

# Physiopathologie de la pancréatite chronique

## Aspects moléculaires et génétiques

MODULE 3

Jean-Charles DAGORN

INSERM EMI 01-16, Bâtiment INSERM, 46 boulevard de la Gaye, 13009 Marseille.

### TABLE DES MATIÈRES

#### LA CELLULE ACINEUSE EST AU CŒUR DU PROBLÈME

- Réponse de la cellule acineuse à l'agression (stress)
- Pancréatite aiguë et pancréatite chronique
- L'agression cellulaire dans la pancréatite chronique

#### LA PANCRÉATITE CHRONIQUE HÉRÉDITAIRE

- Mutations associées à la PCH
- Mutations et pathologie
- Les calculs pancréatiques de la PCH
- PAP et calculs protéiques
- PCH et pancréatite obstructive
- Hétérogénéité génétique de la PCH

#### AUTRES FORMES DE PANCRÉATITE CHRONIQUE

- La théorie de l'anomalie intracellulaire
- La théorie de l'anomalie sécrétoire

#### CONCLUSION

Plusieurs réunions de consensus sur la classification des pancréatites se sont tenues au cours des 40 dernières années sans permettre d'aboutir à une réelle unanimité. Un exemple parmi d'autres, particulièrement frappant, est l'opposition entre ceux pour qui la pancréatite chronique (PC) est due à la répétition d'épisodes de pancréatite aiguë (PA) et ceux pour qui PC et PA sont deux entités cliniques et physiopathologiques distinctes. Les querelles d'écoles ne suffisent pas à expliquer de telles divergences de vue ; les critères de classification sont sujets à interprétation parce qu'ils sont insuffisamment précis, et ils le sont parce que les mécanismes moléculaires de la pathogénie des pancréatites ne sont pas clairement établis.

Notre connaissance du domaine progresse cependant, en particulier grâce à de nouvelles approches de biologie moléculaire et de génétique. Nous en résumerons ici les résultats les plus récents et tenterons de replacer les données antérieures dans ce nouveau contexte afin d'en dégager quelques pistes de réflexion. Les aspects cellulaires de la souffrance pancréatique, qui concernent toutes les étiologies, seront abordés en premier. Nous

#### ABRÉVIATIONS

|      |   |
|------|---|
| CFTR | : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator |
| PA   | : Pancréatite aiguë                                   |
| PC   | : Pancréatite chronique                               |
| PCH  | : Pancréatite chronique héréditaire                   |
| PSTI | : Pancreatic secretory trypsin inhibitor              |
| PTP  | : Pancreatic thread protein                           |
| PAP  | : Protéine associée à la pancréatite                  |

### CONTENTS

#### *Pathophysiology of chronic pancreatitis. Molecular and genetic studies*

#### THE ACINAR CELL IS CENTRAL TO THE PROBLEM

- Response of the acinar cell to a stress
- Relationship between acute and chronic pancreatitis
- Cellular injury during chronic pancreatitis

#### HEREDITARY PANCREATITIS

- Mutations involved in hereditary pancreatitis
- Mutations and pathology
- Pancreatic stones in hereditary pancreatitis
- Pancreatitis-associated protein and protein plug formation
- HP and obstructive pancreatitis
- Genetic heterogeneity of hereditary pancreatitis

#### OTHER FORMS OF CHRONIC PANCREATITIS

- The theory of intracellular abnormality
- The theory of secretory abnormality

#### CONCLUSIONS

verrons ensuite comment la génétique moléculaire a permis de trouver l'origine des pancréatites héréditaires et enfin comment ces résultats permettent d'affiner les hypothèses actuelles sur la pathogénie des autres formes de PC.

### La cellule acineuse est au cœur du problème

Les PC sont des maladies inflammatoires caractérisées par une dégénérescence lente et inéluctable du parenchyme pancréatique. Elles se répartissent principalement en formes idiopathiques, alcooliques, tropicales (nutritionnelles), familiales (héréditaires), post-traumatiques ou liées à l'hypercalcémie. On doit y ajouter l'atteinte pancréatique de la mucoviscidose qui concerne également le gastroentérologue puisque l'espérance de vie des malades atteint maintenant la troisième décennie. Des causes aussi diverses conduisant à une symptomatologie analogue placent la cellule acineuse au centre de la physiopathologie des PC. L'anatomopathologie constate dans tous les cas leur disparition progressive au profit d'une fibrose. Les cellules sont donc soumises à une agression qui provoque leur mort, selon des mécanismes dont on commence à comprendre la nature. La nature de l'agression, variable selon la cause, sera abordée plus loin. Nous nous intéresserons pour l'instant aux mécanismes moléculaires de la réponse acineuse à une agression, quelle qu'elle soit.

## Réponse de la cellule acineuse à l'agression (stress)

Plusieurs équipes se sont intéressées à ce problème. En l'absence de modèle animal fiable de PC et parce que ce phénomène concerne également la PA, des modèles animaux classiques de PA ont été utilisés. Des études complémentaires ont été réalisées *in vitro* en utilisant la lignée acineuse pancréatique AR4-2J.

### ETUDES *IN VIVO*

Ces études ont été essentiellement réalisées chez le rat et la souris. L'induction de la PA est généralement obtenue par injection rétrograde de taurocholate de sodium ou par stimulation sécrétoire supramaximale répétée à l'aide de céruléine. La première étude sur la régulation de l'expression des gènes au cours de la pancréatite [1] a mis en évidence un point très important. Contrairement à ce que l'on pensait, les cellules acineuses ne subissent pas passivement le stress provoqué par l'induction d'une PA. Leur programme d'expression génique se modifie rapidement et évolue tout au long de l'épisode de pancréatite. On observe au cours de la phase aiguë une inhibition de l'expression des gènes codant pour les enzymes digestives, dont la production n'est pas prioritaire en situation de souffrance cellulaire et pourrait même s'avérer nocive (activation du trypsinogène). En revanche, plusieurs protéines de stress sont fortement surexprimées [2, 3]. L'expression de ces gènes se normalise ensuite progressivement pendant que d'autres gènes liés à la régénération sont induits [4] et l'on observe au final une restitution complète du parenchyme, sans séquelles.

