. 2013 Jul;100(8):1089–93.

8. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. Nature. 2001 May 31;411(6837):603–6.

9. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature. 2001 May 31;411(6837):599–603.

10. Solon JG, Burke JP, Walsh SR, Coffey JC. The effect of NOD2 polymorphism on postsurgical recurrence in Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis of available literature. Inflamm Bowel Dis. 2013 Apr;19(5):1099–105.

11. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. Nat Genet. 2011 Mar;43(3):246–52.

12. Franke A, McGovern DPB, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. Nat Genet. 2010 Dec;42(12):1118–25.

13. McGovern DPB, Gardet A, Törkvist L, Goyette P, Essers J, Taylor KD, et al. Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. Nat Genet. 2010 Apr;42(4):332–7.

14. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. Nat Genet. 2007 May;39(5):596–604.

15. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott IDR, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. Can J Gastroenterol J Can Gastroenterol. 2005 Sep;19 Suppl A:5A – 36A.

16. Bernell O, Lapidus A, Hellers G. Risk factors for surgery and recurrence in 907 patients with primary ileocaecal Crohn's disease. Br J Surg. 2000 Dec;87(12):1697–701.

17. Post S, Betzler M, von Ditfurth B, Schürmann G, Küppers P, Herfarth C. Risks of intestinal anastomoses in Crohn's disease. Ann Surg. 1991 Jan;213(1):37–42.

18. Sharma A, Deeb A-P, Iannuzzi JC, Rickles AS, Monson JRT, Fleming FJ. Tobacco smoking and postoperative outcomes after colorectal surgery. Ann Surg. 2013 Aug;258(2):296–300.

19. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. J Biol Chem. 2003 Mar 14;278(11):8869–72.

20. Spehlmann ME, Eckmann L. Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. Curr Opin Gastroenterol. 2009 Mar;25(2):92–9.

21. Henckaerts L, Nielsen KR, Steffensen R, Van Steen K, Mathieu C, Giulietti A, et al. Polymorphisms in innate immunity genes predispose to bacteremia and death in the medical intensive care unit. Crit Care Med. 2009 Jan;37(1):192–201, e1–3.

22. Bruns T, Peter J, Reuken PA, Grabe DH, Schuldes SR, Brenmoehl J, et al. NOD2 gene variants are a risk factor for culture-positive spontaneous bacterial peritonitis and monomicrobial bacterascites in cirrhosis. Liver Int Off J Int Assoc Study Liver. 2012 Feb;32(2):223–30.

23. Jakobsen C, Cleynen I, Andersen PS, Vermeire S, Munkholm P, Paerregaard A, et al. Genetic susceptibility and genotype–phenotype association in 588 Danish children with inflammatory bowel disease. J Crohns Colitis. 2014 Jul 1;8(7):678–85.

FIGURES LEGENDS

Figure 1 - Indications for first surgery.

Figure 2 – Kaplan Meier curve for post-operative intra-abdominal infectious complications according to *NOD2* genotype.