Au plan histologique, on constate au cours de la PA modérée une augmentation des figures apoptotiques [5]. L'apoptose est un phénomène actif, déclenché par des signaux indiquant que l'agression est trop importante pour envisager un retour à l'homéostasie. L'entrée en apoptose permet la destruction de la cellule et la phagocytose des produits de cytolysse sans déclenchement de l'inflammation, au contraire de la mort par nécrose [6]. L'induction de l'apoptose fait donc partie du programme de réponse pancréatique au stress.

La réaction pancréatique à l'agression est un programme de défense puisque des animaux chez qui elle est induite par une pancréatite modérée résistent ensuite beaucoup mieux à une pancréatite sévère [7].

### ETUDES *IN VITRO*

Les études menées sur la lignée pancréatique AR4-2J ont montré que les protéines de stress dont les gènes sont activés *in vivo* au cours de la PA sont également induites *in vitro* quand on soumet les cellules à des stress variés (stress oxydatif, agents toxiques, TNF $\alpha$ ) [8, 9]. Comme *in vivo*, la céruléine à dose supramaximale provoque l'apoptose des cellules AR4-2J [10]. Le programme de défense des cellules acineuses paraît donc relativement standard, sans que l'on puisse exclure des modulations fines, adaptées à la nature de l'agression.

## Pancréatite aiguë et pancréatite chronique

Ainsi, la cellule acineuse soumise à une agression réagit de façon spécifique. Si l'agression n'est pas fatale et reste limitée dans le temps, le programme de défense permet un retour à l'homéostasie, le parenchyme se régénérant par mitose à partir des zones préservées, jusqu'à restitution complète.

Ces résultats peuvent nous éclairer sur la pathogénie de la PC. L'agression subie par la cellule acineuse dans la première phase de la maladie y est certainement plus faible que dans la

PA, car la maladie reste longtemps silencieuse avant d'être révélée par des épisodes aigus. Dans la PC débutante, la réponse cellulaire est donc probablement proche de celle que l'on observe au cours d'une PA très modérée, c'est à dire une réaction de défense classique avec réduction de la fonction exocrine et induction des gènes de survie. Cependant, comme l'agression est par définition chronique, les cellules ne se trouvent jamais en situation de clore leur programme de défense en entrant dans la phase de régénération. Elles finissent alors par entrer en apoptose.

Si, au début de la PC, toutes les cellules du parenchyme sont apparemment soumises à une agression analogue, des variations locales d'intensité peuvent survenir, liées au développement du processus pathologique ou causées par des événements extérieurs qui se surajoutent. C'est pourquoi certaines régions basculeraient avant les autres dans la fibrose, comme le montre l'aspect bigarré des lésions avant que la fibrose ne gagne progressivement l'ensemble de la glande. Au cours de ce processus, le stress récurrent subi par une cellule peut également être augmenté par un apport local d'agents nocifs résultant de la mort de cellules voisines. Les foyers dans lesquels le processus dégénératif s'est accéléré peuvent être à l'origine des épisodes de PA observés au cours des PC.

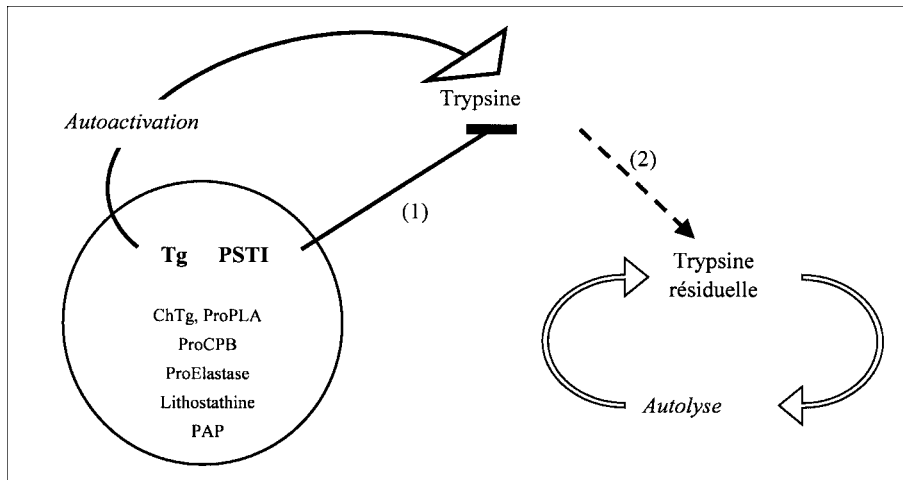
Les études décrites ci-dessus suggèrent que la distinction entre PA et PC est sans objet si l'on se place au plan moléculaire car les mécanismes mis en jeu sont les mêmes. La pancréatite « chronique » est la conséquence d'une répétition ininterrompue d'agressions de faible intensité touchant l'ensemble des cellules acineuses. La PC est donc une sorte de PA bénigne prolongée. Si toute agression de la cellule acineuse est considérée comme une PA, alors la PC est la conséquence d'une succession d'épisodes de PA. Neuschwander-Tetri et al. [11] ont étudié chez la souris l'effet de l'induction d'une PA œdémateuse modérée par infusion de céruléine. Dans ce modèle, toutes les cellules sont simultanément affectées. Ils ont répété les injections et constaté, au bout de 10 semaines, l'apparition de lésions ressemblant à celles de la PC.

## L'agression cellulaire dans la pancréatite chronique

Comme la PC n'est pas une maladie infectieuse et qu'aucun agent toxique n'y est systématiquement relié, il faut admettre que certains malades sont « prédisposés » à développer la maladie dans certaines circonstances. On sait par exemple qu'une majorité de malades est alcoolique, mais qu'une grande majorité des alcooliques est indemne de la maladie. Il s'agit donc de trouver des gènes dont les anomalies sont susceptibles d'expliquer les différentes prédispositions, c'est à dire d'expliquer comment un agent de stress (par ex. l'alcool) va induire chez ces sujets une souffrance pancréatique plus pathogène que dans la population générale. Pour cela, il convient de partir d'une hypothèse physiopathologique, de faire la liste des gènes concernés et enfin de rechercher pour chacun d'eux la présence de mutations susceptibles de rendre compte de l'affection. L'entreprise est complexe et risquée. C'est pourquoi les progrès les plus importants ont été réalisés ces dernières années dans le cas relativement « simple » de la PC héréditaire (PCH).

## La pancréatite chronique héréditaire

La forme familiale, décrite en 1952 [12], représente 5 à 10 % des PC [13]. Il s'agit d'une maladie à transmission autosomique dominante avec une pénétrance d'environ 80 % et une expressivité variable. Le profil clinique des sujets atteints est identique à



**Fig. 1** – Autoactivation du trypsinogène (Tg).

En situation normale, la trypsinogène formée dans la cellule sera inhibée par le pancreatic secretory trypsin inhibitor-PSTI (1). Si la capacité inhibitrice du PSTI est dépassée, la trypsinogène résiduelle se détruira par autolyse (2), sans conséquence pour la cellule. En particulier, les zymogènes (chymotrypsinogène, procarboxypeptidase B, proélastase, prophospholipase) ne seront pas activés in situ.

*Trypsinogène (Tg) autoactivation.*

*In normal conditions, trypsinogène generated in the cell will be inhibited by PSTI (1). If the amount of trypsinogène goes beyond the inhibitory capacity of PSTI, free trypsinogène will be destroyed by autolysis (2), without harming the cell because zymogens (chymotrypsinogène, procarboxypeptidase B, proelastase, phospholipase) will not be activated.*

celui des sujets souffrant de PC idiopathique. En revanche, l'âge moyen d'apparition (~ 7 ans) est plus précoce [13].

## Mutations associées à la PCH

En l'absence de gène candidat, la PCH bénéficiait par rapport aux formes sporadiques de l'avantage d'être héréditaire et donc de permettre une analyse par génétique inverse. Le clonage positionnel est devenu une technique de choix dans l'étude des maladies génétiques quand le développement d'outils de biologie moléculaire puissants a permis de suivre dans une famille la ségrégation de marqueurs génomiques avec la présence des symptômes. En 1996, le groupe de Férec [14] a localisé par cette méthode le gène de la PCH sur l'extrémité du bras long du chromosome 7 (7q35-qter). L'identification du gène lui-même a rapidement suivi [15]. Il s'agit du gène codant pour le trypsinogène cationique (PRSS1) qui, dans la famille étudiée, portait la mutation R122H (exon 3). Depuis, cette mutation s'est révélée être la plus fréquente avec N29I (exon 2) [16, 17]. D'autres mutations touchant le site de clivage du peptide signal (A16V) et du peptide d'activation (K23R, D22G) du trypsinogène ont également été trouvées [18-20].

## Mutations et pathologie

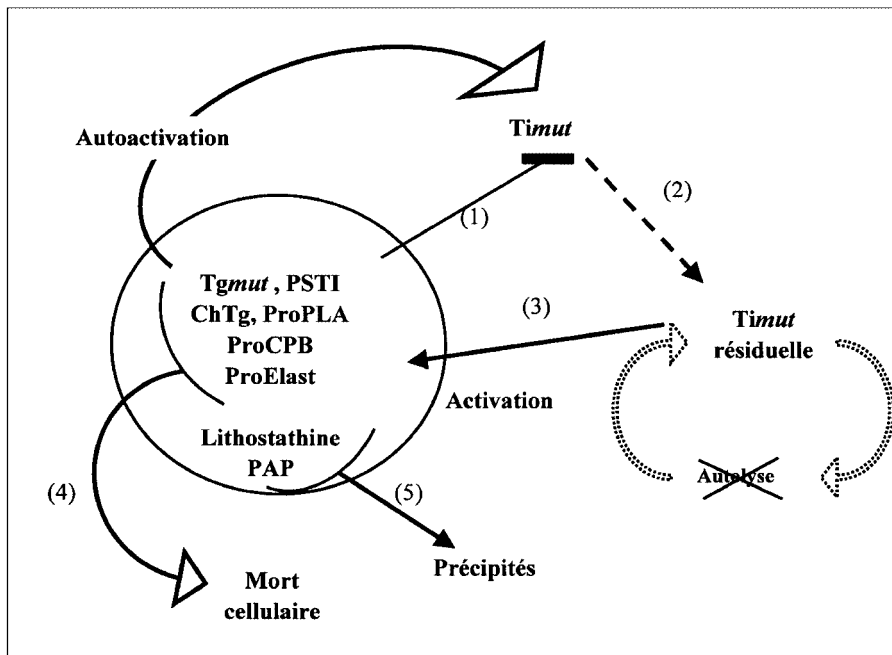
La découverte d'un lien entre une anomalie du trypsinogène et la pancréatite a suscité un grand intérêt parce que la trypsinogène a déjà été impliquée dans la pathogénie de la PA [21]. Cette enzyme occupe une place à part dans le groupe des protéases sécrétées car elle est responsable de l'activation de tous les zymogènes pancréatiques. C'est pourquoi elle est censée rester sous forme de trypsinogène (inactif) jusqu'à l'arrivée dans le duodénum. Là, l'entérokinase intestinale coupe le peptide d'activation de quelques molécules de trypsinogène. Ensuite, la trypsinogène produite se charge à la fois de terminer l'activation du reste du trypsinogène, par un phénomène très rapide de réaction en chaîne, et d'activer les autres zymogènes.

La localisation en R122H de la première mutation décrite a permis au groupe de Whitcomb [15] de proposer une hypothèse du mécanisme physiopathologique de la PCH. On sait en effet

que, dans le pancréas normal, une faible activation du trypsinogène en trypsinogène se produit spontanément à l'intérieur de la cellule acineuse. Deux mécanismes de contrôle existent pour éviter une activation explosive des zymogènes dont on imagine les conséquences (figure 1). Le premier est la synthèse concomitante par la cellule d'un inhibiteur des protéases à sérine (PSTI-pancreatic secretory trypsin inhibitor). Le PSTI se fixe sur la trypsinogène accidentellement produite et bloque son activité. Le second est un mécanisme d'autolyse de la trypsinogène, engendrant une forme inactive de l'enzyme. Il est mis en œuvre si l'inhibition par le PSTI est insuffisante. Or, l'arginine R122 représente précisément le site de coupure impliqué dans l'autolyse. Ce site n'existe plus dans le mutant R122H, l'arginine étant remplacée par une histidine. Si dans le pancréas au cours des PCH, les trypsinogènes mutants s'activent en quantité suffisante pour dépasser les capacités d'inhibition du PSTI, la trypsinogène excédentaire ne se détruira pas par autolyse et pourra déclencher une activation généralisée des zymogènes [15] (figure 2).