Figure 1
Click here to download high resolution image

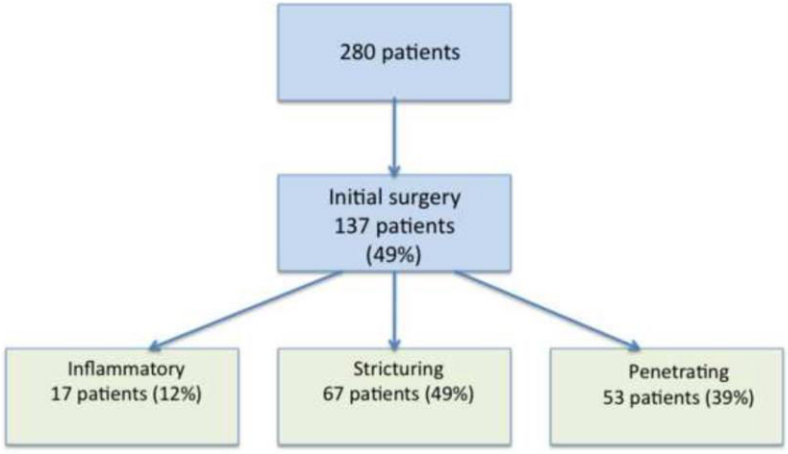
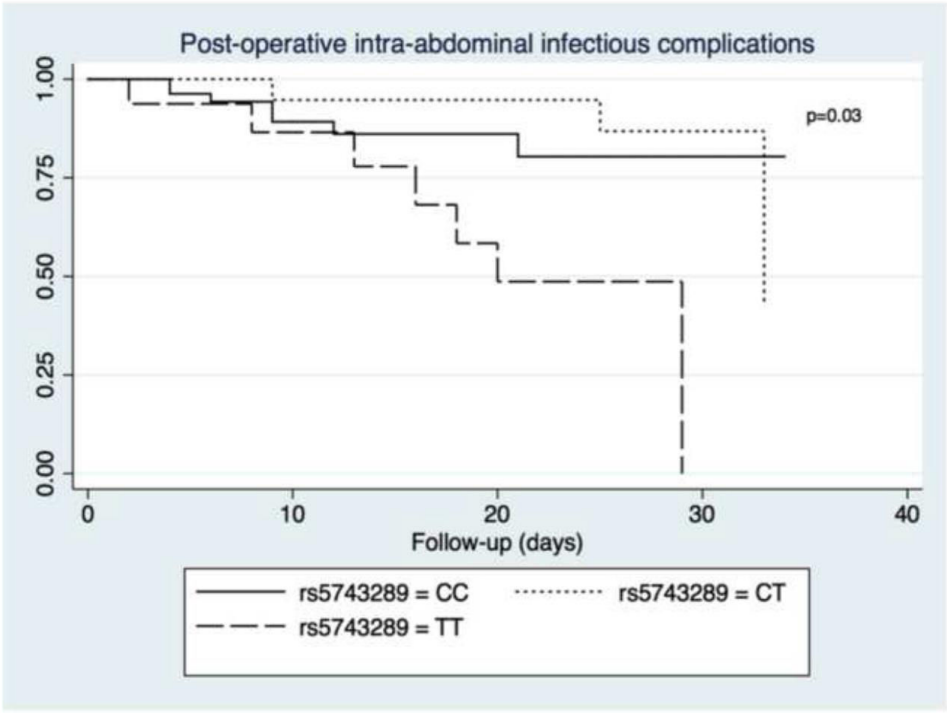


Figure 2
Click here to download high resolution image



	No post-operative complications (n=103)	Post-operative complications (n=34)	p-value
Male gender	62 (60.2%)	20 (58.8%)	0.88
Mean age at diagnosis	22.8 (+/- 12.7)	21.9 (+/- 10.2)	0.39
(years +/- SD, range)			
Mean preoperative disease duration (years +/- SD, range)	5.3 (+/- 6.5)	4.4 (+/- 5.2)	0.70
Location (n, (%))			0.48
Ileal	52 (50.5%)	18 (53%)	
Colonic	17 (16.5%)	8 (23.5%)	
Ileocolonic	34 (33.0%)	8 (23.5%)	
Behavior (n, (%))			0.86
Inflammatory	20 (19.4%)	6 (17.6%)	
Stricturing	52 (50.5%)	19 (55.0%)	
Penetrating	31 (30.1%)	9 (26.4%)	
Perianal	47 (45.6%)	17 (50%)	0.66
Current smoker (n, (%))	38 (36.9%)	20 (58.8%)	0.02
Type of surgery (n, (%))			0.90
Ileocaecal resection	60 (58.2%)	18 (52.9%)	
Small bowel resection	9 (8.7%)	3 (8.8%)	
Colonic resection	29 (28.2%)	11 (32.3%)	
Small bowell and colic resection	4 (3.9%)	1 (2.9%)	
Defunctioning loop stoma	1 (1%)	1 (2.9%)	