Le mécanisme par lequel la seconde mutation la plus fréquente, N29I, affecte la cellule est moins clair. Elle pourrait indirectement altérer l'accessibilité à l'arginine 122 [22] rejoignant ainsi le mécanisme décrit ci-dessus [23]. Il a également été montré que la trypsinogène N29I était plus stable que la trypsinogène sauvage [24, 25]. Comme le mutant R122H, le mutant N29I est plus sensible à l'autoactivation que le trypsinogène sauvage, mais n'a pas la même résistance à l'autolyse que R22H. Ceci pourrait expliquer pourquoi les symptômes de la PCH sont plus graves dans la forme R122H que dans la forme N29I [26, 27].

L'effet délétère de la trypsinogène pour la cellule, considéré comme évident dans les hypothèses décrites ci-dessus, n'avait en fait jamais été formellement démontré. Nous avons récemment étudié dans la lignée AR4-2J les conséquences de l'expression intracellulaire de trypsinogène, obtenue par transfection d'un vecteur approprié. Elle entraîne la mort cellulaire, comme on s'y attendait, l'effet étant déjà significatif à de très faibles taux d'expression. Dans le même système, nous avons également montré que l'expression du trypsinogène normal n'a aucun effet. En revanche, celle du trypsinogène mutant R122H et, à moindre degré, celle de N29I sont également létales. Les deux mutants n'ont cependant pas la toxicité de la trypsinogène. Ces résultats montrent que les modifications structurales induites par les



**Fig. 2** – Autoactivation du trypsinogène mutant R122H (Tgmut).

La trypsine formée (Timut), si elle n'est pas entièrement inhibée par le pancreatic secretory trypsin inhibitor-PSTI (1), ne s'autolysera pas (2). Elle activera les zymogènes pancréatiques (3), provoquant la mort cellulaire (4) et hydrolysera la lithostathine ainsi que la PAP (5) qui précipiteront, obstruant les canaux.

*Autoactivation of the R122H mutant trypsinogen (Tgmut)*

*If the mutant trypsin generated (Timut) is not completely blocked by PSTI (1), it will not be destroyed by autolysis (2). It will eventually activate other zymogens (3), resulting in cell death (4), and hydrolyze lithostathine and PAP (5) that will precipitate and plug the ducts.*

mutations sont suffisantes pour provoquer une souffrance cellulaire, qui intervient probablement au travers d'une activation incontrôlée du trypsinogène.

L'influence délétère des mutations A16V, K23R et D22G n'a pas été prouvée par des études cellulaires mais des études biochimiques ont montré, pour les deux dernières, que les trypsinogènes mutants avaient une capacité d'activation augmentée [25]. De la même façon, la découverte récente de mutations du PSTI associées à la PCH [28, 29] renforce l'hypothèse d'une pathogénie liée à un défaut du contrôle de l'activation occasionnelle du trypsinogène dans la cellule.

## Les calculs pancréatiques de la PCH

Pour être crédible, l'hypothèse exposée plus haut doit rendre compte de tous les paramètres cliniques de la PCH. Nous avons vu comment elle peut expliquer la disparition des cellules acineuses et donc la fibrose qui envahit progressivement le tissu au cours de la maladie. Mais la PCH est également caractérisée par la présence, dans les canaux pancréatiques, de bouchons protéiques parfois calcifiés. Peut-il y avoir un lien entre les mutations du trypsinogène et l'apparition des calculs ?

L'analyse des calculs de la PCH apporte quelques informations intéressantes. Ils se classent en deux catégories. Les calculs radiotransparents ou calcifiés en périphérie (aspect radiologique en cocarde) sont essentiellement formés d'un précipité protéique qui peut se calcifier secondairement [30, 31]. Les calculs radio-opaques sont essentiellement formés de cristaux de carbonate de calcium (calcite) et renferment une fraction protéique qui, comme dans les calculs des PC alcooliques ou idiopathiques, représente moins de 5 % de la masse totale. Les précipités protéiques contiennent une faible proportion d'enzymes sécrétoires (dont la trypsine) [32] mais sont très majoritairement formés (> 95 %) de fragments de lithostathine [33]. Cette protéine,

synthétisée et sécrétée par le pancréas normal [34], est impliquée dans le contrôle de la croissance cristalline du carbonate de calcium [35]. Sur le plan biochimique, la lithostathine est caractérisée par une très grande sensibilité à l'hydrolyse trypsique [36], la forme hydrolysée devenant rapidement insoluble en formant des fibrilles. Elle a d'ailleurs été appelée PTP (pancreatic thread protein) par le groupe de Gross [37, 38] avant que l'on comprenne sa structure native [34]. Donc, si pour une raison quelconque, de la trypsine active se trouve présente dans le suc, la lithostathine précipitera.

L'hypothèse de Whitcomb explique la présence de trypsine dans le suc des malades atteints de PCH. De grosses quantités de trypsine pourraient induire une précipitation massive de lithostathine et conduire à la formation de calculs radiotransparents. D'autres circonstances conduisant à la présence de petites quantités de trypsine dans le suc se traduiraient par la formation de précipités insuffisamment volumineux pour obstruer les canaux. Ces précipités pourraient toutefois servir d'amorce à la nucléation du carbonate de calcium et être ainsi à l'origine des calculs de calcite radio-opaques. Concernant l'apparition des calculs essentiellement calcifiés, on peut penser que leur première phase de formation, la phase de nucléation, est également due à la présence de précipités protéiques. Les raisons pour lesquelles le noyau de calcite va grossir sont mal connues.

L'existence de plusieurs types de calculs chez les malades atteints de PCH suggère également que la PCH est une maladie génétiquement hétérogène.