Table 1 - Clinical characteristics of CD patients according to post-operative complications

SNP	Wild type allele (homozygote)	Heterozygote	Risk allele (homozygote)	Minor allele frequency	p*
NOD2 (rs5743289)	61 (CC)	59 (CT)	18 (TT)	0.34	0.4

*Pearson's chi-squared test for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium

Table 2 – NOD2 allele frequency distribution

Annexe 4 – Liste des SNPs étudiés et des gènes correspondants

SNPs	Gene
rs1050152	L503F
rs2858331	
rs35675666	
rs4613763	DAB2 - PTGER4
rs1736135	
rs11465804	IL23R
rs9268480	BTNL2
rs2241880	ATG16L1, SCARNA5
rs1536800	
rs4353135	OR2B11
rs9268877	
rs3764147	LACC1
rs6871626	
rs11584383	C1orf81

rs10761659	
rs7927894	
rs11644386	
rs34330210	NLRP12
rs9292777	
rs8126036	
rs660895	
rs55646866	
rs3766356	ITLN1
rs7545677	
rs661946	
rs35395048	RIPK2
rs10077785	C5orf56
rs11041476	
rs2301436	FGFR1OP
rs12568930	
rs6933404	

rs11676348	
rs34971363	NLRP12
rs17419032	LOC101929305
rs2075822	NOD1
rs10114470	
rs1800450	MBL2
rs10210302	ATG16L1
rs11824708	
rs1456893	
rs7524102	
rs243327	
rs1892953	
rs2297909	KIF21B
rs4958847	IRGM
rs2043211	CARD8
rs4246905	
rs10870077	CARD9

rs744166	STAT3
rs11805303	IL23R
rs3194051	
rs4807451	
rs12948909	PTRF
rs348594	
rs3773494	FOXP1
rs921720	
rs2230801	RIPK2
rs17652341	
rs10883365	NKX2-3
rs498679	
rs907611	
rs4266924	OR2B11
rs2826914	
rs17084983	
rs16940202	

rs17582416	
rs12261843	
rs11564144	MUC19
rs2838519	
rs6478108	TNFSF158
rs35004667	RIPK2
rs917997	IL18RAP
rs4809330	ZGPAT
rs16940186	
rs6887695	
rs4653044	
rs1297265	
rs13003464	
rs2310173	
rs11085735	
rs762421	C21orf33
rs6434978	

rs322194	
rs10995271	
rs4263839	TNFSF15
rs2281852	
rs12529198	LYRM4
rs916977	HERC2
rs267939	
rs2075818	NOD1
rs267985	
rs2066845	NOD2
rs1011559	
rs9268858	
rs17758146	BRE
rs734999	
rs6911490	
rs3776825	
rs2542151	

rs2836754	
rs1518070	
rs11190140	NKX2-3
rs543104	
rs11175593	
rs11931702	RBPJ
rs12720356	
rs6895338	
rs12612347	
rs991804	
rs3129872	HLA-DRA
rs11747270	
rs2188962	C5orf56
rs6706689	
rs3197999	MST1
rs7404095	
rs17085007	

rs254560	
rs10508815	CUL2
rs6908425	CDKAL1
rs3807306	
rs2476601	PTPN22
rs11223996	
rs7517847	CARD15
rs2315008	ZGPAT
rs1736023	
rs2274910	ITLN1
rs2836878	
rs7611991	CADM2
rs224136	
rs10781499	
rs3828309	ATG16L1
rs2907748	NOD1
rs2076756	NOD2

rs11221335	
rs1422878	
rs10781507	
rs743479	C21orf33
rs3822607	
rs4804803	CD209
rs6116568	
rs17309827	SLC22A23
rs17234657	
rs2030582	
rs10517092	
rs10974944	JAK2
rs2106375	
rs10188217	PUS10
rs941823	
rs1551398	
rs1398553	