## Protéine associée à la pancréatite et calculs protéiques

A l'époque où ces travaux ont été réalisés, on ignorait l'existence de la protéine associée à la pancréatite (PAP). Cette protéine est synthétisée et sécrétée en faible quantité par le

pancréas normal, mais son expression augmente fortement ( $\times 400$ ) en réponse à une agression des cellules acineuses, d'où son nom de protéine associée à la pancréatite [39]. Elle peut représenter jusqu'à 10 % des protéines du suc pancréatique de rat au cours de la PA [40]. On peut donc penser qu'elle est très abondante dans le suc pancréatique de sujets présentant une PCH, beaucoup plus que la lithostathine. Son poids moléculaire et sa structure primaire sont très proches de ceux de la lithostathine et les deux gènes correspondants, situés en tandem sur le chromosome 2 chez l'homme [41] et le chromosome 4 chez le rat [42], sont issus d'un gène ancestral commun. Des études récentes ont montré qu'elle était aussi susceptible que la lithostathine à l'hydrolyse trypsique et formait le même type de fibrilles insolubles [43, 44]. D'ailleurs, une analyse moléculaire ultérieure a révélé que la PTP de boeuf [37], initialement considérée comme l'équivalent de la PTP humaine (lithostathine), était en fait de la PAP. Les techniques biochimiques d'identification utilisées à l'époque pour caractériser les protéines des calculs de la PCH ont donc très bien pu assimiler la PAP à la lithostathine et elle représente probablement un constituant majeur des calculs protéiques.

## PCH et pancréatite obstructive

Il est probable que des précipités protéiques vont apparaître assez précocement chez les malades atteints de PCH. On sait que l'obstruction d'un canal pancréatique empêchant le libre écoulement du suc va entraîner un stress des cellules sécrétrices situées en amont. Dans l'hypothèse de Whitcomb, au stress intracellulaire dû à la présence de trypsine s'ajoutera le stress obstructif, amplifiant le phénomène pathologique. Comme la lithostathine et probablement la PAP sont impliquées dans le phénomène obstructif, on a pensé que des mutations dans les gènes correspondants à ces protéines pourraient induire une plus grande susceptibilité des protéines à la précipitation induite par la trypsine. Ce n'est pas le cas, au moins dans les familles étudiées [14, 45].

Au-delà des micro-obstructions évoquées ci-dessus, on constate chez les malades la présence de calculs pouvant atteindre plusieurs centimètres de diamètre. Le mécanisme physique de leur croissance est mal connu. On peut simplement rappeler qu'un calcul se formera si, à un instant donné, le diamètre du précipité atteint le diamètre du canal, provoquant un blocage. Trois paramètres sont donc en compétition, la vitesse de croissance du calcul, la vitesse d'écoulement de la sécrétion qui entraîne le calcul naissant et le diamètre du canal. Si un précipité se bloque relativement bas dans l'arbre canalaire, le stress cellulaire causé par l'obstruction touchera non seulement la région déjà atteinte, qui a produit le précipité, mais aussi toutes les régions drainées par l'arbre canalaire situé en amont de l'obstruction. On se retrouve alors dans la situation d'une PA, c'est à dire d'un stress brutal touchant une région définie du parenchyme. Ce pourrait être la cause des crises de PA touchant les malades atteints de PCH.

## Hétérogénéité génétique de la PCH

Notre connaissance de la physiopathologie de la PCH a énormément progressé au cours des dernières années et les mécanismes moléculaires suggérés par l'hypothèse de Whitcomb sont relativement clairs. Pourtant, de nombreux cas de PCH ne s'expliquent pas par des mutations du trypsinogène cationique ou du PSTI [46]. Bien que le nombre total de familles étudiées soit encore faible et les stratégies employées différentes d'un groupe à l'autre, on peut estimer à environ 40 % les PCH dont l'origine génétique est inconnue. Dans les familles étudiées, les candidats évidents que sont le trypsinogène anionique et le mésotrypsino-

gène ont été exclus. Les recherches de clonage positionnel doivent donc se poursuivre mais leur lourdeur et le petit nombre de familles de PCH techniquement « utilisables », c'est à dire comprenant un nombre suffisamment important d'individus répartis sur plusieurs générations, relancent l'intérêt d'évaluer directement d'autres gènes candidats. En restant dans l'hypothèse de Whitcomb, on peut par exemple penser à la cathepsine B. De récents travaux ont montré que cette enzyme lysosomiale activait efficacement le trypsinogène [47, 48] et que son implication dans la pathogénie des PA était probable. Une anomalie génétique permettant la coalescence occasionnelle des granules de zymogène et des lysosomes ou conduisant à un routage intracellulaire anormal de la cathepsine B vers les granules de zymogène pourrait ainsi être un autre mécanisme conduisant à la PCH. Cependant, l'émergence d'une activité trypsique dans la cellule acineuse n'est peut-être pas le seul mécanisme impliqué.

La diversité génétique de la PCH nous donne une idée de la complexité de l'approche moléculaire des autres formes de PC, sporadiques par définition. Dans la PCH, les mutations impliquées sont dominantes parce qu'elles se traduisent par un gain d'activité (les trypsinogènes mutants acquièrent la propriété d'induire un stress, que l'allèle normal n'a pas) [49]. La situation est donc favorable (pour le chercheur). Certaines mutations sporadiques peuvent l'être également, mais d'autres pourraient être récessives, rendant l'analyse autrement plus complexe.

## Autres formes de pancréatite chronique

Dans la PCH, le clonage positionnel a permis de rechercher le gène responsable sans *a priori* sur le mécanisme physiopathologique impliqué. Une fois le gène découvert, il a été relativement facile de décrire le mécanisme moléculaire de la pathogénie. Dans les autres PC, cette approche est impossible. Nous sommes contraints de commencer par comprendre, au plan moléculaire, comment la maladie se développe pour ensuite identifier, parmi les protéines impliquées, celles dont les mutations pourraient être responsables du dérèglement pathologique.

Les données du problème sont les mêmes pour la PC alcoolique que pour la PCH car la présentation de la maladie est la même : il s'agit de rendre compte de la disparition progressive du parenchyme et de l'apparition des calculs. Deux théories principales sont en présence ; l'une selon laquelle des anomalies intracellulaires, structurales ou métaboliques, induisent la mort cellulaire, l'apparition des calculs n'en étant qu'une conséquence [50-52], l'autre selon laquelle des anomalies sécrétoires induiraient une obstruction des petits canaux, la mort cellulaire se produisant secondairement comme dans une pancréatite obstructive chronique et généralisée [53].

## La théorie de l'anomalie intracellulaire

Tous les événements conduisant à une agression de toutes les cellules acineuses et à leur mort peuvent être envisagés. Le mécanisme évoqué pour la PCH en fait donc partie. Il est peu vraisemblable car le « gain de fonction » d'un trypsinogène mutant conduirait à une transmission héréditaire. Cela a néanmoins été contrôlé et les mutations de la PCH n'ont pas été trouvées dans les autres formes de PC [54-56]. Une résistance insuffisante au stress oxydatif a également été proposée. On sait que le stress oxydatif peut induire l'apoptose acineuse mais les modèles animaux correspondants ne montrent pas l'apparition de calculs [57]. Partant de l'observation que 60 % des PC sont liées à l'alcoolisme, certains auteurs ont recherché un lien avec les gènes des enzymes de détoxification. Un polymorphisme de

l'aldéhyde déshydrogénase 2 (ALDH2) pourrait influencer le risque de développer une PC [58] mais ce n'est pas le cas du cytochrome p450 IIE1 [59].

## La théorie de l'anomalie sécrétoire

Cette hypothèse est intéressante car elle rend bien compte des caractéristiques de la maladie. Elle n'a cependant pas été vérifiée jusqu'ici, l'implication de mutations des gènes de la lithostathine et de la PAP ayant été pour l'instant écartée [45, 60]. L'implication d'une des mutations responsables de la mucoviscidose a également été envisagée. En effet, l'atteinte pancréatique de la mucoviscidose peut être considérée comme une forme de PC [61]. Le gène responsable est bien connu. Il s'agit du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) qui code pour une protéine essentiellement canalaire contrôlant le transport trans-membranaire de l'ion chlorure et celui du bicarbonate qui lui est couplé. Quand la protéine CFTR est mutée, des perturbations du transport ionique se traduisent par un suc pancréatique plus acide [62]. Le pH affecte la viscosité des mucines et des bouchons protéiques se forment à pH acide dans les canaux, empêchant la sécrétion. Le parenchyme est progressivement remplacé par de la fibrose, comme dans une PC obstructive. Comme plus de 900 mutations du gène CFTR ont été recensées et qu'elles ont des influences variées sur le pancréas, il était concevable que certaines d'entre elles soient associées à la PC [63, 64]. Plusieurs études ont montré une incidence plus grande des mutations du CFTR chez les malades que dans la population témoin, suggérant qu'une anomalie de la sécrétion électrolytique pourrait être un facteur prédisposant à la PC.

Il est intéressant de constater que la PC de la mucoviscidose, dans laquelle la sécrétion protéique est apparemment normale, n'est jamais accompagnée de calculs bien qu'il y ait obstruction des canaux. Ceci suggère que les calculs rencontrés dans les autres formes de pancréatite sont dus à des anomalies de la sécrétion acineuse ou que, dans la mucoviscidose, les caractéristiques biochimiques du suc (pH bas, composition ionique différente) ne permettent pas leur développement.

## Conclusion

Au vu des connaissances actuelles, les PC semblent avoir pour principale origine des anomalies génétiques qui placent les cellules du parenchyme dans un contexte de stress endogène (PCH) ou les rendent particulièrement sensibles à un stress environnemental (alcool). Il en résulte une mort cellulaire plus ou moins rapide selon les causes, touchant progressivement toutes les cellules du parenchyme, accompagnée d'un processus inflammatoire pouvant parfois s'exacerber sous forme de crises de PA. En dehors des PCH, on ignore cependant tout, ou presque, des mécanismes moléculaires impliqués. A moyen terme, des solutions pourraient venir des nouvelles stratégies utilisant les cartes de SNP (single nucleotide polymorphisms), théoriquement bien adaptées à l'étude des maladies complexes résultant d'interactions entre facteurs environnementaux et allèles de susceptibilité de plusieurs gènes [65].

Les perspectives thérapeutiques des PC sont donc sombres. Quand les anomalies génétiques associées suffisent à provoquer la mort cellulaire (PCH, mucoviscidose), seule la thérapie génique est envisageable et l'on sait qu'elle est pour l'instant peu réaliste. Dans le cas des pancréatites causées par une susceptibilité particulière à un stress environnemental connu (PC alcooliques), la suppression de ce stress ou la limitation de ses conséquences intracellulaires est évidemment bénéfique. Pour le gastroentérologue, les retombées pratiques des recherches sur les mécanismes physiopathologiques des PC sont, pour l'instant, bien maigres.