rs7130588	
rs4652	LGALS3
rs5743289	NOD2
rs943072	
rs7282490	
rs11617463	
rs10758669	JAK2
rs10045431	
rs5030737	MBL2
rs1456896	
rs2257885	
rs6920220	
rs6903235	
rs415595	
rs7117768	
rs2516049	
rs842647	REL

rs2066847	
rs1431242	
rs7523119	
rs11024256	
rs10766385	
rs254562	
rs898031	
rs2155219	
rs11209026	IL23R
rs74044411	
rs35768562	
rs12035082	
rs7758080	
rs3024505	
rs3011770	
rs9271568	
rs56159585	

rs34436714	NLRP12
rs11205387	ECM1
rs10783827	
rs6672995	
rs7746082	
rs11739663	
rs2755996	
rs7608910	
rs6451493	
rs6478109	TNFSF15
rs7849191	JAK2
rs3763313	BTNL2
rs4077515	
rs322193	
rs5743708	R753Q
rs1799930	NAT2

La maladie de Crohn est présente principalement dans les pays industrialisés. En France, elle touche 1 personne sur 1000. L'incidence est de 5 pour 100000 habitants par an.

A l'heure actuelle sa pathogénie reste mal expliquée et de nombreux facteurs interviennent (facteurs génétiques, immunologiques et environnementaux). Il semble donc essentiel de mieux comprendre la pathogénie de la maladie de Crohn afin d'identifier des cibles thérapeutiques permettant d'améliorer sa prise en charge et d'identifier des facteurs prédictifs de la récidive post-opératoire et des complications post-opératoires afin de personnaliser la prise en charge de chaque patient. Dans ce travail nous avons montré qu'un variant génétique de CARD8 (rs2043211) est un facteur de risque de récidive post-opératoire. Cette association n'est pas influencée par les autres facteurs de risque connus comme le tabagisme actif. L'identification de CARD8 comme un facteur de risque génétique de risque de récidive chirurgicale est d'un intérêt particulier puisqu'il pourrait devenir une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de la maladie de Crohn dans la période post-opératoire. Notre travail a également montré qu'un variant génétique de NOD2 (rs5743289) est un facteur de risque de complications intra-abdominales infectieuses post-opératoires (CIIP) après chirurgie dans la maladie de Crohn. L'identification de NOD2 comme un gène à risque pour la survenue de CIIP pourrait permettre d'établir une stratification précoce des patients à haut risque de CIIP chez qui la chirurgie devra être planifiée et prédire les patients à haut risque de CIIP.

Des études sur larges effectifs avec cohorte de réplication restent encore nécessaires avant que les patients puissent bénéficier des retombées de ces outils en pratique courante.

Mots clés : Maladie de Crohn – Chirurgie – Récidive chirurgicale – Complications post-opératoires –Variants génétiques.

Crohn's disease occurs mainly in industrialized countries. In France it affects 1 person in 1000. The incidence is 5 per 100,000 persons per year. At present its pathogenesis remains poorly explained and many factors are involved (genetic, immunological and environmental). It seems essential to better understand Crohn's disease pathogenesis in order to identify therapeutic targets to improve its management and to identify predictors of postoperative recurrence and postoperative complications to customize the care of each patient. In this work we showed that a genetic variant of CARD8 (rs2043211) is a risk factor for postoperative recurrence. This combination is not influenced by the other known risk factors such as active smoking. Identifying CARD8 as a genetic risk factor for risk of surgical recurrence is of particular interest since it may become a novel therapeutic target for the treatment of Crohn's disease in the post-operative period. Our work has also shown that a genetic variant of NOD2 (rs5743289) is a risk factor for postoperative intraabdominal infectious complications (CIIP) after surgery in Crohn's disease. The identification of NOD2 gene as a risk factor for the occurrence of CIIP could establish an early stratification of patients at high risk for CIIP in whom surgery should be planned and predict patients at high risk for CIIP.

Studies with large numbers replication cohort are still necessary before patients can enjoy the benefits of these tools in clinical practice.

Keywords : Crohn's disease – Surgery – Surgical recurrence – Post-operative complications – Genetics variants.