## RÉFÉRENCES

- Iovanna JL, Keim V, Michel R, Dagorn JC. Pancreatic gene expression is altered during acute experimental pancreatitis in the rat. *Am J Physiol* 1991;261:G485-9.
- Orelle B, Keim V, Masciotra L, Dagorn JC, Iovanna JL. Human pancreatitis-associated protein. Messenger RNA cloning and expression in pancreatic diseases. *J Clin Invest* 1992;90:2284-91.
- Mallo G, Fiedler F, Calvo E, Ortiz E, Vasseur S, Keim V et al. Cloning and expression of the rat p8 cDNA, a new gene activated in pancreas during the acute phase of pancreatitis, pancreatic development and regeneration, and which promotes cellular growth. *J Biol Chem* 1997;272:2360-9.
- Iovanna JL, Lechene de la Porte P, Dagorn JC. Expression of genes associated with dedifferentiation and cell proliferation during pancreatic regeneration following acute pancreatitis. *Pancreas* 1992;7:712-8.
- Iovanna JL. Redifferentiation and apoptosis of pancreatic cells during acute pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1996;20:77-84.
- Kaiser A, Saluja A, Sengupta A, Saluja M, Steer M. Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol* 1995;269:C1295-304.
- Fiedler F, Croissant N, Rehbein C, Iovanna JL, Dagorn JC, van Ackern K et al. Acute-phase response of the rat pancreas protects against further aggression with severe necrotizing pancreatitis. *Crit Care Med* 1998;26:887-94.
- Ortiz EM, Dusetti NJ, Vasseur S, Malka D, Bodeker H, Dagorn JC et al. The pancreatitis-associated protein is induced by free radicals in AR4-2J cells and confers cell resistance to apoptosis. *Gastroenterology* 1998;114:808-16.
- Malka D, Vasseur S, Bodeker H, Ortiz EM, Dusetti NJ, Verrando P et al. Tumor necrosis factor alpha triggers antiapoptotic mechanisms in rat pancreatic cells through pancreatitis-associated protein I activation. *Gastroenterology* 2000;119:816-28.
- Sata N, Klonowski-Stumpe H, Han B, Luthen R, Haussinger D, Niederau C. Supraphysiologic concentrations of cerulein induce apoptosis in the rat pancreatic acinar cell line AR4-2J. *Pancreas* 1999;19:76-82.
- Neuschwander-Tetri BA, Burton FR, Presti ME, Britton RS, Janney CG, Garvin P et al. Repetitive self-limited acute pancreatitis induces pancreatic fibrogenesis in the mouse. *Dig Dis Sci* 2000;45:665-74.
- Comfort MW, Steinberg AG. Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis. *Gastroenterology* 1952;21:54-64.
- Gross J. Hereditary pancreatitis. In : Go VLW, eds. *The exocrine pancreas : biology, pathobiology and diseases*. New York : Raven Press, 1986:829-39.
- Le Bodic L, Bignon JD, Raguene O, Mercier B, Georgelin T, Schnee M et al. The hereditary pancreatitis gene maps to long arm of chromosome 7. *Hum Mol Genet* 1996;5:549-54.
- Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 1996;14:141-5.
- Chen JM, Mercier B, Ferec C. Strong evidence that the N21I substitution in the cationic trypsinogen gene causes disease in hereditary pancreatitis. *Gut* 1999;45:916.
- Chen JM, Ferec C. Molecular basis of hereditary pancreatitis. *Eur J Hum Genet* 2000;8:473-9.
- Ferec C, Raguene O, Salomon R, Roche C, Bernard JP, Guillot M et al. Mutations in the cationic trypsinogen gene and evidence for genetic heterogeneity in hereditary pancreatitis. *J Med Genet* 1999;36:228-32.
- Witt H, Luck W, Becker M. A signal peptide cleavage site mutation in the cationic trypsinogen gene is strongly associated with chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1999;117:7-10.
- Teich N, Ockenga J, Hoffmeister A, Manns M, Mossner J, Keim V. Chronic pancreatitis associated with an activation peptide mutation that facilitates trypsin activation. *Gastroenterology* 2000;119:461-5.

21. Hofbauer B, Saluja AK, Lerch MM, Bhagat L, Bhatia M, Lee HS et al. Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats. *Am J Physiol* 1998;275 : G352-62.
22. Chen JM, Ferec C. Origin and implication of the hereditary pancreatitis-associated N21I mutation in the cationic trypsinogen gene. *Hum Genet* 2000;106:125-6.
23. Sahin-Toth M, Graf L, Toth M. Trypsinogen stabilization by mutation Arg117-->His : a unifying pathomechanism for hereditary pancreatitis ? *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:505-8.
24. Sahin-Toth M. Hereditary pancreatitis-associated mutation asn(21) → ile stabilizes rat trypsinogen in vitro. *J Biol Chem* 1999;274:29699-704.
25. Sahin-Toth M. Human cationic trypsinogen. Role of Asn-21 in zymogen activation and implications in hereditary pancreatitis. *J Biol Chem* 2000;275:22750-5.
26. Chen JM, Ferec C. Genes, cloned cDNAs, and proteins of human trypsinogens and pancreatitis-associated cationic trypsinogen mutations. *Pancreas* 2000;21:57-62.
27. Nishimori I, Kamakura M, Fujikawa-Adachi K, Morita M, Onishi S, Yokoyama K et al. Mutations in exons 2 and 3 of the cationic trypsinogen gene in Japanese families with hereditary pancreatitis. *Gut* 1999;44:259-63.
28. Witt H, Luck W, Hennies HC, Classen M, Kage A, Lass U et al. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet* 2000;25: 213-6.
29. Pfutzer RH, Barmada MM, Brunskill AP, Finch R, Hart PS, Neoptolemos J et al. SPINK1/PSTI polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 2000;119:615-23.
30. Sarles H, Camarena J, Gomez-Santana C. Radiolucent and calcified pancreatic lithiasis : two different diseases. Role of alcohol and heredity. *Scand J Gastroenterol* 1992;27:71-6.
31. Barthet M, Daniel R, Bernard JP, Valantin V, Sahel J. Radiolucent pancreatic lithiasis : a precursor stage for calcified pancreatic lithiasis or a new entity ? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9:697-701.
32. Hayakawa T, Kondo T, Shibata T, Kitagawa M, Nakae Y, Hayakawa S. Trypsin(ogen) content of pancreatic calculi in chronic calcified pancreatitis in man. *Dig Dis Sci* 1994;39:1345-50.
33. De Caro A, Multigner L, Dagorn JC, Sarles H. The human pancreatic stone protein. *Biochimie* 1988;70:1209-14.
34. Giorgi D, Bernard JP, Rouquier S, Iovanna J, Sarles H, Dagorn JC. Secretory pancreatic stone protein messenger RNA. Nucleotide sequence and expression in chronic calcifying pancreatitis. *J Clin Invest* 1989;84:100-6.
35. Bernard JP, Adrich Z, Montalto G, De Caro A, De Reggi M, Sarles H et al. Inhibition of nucleation and crystal growth of calcium carbonate by human lithostathine. *Gastroenterology* 1992;103:1277-84.
36. Rouimi P, Bonicel J, Rovey M, De Caro A. Cleavage of the Arg-Ile bond in the native polypeptide chain of human pancreatic stone protein. *FEBS Lett* 1987;216:195-9.
37. Gross J, Brauer AW, Bringhurst RF, Corbett C, Margolies MN. An unusual bovine pancreatic protein exhibiting pH dependent globul-fibril transformation and unique amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:5627-31.
38. Cai L, Harris WR, Marshak DR, Gross J, Crabb JW. Structural analysis of bovine pancreatic thread protein. *J Protein Chem* 1990;9:623-32.
39. Orelle B, Keim V, Masciotra L, Dagorn JC, Iovanna JL. Human pancreatitis-associated protein. Messenger RNA cloning and expression in pancreatic diseases. *J Clin Invest* 1992;90:2284-91.
40. Iovanna J, Orelle B, Keim V, Dagorn JC. Messenger RNA sequence and expression of rat pancreatitis-associated protein, a lectin-related protein overexpressed during acute experimental pancreatitis. *J Biol Chem* 1991;266:24664-9.
41. Dusetti NJ, Frigerio JM, Fox MF, Swallow DM, Dagorn JC, Iovanna JL. Molecular cloning, genomic organization, and chromosomal localization of the human pancreatitis-associated protein gene. *Genomics* 1994;19:108-14.
42. Stephanova E, Tissir F, Dusetti N, Iovanna J, Szpirer J, Szpirer C. The rat genes encoding the pancreatitis-associated proteins I, II and III, and the lithostathin/pancreatic stone protein/regeneration protein colocalize at 4q33-->q34. *Cytogenet Cell Genet* 1996;72:83-5.
43. Renugopalakrishnan V, Dobbs JC, Collette TW, Carreira LA, Hutson TB, Garduno-Juarez R. Human pancreatic thread protein, an exocrine thread protein with possible implications to Alzheimer's disease : secondary structure in solution at acid pH. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;258:653-6.
44. Graf R, Schiesser M, Scheele GA, Marquardt K, Frick TW, Ammann R et al. A family of 16 kDa pancreatic secretory stress proteins form highly organized fibrillar structures upon tryptic activation. *J Biol Chem* 2001;276:21028-38.
45. Keim V, Hoffmeister A, Teich N, Halm U, Scheurlen M, Tannapfel A et al. The pancreatitis-associated protein in hereditary and chronic alcoholic pancreatitis. *Pancreas* 1999;19:248-54.
46. Dasouki MJ, Cogan J, Summar ML, Neblitt W 3rd, Foroud T, Koller D et al. Heterogeneity in hereditary pancreatitis. *Am J Med Genet* 1998;77:47-53.
47. Halangk W, Lerch MM, Brandt-Nedelev B, Roth W, Ruthenbueger M, Reinheckel T et al. Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J Clin Invest* 2000;106:773-81.
48. Szilagyi L, Kenesi E, Katona G, Kaslik G, Juhasz G, Graf L. Comparative in vitro studies on native and recombinant human cationic trypsins : cathepsin B is a possible pathological activator of trypsinogen in pancreatitis. *J Biol Chem* 2001;276:24574-80.
49. Sahin-Toth M, Toth M. Gain-of-function mutations associated with hereditary pancreatitis enhance autoactivation of human cationic trypsinogen. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278:286-9.
50. Bordalo O, Gonçalves D, Noronha M, Cristina ML, Salgado A, Dreiling DA. Newer concept for the pathogenesis of chronic alcoholic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1977;68:278-85.
51. Braganza JM. Evolution of pancreatitis. In : Braganza JM ed. The pathogenesis of pancreatitis. Manchester : Manchester University Press, 1991:19-33.
52. Kloepfel G. Pathology of chronic pancreatitis in pancreatic pain. *Acta Chir Scand* 1990;156:261-5.
53. Sarles H, Bernard JP, Johnson CD. Pathogenesis and epidemiology of chronic pancreatitis. *An Rev Med* 1989;40:453-68.
54. Teich N, Mossner J, Keim V. Screening for mutations of the cationic trypsinogen gene : are they of relevance in chronic alcoholic pancreatitis ? *Gut* 1999;44:413-6.
55. Hassan Z, Mohan V, McDermott MF, Ali L, Ogunkolade WB, Aganna E et al. Pancreatitis in fibrocalculous pancreatic diabetes mellitus is not associated with common mutations in the trypsinogen gene. *Diabetes Metab Res Rev* 2000;16:454-7.
56. Chen JM, Piepoli Bis A, Le Bodic L, Ruzsniowski P, Robaszkiwicz M, Deprez PH et al. Mutational screening of the cationic trypsinogen gene in a large cohort of subjects with idiopathic chronic pancreatitis. *Clin Genet* 2001;59:189-93.
57. Merkord J, Weber H, Sparmann G, Jonas L, Hennighausen G. The course of pancreatic fibrosis induced by dibutyltin dichloride. *Ann NY Acad Sci* 1999;880:231-7.
58. Kimura S, Okabayashi Y, Inushima K, Kochi T, Yutsudo Y, Kasuga M. Alcohol and aldehyde dehydrogenase polymorphisms in Japanese patients with alcohol-induced chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2000;45:2013-7.
59. Yang B, O'Reilly DA, Demaine AG, Kingsnorth AN. Study of polymorphisms in the CYP2E1 gene in patients with alcoholic pancreatitis. *Alcohol* 2001;23:91-7.

60. Hawrami K, Mohan V, Bone A, Hitman GA. Analysis of islet regenerating gene polymorphisms in fibrocalculous pancreatic diabetes. *Pancreas* 1997;14:122-5.
61. Quinton PM. Physiological basis of cystic fibrosis, a historical perspective. *Physiol Rev* 1999;79 : S3-S22.
62. Choi JY, Muallem D, Kiselyov K, Lee MG, Thomas PJ, Muallem S. Aberrant CFTR-dependent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport in mutations associated with cystic fibrosis. *Nature* 2001;410:94-7.
63. Cohn JA, Jowell PS. Are mutations in the cystic fibrosis gene important in chronic pancreatitis ? *Surg Clin North Am* 1999;79:723-31.
64. Ockenga J, Stuhmann M, Ballmann M, Teich N, Keim V, Dork T et al. Mutations of the cystic fibrosis gene, but not cationic trypsinogen gene, are associated with recurrent or chronic idiopathic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2061-7.
65. Johnson G, Todd JA. Strategies in complex disease mapping. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10:330-4.